



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Identifizierung eines *cis*-regulatorischen Elements in einem  
UV-induzierbaren Promoter des hyperthermophilen *Archaeons*  
*Sulfolobus solfataricus*.

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser: Kathrin Lettner  
Studienrichtung /Studienzweig Ökologie  
(lt. Studienblatt):  
Betreuerin / Betreuer: Univ.-Prof. Dipl.-Biol. Dr. Christa Schleper

Wien, im Dezember 2010



Die vorliegende Arbeit wurde im Labor von Frau Prof. Dr. Christa Schleper an der Universität Wien am Institut Ökogenetik in der Zeit von August 2009 bis Dezember 2010 angefertigt.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken und Fakten, sofern sie nicht wissenschaftliches Allgemeingut und nicht einzeln angegebener Kenntnisstand sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Die Diplomarbeit wurde bisher in gleicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Wien, den 21.12.2010

---

Kathrin Lettner



## Danksagung

Mein besonderer Dank geht Frau Prof. Dr. Christa Schleper für die Möglichkeit diese Diplomarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können. Außerdem möchte ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie an der guten Betreuung bedanken. Es war immer wieder schön sich von der Begeisterung für die Welt von *Sulfolobus solfataricus* von dir anstecken zu lassen.

Daniela gilt mein ganz spezieller Dank für die unglaublich geduldige Betreuung und Kraft. Auch wenn ich nicht gleich alles verstanden habe, hat sie mir immer ein nettes Lächeln geschenkt, und versucht mich auf die richtige Spur zu bringen und mich mit Worten aufzubauen. Auch danke ich dir, dass ich dein Diplomarbeitsthema weiterführen durfte und im Übrigen für eine wirklich schöne gemeinsame Zeit an die ich mich immer gerne erinnern werde.

Andrea danke ich für den unglaublichen geistigen Input und die zahlreichen aufbauenden Gespräche. Es war immer eine Bereicherung ihn um Ratschläge zu fragen und sich durch seinen Geist inspirieren zu lassen.

Der gesamten Schleper-Gruppe danke ich für die große Hilfe im Laboralltag und der Hilfestellung zu zahlreichen und alltäglichen Fragen.

Außerdem danke ich Gabriel, Ziga, Christoph, Pierre, Anja, Nathalia, Ricardo und Tim für all die netten Gespräche, ihrer Hilfe und Unterstützung durch die gesamte Zeit meiner Arbeit.

Im Besonderen noch ein besonderer Dank an Regina, Michaela und Rita für die unglaublich große Hilfe und Ratschläge während der letzten Phase der Diplomarbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, speziell meinen Eltern, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben, auch wenn ihr euch wahrscheinlich oft gefragt habt, was ich da eigentlich so mache.



## 1. Einleitung

|  |    |
|--|----|
| 1.1 Die dritte Domäne des Lebens – <i>Archaea</i>  | 1  |
| 1.1.1 Wesentliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen<br><i>Bacteria</i> , <i>Eukarya</i> und <i>Archaea</i> | 2  |
| 1.2 Basale Transkription in <i>Archaea</i>   | 3  |
| 1.3 Transkriptionsfaktoren in <i>Archaea</i>   | 4  |
| 1.4 Der hyperthermophile <i>Crenarchaeota S. solfataricus</i> als Modellorganismus                                 | 6  |
| 1.5 Generelle Reaktion von <i>S. solfataricus</i> nach einer UV-Bestrahlung  | 9  |
| 1.6 Transkriptionsstudien von UV-induzierten Genen nach Bestrahlung  | 11 |
| 1.7 Ziel der Diplomarbeit  | 13 |

## 2. Material

|   |    |
|---|----|
| 2.1 Kultivierungsmedien, Puffer und Lösungen                                | 14 |
| 2.1.1 Medien  | 14 |
| 2.1.2 Puffer und Lösungen   | 15 |
| 2.1.2.1 Puffer für Gesamt-DNA-Isolierung von <i>Sulfolobus solfataricus</i> | 16 |
| 2.1.2.2 Puffer für Northern Analysen  | 16 |
| 2.2 Chemikalien und Hilfsmittel   | 18 |
| 2.3 Größenstandards   | 20 |
| 2.4 Enzyme  | 20 |
| 2.5 Mikroorganismen   | 21 |
| 2.6 Vektoren  | 21 |
| 2.7 Kits  | 21 |
| 2.8 Synthetische Oligonukleotide  | 21 |
| 2.8.1 Primer für die SLIM- Mutagenese PCR                                   | 22 |
| 2.8.2 Primer für <i>lacS</i> -PCR   | 23 |
| 2.8.3 Primer für Multiplex-PCR  | 23 |
| 2.8.4 Primer für Northern-Blot-Analysen                                     | 23 |
| 2.8.5 Primer für die Sequenzierung der Vektoren                             | 23 |



### 3. Methoden

|  |    |
|--|----|
| 3.1 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)   | 24 |
| 3.2. SLIM-PCR (Zielgerichtete – Ligase-unabhängige Mutagenese)   | 25 |
| 3.3 Phosphorylierung der Primer  | 27 |
| 3.4 Agarosegelelektrophorese   | 27 |
| 3.5 Aufreinigung der PCR-Produkte mittels PCR-clean up kit (NucleoSpin™)                                     | 27 |
| 3.6 Transformation von DNA in <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock   | 28 |
| 3.7 Plattierung von <i>E. coli</i>   | 28 |
| 3.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>  | 28 |
| 3.9 Restriktionsspaltungen   | 29 |
| 3.10 Phenolextraktion und Fällern von DNA  | 30 |
| 3.11 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (NucleoSpinExtractII)                                    | 30 |
| 3.12 Extraktion von großen DNA-Fragmenten aus Agarosegelen<br>(„Freeze and Squeeze“)                         | 31 |
| 3.13 Sequenzierungs-Reaktion   | 31 |
| 3.14 Dephosphorylierung von Vektor-DNA   | 31 |
| 3.15 Ligation von DNA-Fragmenten   | 32 |
| 3.16 Photometrische Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration (NanoDrop)  | 32 |
| 3.17 Herstellung von Glycerinkonserven von <i>E. coli</i>  | 33 |
| 3.18 Anzucht von <i>Sulfolobus solfataricus</i>  | 33 |
| 3.19 Entsalzung von DNA mittels Tropfendialyse   | 34 |
| 3.20 Elektroporation von <i>Sulfolobus solfataricus</i>  | 34 |
| 3.21. Herstellung von <i>Sulfolobus solfataricus</i> -Zellen für die Elektroporation                         | 35 |
| 3.22. Herstellung von <i>Sulfolobus solfataricus</i> -Zellen für die Elektroporation                         | 35 |
| 3.23 Plattierung von <i>Sulfolobus solfataricus</i>  | 35 |
| 3.24 Plattierung von <i>Sulfolobus solfataricus</i> Transformanten zur Gewinnung<br>von Einzeltransformanten | 36 |
| 3.25 Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>  | 37 |
| 3.26 Multiplex-PCR   | 37 |
| 3.27 UV-Induktion von <i>Sulfolobus solfataricus</i>   | 38 |
| 3.28 Erstellen einer Wachstumskurve  | 39 |
| 3.29 Qualitativer Test auf $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität  | 39 |
| 3.30 Herstellung von Proteinextrakten aus <i>Sulfolobus</i>  | 39 |
| 3.31 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford   | 40 |



|   |    |
|---|----|
| 3.32 Quantitativer Test auf $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität  | 41 |
| 3.33 Isolierung von Gesamt-RNA von <i>Sulfolobus solfataricus</i>   | 42 |
| 3.34 Northern-Analyse   | 42 |
| <b>4. Ergebnisse</b>  |    |
| 4.1 Sequenzstudien der Promotorregionen   | 46 |
| 4.2 Deletion des Promotors von T <sub>ind</sub>   | 48 |
| 4.3 Deletionen des Promotors von SSO0691a   | 49 |
| 4.4 Ausgangsplasmide  | 50 |
| 4.5 Deletionen via SLIM-PCR (Zielgerichtete – Ligase-unabhängige Mutagenese)                                    | 51 |
| 4.5.1 Schema der Methode SLIM-PCR   | 52 |
| 4.5.2 Optimierung des SLIM-PCR Protokolls   | 52 |
| 4.6 Überprüfung der mutagenisierten Promotorregionen  | 54 |
| 4.7 Klonierungsschema   | 56 |
| 4.8 Umklonierung in den shuttle Vektor pMJ0305  | 57 |
| 4.9 Expressionsstudien in <i>Sulfolobus solfataricus</i>  | 60 |
| 4.9.1 Transformation von <i>S. solfataricus</i> und Gewinnung von Einzeltransformanten                          | 60 |
| 4.9.2 Überprüfung des Genotyps der Transformanten   | 62 |
| 4.9.3 UV-Exposition der Einzeltransformanten  | 66 |
| 4.9.4. Phänotypische Charakterisierung der Einzeltransformanten nach der UV-Bestrahlung mittels Wachstumskurven | 67 |
| 4.9.5. Quantitativer Test der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität  | 68 |
| 4.9.6 Quantitativer Test der $\beta$ -Galaktosidase des veränderten Mutationspromotors T <sub>ind</sub>         | 69 |
| 4.9.7 Quantitativer Test der $\beta$ -Galaktosidase der veränderten Mutationspromotoren SSO0691a                | 71 |
| 4.10 Northern Blot Analyse von M16-SSO0691a-Delp2   | 76 |



**5. Diskussion**

5.1 Vergleichende Charakterisierung der UV-induzierten Promotorsequenzen 79

5.2 Untersuchung der UV-aktivierbaren Promotoren im Reportersystem 81  
von *Sulfolobus solfataricus*

5.3 Northern Blot Analyse von M16-pKL0691a-Delp2 85

**6. Ausblick** 87

**7. Literaturverzeichnis** 88

**8. Anhang**

8.1 Zusammenfassung 92

8.2 Sequenzen 94

8.3 Lebenslauf 98



## **1. Einleitung**

### **1.1 Die dritte Domäne des Lebens - Archaea**

Im Jahre 1977 wurde von den amerikanischen Mikrobiologen Carl Woese und George Fox eine phylogenetische Analyse basierend auf der Charakterisierung von ribosomalen RNA-Sequenzen durchgeführt. Aufgrund dieser Sequenzunterschiede können alle Lebewesen seitdem in die 3 Domänen *Eukarya*, *Bacteria* und *Archaea* eingeteilt werden (Woese *et al.*, 1977; Woese *et al.*, 1990).

Alle Lebewesen lassen sich auf einen Ursprung zurückführen, wobei es sehr wahrscheinlich ist, dass die *Archaea* aus einer gemeinsamen Entwicklungslinie mit den *Eukarya* hervorgehen. Wirft man nun einen genaueren Blick auf die Phylogenie der *Archaea*, können diese wiederum in die Phyla *Crenarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Euryarchaeota* und *Korarchaeota* eingeteilt werden. Bei den *Archaea*, welche bisher kultiviert werden konnten, handelt es sich oft um Organismen, die sich an extreme-, und lebensfeindliche Bedingungen angepasst haben. In das Phylum *Crenarchaeota* fallen meistens hyperthermophile Organismen, welche ein optimales Wachstum bei über 80°C aufweisen und in heißen, terrestrischen Quellen als auch in Tiefseequellen aufzufinden sind (Stetter *et al.*, 2006).

Die ersten Hinweise für das Existieren eines fünften archaealen Phylums, den *Thaumarchaeota*, wurden durch eine Genom-Analyse von *Cenarchaeum symbiosum* 2008 erhalten (Brochier-Armanet *et al.*, 2008). Kürzlich wurde die Hypothese für das neue Phylum, *Thaumarchaeota*, durch die Sequenzierung der Genome des marinen Ammonium-Oxidierers *Nitrosopumilus maritimus* und *Nitrososphaera gargensis*, bestätigt (Spang *et al.*, 2010). Eine weitere Gruppe der *Archaea* stellen die *Euryarchaeota* dar, welche als extrem halophile, extrem thermophile und methanogene Organismen vorkommen. Eine zusätzliche nicht-kultivierte Gruppe der *Euryarchaeoten* sind die anaeroben Methanoxidierer ANME-1 und ANME-2, welche in Syntrophie mit Sulfat-reduzierenden Bakterien in marinen Methan-Sedimenten leben (DeLong *et al.*, 2001). Erst vor nicht allzulanger Zeit wurden die Phyla *Korarchaeota* und *Nanoarchaeota* vorgeschlagen. Bislang ist nur das hyperthermophile *Archaeon* einer submarinen heißen Quelle *Nanoarchaeum equitans* als Vertreter für die Gruppe *Nanoarchaeota* bekannt (Huber *et al.*, 2002). Für die *Korarchaeoten* konnte bislang noch kein Vertreter kultiviert werden, aber dennoch können diese mittels rRNA-Phylogenie Analy-

sen z.B. in heißen Quellen nachgewiesen werden (Reysenbach *et al.*, 2000). Durch eine Zell-Anreicherung konnte ein Mitglied mit dem vorläufigen Namen „*Candidatus Korarchaeum cryptofilum*“ zugeordnet werden (Elkins *et al.*, 2008).

### **1.1.1 Wesentliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen *Bacteria*, *Eukarya* und *Archaea***

Einer der größten Unterschiede wodurch sich die *Archaea* deutlich von *Bacteria* differenzieren, liegt im Aufbau der Zellmembran. Bei *Archaea* besteht diese aus Phytanyletherlipiden und Ether-Verbindungen, und nicht aus Fettsäureesterlipiden und Ester-Verbindungen. Gemeinsamkeiten zwischen *Archaea* und *Bacteria* sind unter anderem das Fehlen eines Zellkerns, das Vorliegen einer zirkulären und nicht linearen DNA wie in *Eukarya*, ein Auftreten eines 70S Ribosoms mit den 23S - 16S - 5S rRNA-Untereinheiten und die Anordnung der Gene in Operons. Einen der größten Unterschiede der Domäne *Archaea* zu *Bacteria* zeigt der Aufbau der Zellwand, welche aus Proteinen, Heteropolysacchariden oder Pseudomurein besteht, und nicht aus Murein.

Für meine Diplomarbeit waren jedoch die Gemeinsamkeiten bezüglich der Informationsprozessierung der *Archaea* mit *Eukarya* von großer Bedeutung, wie zum Beispiel das Vorhandensein einer TATA-Box in der Promotorregion (Reiter *et al.*, 1988, 1990). Entdeckt wurden diese wichtigen Elemente der Transkription durch eine Studie, in der ebenfalls die erste archaeale DNA-abhängige RNA-Polymerase charakterisiert wurde (Zillig *et al.*, 1979). Entscheidende Ähnlichkeiten der *Archaea* zu *Eukarya* sind der basale Transkriptionsapparat bestehend aus der komplexen RNA-Polymerase, dem TBP (TATA-Box Bindeprotein, welches dem eukaryontischen TBP homolog ist), und dem Transkriptionsfaktor B (TFB), das dem eukaryontischen TFIIB homolog ist. (Bell *et al.*, 1998). Zudem besteht die archaeale RNA-Polymerase aus 10-14 Untereinheiten und repräsentiert einen „eukaryontischen“ Typus (Langer *et al.*, 1995). Die meisten Untereinheiten sind wiederum den Untereinheiten der eukaryontischen RNA-Polymerase homolog (Garret and Klenk, 2007). Außerdem können die archaeale und die eukaryontische RNA-Polymerase im Gegensatz zur bakteriellen RNA-Polymerase die Promotorsequenzen nicht allein mit Hilfe von Sigmafaktoren erkennen.

Zusammenfassend lässt sich hier sagen, dass *Archaea* mit *Bacteria* und *Eukarya* eine Menge an Gemeinsamkeiten aufweisen, wobei die dritte Domäne im Bereich der

Informationsprozessierung (Replikation, Transkription und Translation) mehr Gemeinsamkeiten mit den *Eukarya* hat (Garret and Klenk, 2007). Eine der Motivationen für die hier durchgeführte Studie liegt darin begründet, dass bis heute sehr wenig über die Regulation der Transkription von *Archaea* bekannt ist, die einen den *Eukaryoten* ähnlichen Transkriptionsapparat in einer prokaryotischen Zelle aufweisen.

## **1.2 Basale Transkription in Archaea**

Prinzipiell stellt der archaeale Transkriptionsapparat eine einfachere Version der eukaryontischen basalen Maschinerie dar. Im Unterschied zur eukaryontischen RNAPII wird z.B. keine zusätzliche Energie in Form von ATP zur Initiation der Transkription benötigt (Bell *et al.*, 1998). Die wichtigsten Motive des Promotors für die Initiation der Transkription stellen die TATA-Box und das BRE-Element (transcription factor B recognition element) dar. In der Nähe des Transkriptionsstartpunktes befindet sich ein zusätzliches Motiv, das sogenannte INR-Element (Initiator element), welches als ein drittes Promotor-Element angesehen wird (Garret and Klenk, 2007). Außerdem findet man in *Archaea* oft einen Pyrimidin zu Purin-Wechsel an der Initiationsstelle (Thomm, 1996). Ein weiteres konserviertes A/T Motiv für die archeale Transkription von „leaderless“ Transkripten wurde 10 Nukleotide stromauf des TSS (Transkriptionsstartpunkt) entdeckt, konnte aber bisher biochemisch noch nicht bestätigt werden (Torarinsson *et al.*, 2005).

Der erste Schritt der Initiation der Transkription ist das spezifische Binden des TATA-Box Bindeproteins an die TATA-Box. Diese befindet sich ca. 25 Basenpaare stromauf (Thomm, 1996) des Transkriptionsstartpunkts und ist wie in *Eukarya* sehr A/T reich und 8 Nukleotide lang. Wichtig für eine effiziente Transkription ist die T/A-Nukleotidsequenz, welche sich im Zentrum der TATA-Box befindet (Hain *et al.*, 1992). Sie ist entscheidend für die Bindung des TBP und bestimmt die Position der Transkriptionsstartstelle. Direkt neben dem Hauptelement des Promotors, der TATA-Box, befindet sich das BRE (Reiter *et al.*, 1990), welches sehr purinreich und ca. 6 Nukleotide lang ist (Bell *et al.*, 1999). Dieses ist wichtig für die Stärke des Promotors und für die Orientierung des Transkriptions-Initiations-Komplexes (Qureshi *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 1999). Der Transkriptionsfaktor B (TFB) interagiert anschließend mit dem TBP und bindet spezifisch an das BRE-Element. Für *Sulfolobus* als auch für *Methanococcus* konnte gezeigt werden, dass das archaeale TFB eine wichtige Rolle

für die Initiation der Transkription hat (Hausner *et al.*, 1996). Weiters wurde entdeckt, dass die meisten *Archaea* nur eine Kopie von TBP und TFB enthalten (Garret and Klenk, 2007).

Weiters konnte der Transkriptionsfaktor E (TFE) in *Archaea* identifiziert werden. Dieser zeigt ebenfalls eine Homologie zu einem eukaryontischen Transkriptionsfaktor, dem TFIIE (Garret and Klenk, 2007). *In vitro* Experimente zeigten, dass TFE nicht unbedingt für die Transkription benötigt wird, aber nichtsdestotrotz eine stimulierende Rolle für manche Promotoren unter bestimmten Umständen einnimmt, sowie auf die Interaktion zwischen RNAP, TBP und der TATA-Box eine positive Wirkung aufweist (Bell *et al.*, 2001). Durch den zusätzlichen Transkriptionsfaktor E wird auch während der frühen Verlängerungsphase der Transkription die Transkriptionsblase stabilisiert (Grünberg *et al.*, 2007).

Nachdem das TBP und TFB gebunden am Promotor als Komplex vorliegt, ist ein Anlagern der RNA-Polymerase möglich. Die Polymerase ist nun um den Transkriptionsstartpunkt positioniert, und die Initiation der Transkription kann stattfinden (Bell *et al.*, 2001).

### **1.3 Transkriptionsfaktoren in Archaea**

Auch wenn die basale Transkriptionsmaschinerie große Ähnlichkeiten mit *Eukarya* aufweist, zeigt sich bei der Mehrheit der bisher identifizierten Transkriptionsregulatoren eine größere Ähnlichkeit mit bakteriellen Aktivatoren und Repressoren (Bell, 2005). Obwohl die Anzahl an archaealen Genom-Sequenzen stetig steigt, sind im Vergleich aber wenig Regulationssysteme charakterisiert. Bis heute sind von *Sulfolobus solfataricus* nur 3 Regulatoren bekannt, der Repressor Lrs14, der Repressor LrpA, und der mögliche Aktivator LysM. Im Übrigen ist hier zu erwähnen, dass das meiste über archaeale Genregulierung von hyperthermophilen Organismen bekannt ist.

Generell ist zu sagen, dass die Lrp-Familie eine breit konservierte Gruppe von Regulatoren repräsentiert, welche auch den einzigen charakterisierten Transkriptionsaktivator Ptr2 von *M. jannaschii* aufweist. Lrp-ähnliche Proteine in *Bacteria* sind im Gegensatz zu den *Archaea* am Metabolismus von Aminosäuren beteiligt, während die Rolle in *Archaea* unbekannt ist. Der Transkriptionsregulator Ss-Lrp von *Sulfolobus solfataricus* ist dem bakteriellen Lrp (leucine responsive regulatory protein) sehr ähn-

lich, und in Bakterien stark konserviert. Die meisten identifizierten Lrp-ähnlichen Regulatoren mit bekannter Funktion beinhalten auch LysM von *Sulfolobus solfataricus* und Ptr2. In Bakterien sind Lrp-ähnliche Proteine in der Regulation des Aminosäuremetabolismus involviert, wobei die Rolle in *Archaea* noch nicht geklärt werden konnte (Brinkman *et al.*, 2002; Ouhammouch *et al.*, 2003, 2005). Für das Genom von *Sulfolobus* wurden 7 Lrp-Proteine mit voller Länge prognostiziert. Davon wurden fünf, darunter Ss-LrpB das wahrscheinlich die eigene Expression bei geringer Konzentration *in vivo* aktivierend reguliert, charakterisiert (Peeters *et al.*, 2009).

SS-LrpB bindet seinen eigenen Promotor über drei „inverted repeats“, welche direkt stromauf der TATA-Box und des BREs liegen (aus Bell, 2005). Bei Bindungsaffinitäts-Analysen wurde herausgefunden, dass Bindestelle 1 und 3 stärker gebunden werden, als Bindestelle 2.

Ein anderer Transkriptionsregulator ist das Protein Lrs14, der als Repressor wirkt und spezifisch die Promotorbindung der Transkriptionsfaktoren TBP und TFB (Bell and Jackson, 2000) inhibiert. Der Mechanismus dieser Genregulation funktioniert hier über die Bindung von Lrs-14 an 2 Sequenzen des eigenen Promotors, die das BRE-Element und die TATA-Box überlappen (Napoli *et al.*, 1999). Lrs-14 zählt ebenso zu der archaealen Familie der Lrp-ähnlichen Proteine und bindet zusätzlich auch an die Promotorregion einer Alkohol-Dehydrogenase (*adh*) in *Sulfolobus solfataricus* (Bell, 2005), wobei der mögliche Effekt noch nicht festgestellt werden konnte.

Das Protein LysM von *Sulfolobus solfataricus* ist ebenfalls ein Lrp-ähnliches Protein, das in der Regulation von Lysin eine Rolle spielt und vom *lys*-Gencluster kodiert wird. Es ist zuständig für die Expression dieses Genclusters, wobei exogenes Lysin als Ligand für LysM dient. Dadurch kommt es für LysM zu einer höheren Affinität zur Bindung an die DNA, und der Transkriptionsregulator kann sich direkt stromauf des BRE-Elements des schwachen *lysW* Promotors anlagern (Brinkman *et al.*, 2002).

Eine große Ausnahme in der die Genregulierung in *Archaea* gut studiert ist, stellt die Gasvesikel-Synthese der halophilen *Archaea* dar. GvpE ist ein Transkriptionsaktivator des *gvp* Genclusters, welche in die Gasvesikelbildung von z.B. *Halobacterium salinarum* involviert ist (Krüger *et al.*, 1998). Die für die Aktivierung benötigte Sequenz in *H. salinarum* ist 20 Nukleotide lang und direkt stromauf der TATA-Box und dem BRE-Element positioniert, was auf eine Interaktion zwischen GvpE und Proteinen des Initiationsapparats der Transkription hinweist (Teufel *et al.*, 2010). Die Bildung dieser

Gasvesikel ist von 14 gvp Genen abhängig, die zusammen mit dem Repressor GvpD reguliert werden (Hofacker *et al.*, 2004).

#### **1.4 Der hyperthermophile Crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus* als Modellorganismus**

Der in dieser Arbeit verwendete Modellorganismus für *Archaea* ist der hyperthermophile *Crenarchaeote Sulfolobus solfataricus* der Ordnung *Sulfolobales*, der erstmals aus heißen terrestrischen Solfataren in Pisciarelli, Italien, isoliert wurde (Zillig *et al.*, 1980). Der Organismus ist einer der am besten studierten Spezies und kann relativ leicht unter aeroben und heterotrophen Bedingungen auf Fest- als auch in Flüssigmedium kultiviert werden (Grogan *et al.*, 1989). *Sulfolobus solfataricus* weist eine coccoide Morphologie auf und wächst bei einer Temperatur von 78°C und einem pH von 3. Somit ist er ein heterotropher und acidophiler Organismus und nutzt einfache Kohlenhydrate als Kohlenstoff- und Aminosäuren als Energiequelle.

*Sulfolobus solfataricus* besitzt ein Genom mit der Größe von 2,9 Mb das vollständig sequenziert wurde (She *et al.*, 2001). Außerdem konnten eine Anzahl von genetischen Elementen, wie Viren, konjugative Plasmide und kleine high-copy Vektoren, charakterisiert und sequenziert werden (Überblick Zillig *et al.*, 1998). Diese Elemente dienten dazu, das erste genetische System für *Sulfolobus*, mit einem Transformations/Transfektions Protokoll als auch einen *shuttle*-Vektor zu entwickeln (Schleper *et al.*, 1992, Jonuscheit *et al.*, 2003).

Auch konnten verschiedene  $\beta$ -Galaktosidase Mutanten von *S. solfataricus* durch ein Screening auf Indikator-Platten isoliert werden. Einer dieser Mutanten (PH1) ist aufgrund einer spontanen Unterbrechung des ORFs mit dem beweglichen Insertionselement ISC1217 nicht in der Lage, eine funktionelle  $\beta$ -Galaktosidase zu exprimieren (Schleper *et al.*, 2004). Dadurch ist der Stamm PH1 für die Komplementation mit einem auf der  $\beta$ -Galaktosidase basierendem Reportersystem geeignet, und es kann eine mit X-Gal Blau/Weiß Selektion der Transformanten durchgeführt werden.

Um Zellprozesse und Genfunktionen in hyperthermophilen *Crenarchaeota* zu studieren, wurde weiters ein stabiles Modellsystem basierend auf der Isolation von Plasmiden und Viren entwickelt. Dafür wurde eine Uracil-auxotrophe Mutante M16 ausgehend vom Stamm PH1 isoliert, in der der Leserahmen des Gens *pyrEF* durch das Insertionselement ISC1359 unterbrochen ist (Martusewitsch *et al.*, 2000). Das be-

deutet, dass die Mutante nicht mehr in der Lage ist, die *pyrEF* Genprodukte Orotat-Monophosphat-Decarboxylase und Orotat-Phosphoriboxyl-Transferase zu exprimieren. Dadurch ist sie auf eine Zugabe von Uracil zum Medium oder eine Komplementation durch die Gene angewiesen, da die Mutante nicht in der Lage ist den letzten Schritt der Pyrimidin-Nukleotid Biosynthese zu prozessieren. Daher konnte mit der stabilen Mutante M16 ein Transformationssystem entwickelt werden, dessen Vektor auf einem selektiven *shuttle*-Vektor des Virus SSV1 von *Sulfolobus shibatae* basiert (Jonuscheit *et al.*, 2003). Bei der Transformation in die Uracil-auxotrophe Mutante kann der *shuttle* Vektor mit den *pyrEF* Genen als Selektionsmarker eingesetzt werden.

SSV1 (*Sulfolobus shibatae* virus 1) ist ein lysogenes Virus, das zur Familie *Fuselloviridae* gehört und wurde aus dem *Sulfolobus shibatae* Stamm B12 aus Beppu, Japan isoliert wurde (Martin *et al.*, 1984). Dieses Virus weist eine zitronenförmige Morphologie mit einer Größe von 60x100 nm auf (Zillig *et al.*, 1996) (Abb. 1) und besitzt eine doppelsträngige zirkuläre 15,5 kb große DNA, welche positiv überspiralisiert vorliegt (Palm *et al.*, 1991). Wird *Sulfolobus solfataricus* mit dem Virus SSV1 infiziert, kommt es zu einer Integration der Virus DNA in das Chromosom. Zusätzlich liegt die DNA ebenso als Plasmid mit 3 – 4 Kopien per Zelle vor. Nach UV-Bestrahlung des Wirts wird SSV1 stark vermehrt, jedoch lysiert das Virus die Wirtszellen nicht. Das SSV1-Genom wurde vollständig sequenziert und zeigt eine chronologische Regulierung der Transkription nach einer UV-Exposition (Fröls *et al.*, 2007). Diese Regulierung erinnert stark an die von vielen bakteriellen und eukaryontischen Viren und unterscheidet sich enorm vom *Sulfolobus* Virus SIRV, mit einem eher einfachen chronologischen Transkriptionsbild (Kessler *et al.*, 2004). Für SIRV wurde auch kürzlich ein Transkriptionsregulator SvtR isoliert, und mittels einem *in vitro* Transkriptionssystem konnte eine negative Transkription für den eigenen Promotor nachgewiesen werden (Guillière *et al.*, 2009).

Nach der UV-Bestrahlung des Wirts *S. solfataricus* wird als erstes das „sehr frühe“ UV-induzierbare Transkript  $T_{ind}$  exprimiert. Die folgenden Transkripte können je nach Zeitpunkt der Transkription in frühe (T5, T6 T9) und späte (T1/2, T3, Tx und T4/7/8) Transkripte kategorisiert werden. Es kommt es zu einer starken Induktion der viralen

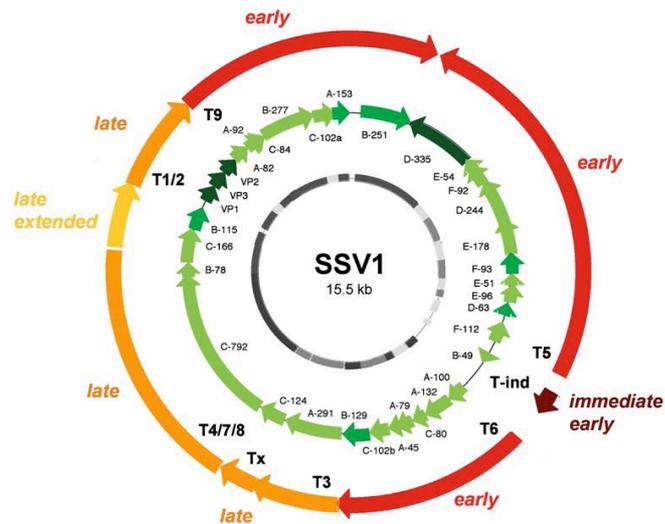
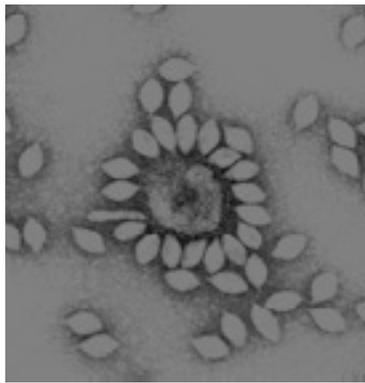


Abb. 1) Das *Sulfolobus shibatae* Virus 1, Elektronenmikroskopische Aufnahme der Viruspartikel um Zellvesikel (Quelle Bild: Zillig, W.), rechts daneben eine Zusammenfassung der Mikroarray-Studie und Transkript Mapping-Analyse (Fröls *et al.*, 2007), Der äußerste Kreis zeigt die Zeitpunkte der SSV1-Transkripte nach UV-Bestrahlung. In den verschiedenen Grüntönen sichtbar die Transkripte, dunkelgrün Gene mit bekannter Funktion, grün predicted Funktion, hellgrün Gene mit unbekannter Funktion. Der graue Kreis zeigt die Konservierung der Gene in den 4 SSV Typen

DNA-Replikation und große Mengen von Virus-Partikeln werden in das Kultivierungsmedium freigegeben. Insgesamt konnten 10 Transkripte mit verschiedener Länge mit 7 verschiedenen Promotoren kartiert werden, sowie 34 ORFs (open reading frames), wobei nur für 4 Gene die Funktion bestimmt werden konnte (Fröls *et al.*, 2007; Muskhelishvili *et al.*, 1993). Die Integration der Virus-DNA in das Wirtsgenom geschieht durch die Integrase über eine sequenzspezifische Rekombination der attP-Sequenzen („attachement core“) mit einem Arginyl-tRNA-Gen von *S. solfataricus* (Schleper *et al.*, 1992).

Basierend auf dem Virus SSV1 konnte vor wenigen Jahren der stabile und selektive *shuttle*-Vektor pMJ0305 entwickelt werden (Jonuscheit *et al.*, 2003). Die Abbildung 2) zeigt den Transformationsvektor mit den verschiedenen Bereichen wie der attachment site für die Integration in das Wirtsgenom, den Genen *pyrEF* für die Schlüsselenzyme der Pyrimidinbiosynthese zur Selektion, dem Reporter gen der  $\beta$ -Galaktosidase *lacS* unter der Kontrolle des stark durch Hitze induzierbaren Promotors TF55 und der pUC18 Region zur autonomen Replikation in *E.coli* (Jonuscheit *et al.*, 2003). Durch dieses Transformationssystem mit einem Reporter gen wurde es erstmals möglich *in vivo* Promotorstudien in einem hyperthermophilen *Archaeon* durchzuführen.

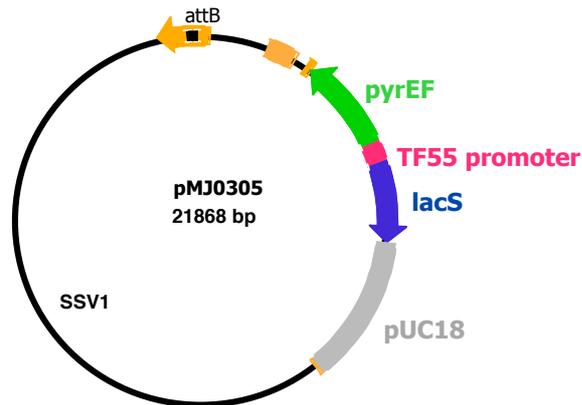


Abb. 2) Darstellung des Transformationsvektors pMJ0305. Der 21 kb große Vektor besteht aus den *pyrEF* Genen als Selektionsmarker, dem Reporter gen *lacS* mit dem Promotor TF55 und der pUC18 Region zur autonomen Replikation.

### **1.5 Generelle Reaktion von *S. solfataricus* auf UV-Bestrahlung**

Bestrahlt man *S. solfataricus* mit einer UV-Dosis von  $75 \text{ J/m}^2$  für so zeigt sich eine Wachstumsverzögerung, die sich ca. 1,5 bis 2 h nach UV-Bestrahlung einstellt. Dies ist auf eine Beschädigung der Zellen oder auf den Effekt des Zellsterbens zurückzuführen. Vergleicht man eine UV-bestrahlte Kultur über die Zeit, erkennt man den Unterschied zur Kontrollkultur, welche ein schnelleres und höheres Wachstum aufweist (Fröls *et al.*, 2007).

Weiters konnten im Zuge einer Microarray-Studie nach einer UV-Exposition 55 Gene identifiziert werden, dessen Transkriptmengen sich deutlich änderten (ein Teil davon in Tabelle 1 dargestellt). Weniger als 30 Gene davon schienen nach UV-Behandlung stark hochreguliert zu werden, wobei 2 davon, SSO0691 und das erste Transkript des Virus SSV1, von mir in meiner Diplomarbeit auf wichtige Regionen im UV-induzierbaren Promotor analysiert wurden. Diese beiden Gene finden sich in der Tabelle 1) in der Gruppe der am höchsten induzierten Gene (in gelb markiert) wieder. Der erste Mechanismus, der nach UV-Bestrahlung aktiviert wird, ist die Photoreaktivierung, bei der die licht-abhängige direkte Reversion des UV-Produkts (CPDs: cis-syn-Cyklobutan Pyrimidin Dimere) in DNA durch die Photolyase vermittelt wird.

Noch konnte nicht geklärt werden, ob es in *Archaea* etwas Ähnliches wie NER (nucleotid excision repair) gibt, welche die Photoprodukte der DNA entfernt. Als sekundärer Effekt traten Doppelstrangbrüche in der DNA von *S. solfataricus* nach

| UV-responsive genes in <i>Sulfolobus solfataricus</i> |   |   |                    |          |                     |   |  |     |
|---|---|---|--------------------|----------|---------------------|---|--|-----|
| Group <sup>a</sup>                                    | P | S | Gene ID            | COG      | Operon <sup>b</sup> | Predicted function  | Homol og <sup>c</sup>  |     |
| Ia  |   |   | SSO0691            |          |                     | conserved hypothetical membrane protein, 7 TMD, N-terminal signal peptide | C  |     |
|   |   |   | SSO0280            | COG1405K |                     | conserved hypothetical, potential transcription factor                    | C  |     |
|   |   |   | SSO3146            |          |                     | conserved hypothetical membrane protein, 7 TMD, N-terminal signal peptide | C  |     |
|   |   |   | SSO1501            |          |                     | conserved hypothetical, (AAA <sup>+</sup> ATPase)                         | C  |     |
|   |   |   | <i>cdc6-2</i>      | SSO0771  | COG1474LO           | 1 (1/3)   | cell division control protein, same operon order in <i>S. acidob.</i> and <i>S. tokodaii</i> | AE  |
|   |   |   | <i>c54_n0003_1</i> |          |                     | 2 (1/2)   | conserved hypothetical   | CV  |
|   |   |   | <i>gspE-1</i>      | SSO0120  | COG0630NU           | 3 (2/5)   | putative ATPase of type III/IV secretory pathway   | ABE |
|   |   |   |                    | SSO0152  | COG0433R            |   | conserved hypothetical, (virD4 like ATPase)  | S   |
|   |   |   |                    | SSO2338  |                     |   | conserved hypothetical membrane protein, 5 TMD   | S   |
|   |   |   | <i>dpo2 AT</i>     | SSO8124  |                     | 4 (1/3)   | DNA polymerase B2 amino-end, same operon order in <i>S. acidob.</i> and <i>S. tokodaii</i>   | S   |
|   |   |   |                    | SSO0283  | COG0433R            |   | conserved hypothetical probable ATPase, N-terminal signal peptided                           | AB  |
|   |   |   |                    | SSO0117  |                     | 3 (5/5)   | conserved hypothetical, with pilin-like signal peptide                                       | A   |
|   |   |   |                    | SSO0118  |                     | 3 (4/5)   | conserved hypothetical, with pilin-like signal peptide                                       | C   |
|   |   |   |                    | SSO1053  |                     |   | conserved hypothetical, N-terminal signal peptide  | C   |
|   |   |   |                    | SSO0037  |                     |   | conserved hypothetical, N-terminal signal peptide  | C   |
|   |   |   |                    | SSO2395  |                     |   | conserved hypothetical   | S   |
|   |   |   |                    | SSO1458  |                     | 4 (3/3)   | conserved hypothetical   | S   |
|   |   |   | <i>dpo2 CT</i>     | SSO1459  | COG0417L            | 4 (2/3)   | DNA polymerase B2 carboxy-end  | S   |
|   |   |   | <i>insB</i>        | SSO1436  | COG1662L            |   | Transposase and inactivated derivatives, IS1 family  | AB  |
|   |   |   |                    | SSO1654  |                     |   |  |     |
|   |   |   | SSO2320            |          |                     |   |  |     |
|   |   |   | SSO2950            |          |                     |   |  |     |
|   |   |   | SSV1_027           |          |                     | immediate early transcript T-ind. of SSV1                                 |  |     |

Tabelle 1) Übersicht der Ergebnisse der Microarray-Analyse zur Untersuchung der transkriptionellen Reaktion von *Sulfolobus solfataricus* auf UV-Bestrahlung. Hier die Tabelle Ia mit den am höchsten induzierten Genen nach UV-Bestrahlung (aus Fröls *et al.*, 2007). In gelb hervorgehoben die UV-induzierbaren Gene SSO0691 und das erste Transkript des Virus SSV1, mit denen in meiner Diplomarbeit Promotorstudien durchgeführt wurden.

UV-Bestrahlung auf, die bis zu 8 Stunden bemerkbar waren (Fröls *et al.*, 2009). Eine Vermutung für die Reparatur der Doppelstrangbrüche ist, dass diese via homologer Rekombination nach einer erfolgten Konjugation korrigiert werden können. Dennoch konnten keine Gene, die für eine direkte Reparatur von DNA-Schäden zuständig sind, durch die Microarray-Studie induziert vorgefunden werden. Dies ist ein Hinweis dafür, dass es in *Archaea* kein typisches SOS-System wie in *E.coli* gibt (Fröls *et al.*, 2009).

Weiters konnten auch zelluläre Aggregate als Reaktion auf UV-Bestrahlung festgestellt werden. Diese zeigen ein Maximum bei 6-8 h und sind stark UV-Dosis abhängig. Eines der am stärksten hoch-regulierten Gene in der Microarray-Studie war ein Pili-Biogenese Operon (ups: UV-inducible pili operon for *Sulfolobus*). Tatsächlich konnte man bei genauerer Betrachtung mittels Elektronenmikroskopie der behandelten Zellen Pili beobachten (Fröls *et al.*, 2008). Daraus entwickelte sich die Hypothese, dass die Pili-Formation und die sofortige Zell-Aggregation den DNA-Transfer zwischen *Sulfolobus* Zellen steigert, um eine höhere Reparatur von beschädigter DNA über homologe Rekombination zu bewerkstelligen (Fröls *et al.*, 2008).

## 1.6 Transkriptionsstudien von UV-induzierten Genen nach Bestrahlung

Eine wichtige Basis für mich war die Arbeit von Daniela Teichmann, die sich unter anderem mit der Analyse der UV-spezifischen transkriptionellen Reaktion des Gens SSO0691, und dem ersten gebildeten Transkript  $T_{ind}$  nach UV-Bestrahlung des Virus SSV1 beschäftigte. In ihrer Diplomarbeit wurde unter anderem der Transkriptionsstartpunkt des Gens SSO0691 mittels einer Primer-Extensions-Reaktion bestimmt und für  $T_{ind}$  wurde der Transkriptionsstartpunkt von Reiter *et al.* (1988) charakterisiert. Für das Gen SSO0691 wurde der Transkriptionsstart 188 nt stromaufwärts des Translationsstarts identifiziert, was eine außergewöhnlich große Distanz bedeuten würde. Deswegen wurden anschließend bioinformatische Analysen durchgeführt, und es stellte sich heraus, dass direkt stromauf dieses Gens ein kleinerer ORF, benannt SSO0691a, positioniert ist.

In weiterer Folge Ihrer Arbeit wurden von beiden Promotorregionen verschiedene lange Konstrukte hergestellt. Für  $T_{ind}$  erfolgte mittels einer PCR ein Kürzung des Promotors von 141 bp auf 70 bp, und im Falle von SSO0691a von 172 bp auf 79 bp (Abbildung 3). Weiters wurden diese gekürzten Promotorkonstrukte in den *shuttle* Vektor pMJ0305 kloniert.



Abb.3) Bereiche der Wildtyppromotoren von  $T_{ind}$  und SSO0691a. Der rote Pfeil markiert den im Fall von  $T_{ind}$  bereits vorher bekannten und im Fall von SSO0691 den von Daniela Teichmann bestimmten Transkriptionsstart. Bei SSO0691a ist in gelb das eingeleuchtet, grau die „BRE-Elemente“, violett die „TATA-Boxen“, grün der 5'UTR-Bereich. Sequenzen dargestellt in 5'-3' Richtung.

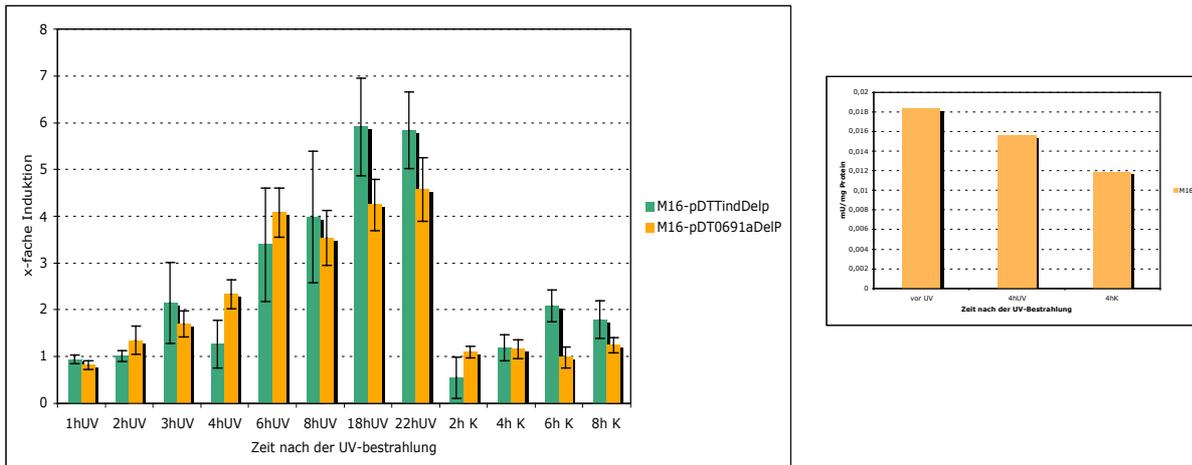


Abb. 4) Aktivitätsmessungen der  $\beta$ -Galaktosidase der Einzelkolonien und der Kontrolle M16. Jeweils gegenübergestellt die UV-bestrahlte und die Kontrollkultur von M16-pDTTind-Delp und M16-pDT0691a-Delp.

Anschließend wurden die Einzeltransformanten auf die spezifische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase der Promotorregionen der Gene  $T_{ind}$  und SSO0691a vermessen. Wie in der Abbildung 4) ersichtlich ist, zeigen beide Promotoren der Einzeltransformanten eine zunehmende Aktivität des  $\beta$ -Galaktosidase. In grün dargestellt M16-pDTTind-Delp mit einem 70 nt - langen Promotor und der höchsten Aktivität bei 18 h und einer 7x-fachen Induktion nach UV-Bestrahlung. Nach dem Erreichen des höchsten Wertes nach der UV-Bestrahlung über die Zeit sank diese spezifische Aktivität wieder ab. In orange dargestellt die 5-fache Induktion von M16-pDT0691a-Delp, mit einer Promotorlänge von 79 nt. Auch hier zeigt sich ein ähnliches Bild der Induktion. Diese ist nicht so hoch wie bei  $T_{ind}$ , dennoch ist ein kontinuierliches Ansteigen der Transkriptmenge bis zu einem fast 6fachen Wert deutlich erkennbar. Rechts davon dargestellt die Kontrolle der Einzeltransformanten, wodurch eine gleich bleibende Grundaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase messbar, und vergleichbar mit den Werten vor der UV-Bestrahlung ist. Die Negativkontrolle M16 ist ebenfalls mit und ohne UV-Bestrahlung dargestellt, und zeigt keine spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da in der Mutante M16 das Reporterogen *lacS* zwar vorhanden, jedoch durch ein Insertionselement unterbrochen und somit inaktiv ist. Dadurch kann M16 keine funktionelle  $\beta$ -Galaktosidase produzieren. Somit war auch bewiesen, dass die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach der UV-Bestrahlung auf die Transformierung durch die Plasmide mit den induzierbaren Promotoren zurückzuführen war.

## **1.6 Ziel der Diplomarbeit**

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollten die Promotoren der stark UV-induzierten Gene der Microarray-Analyse Gruppe Ia SSO0691 und  $T_{ind}$  von *Sulfolobus solfataricus* analysiert werden. Ausgehend von einer zuvor durchgeführten Promotoranalyse sollten durch Deletionen weiterer Regionen potenzielle *cis*-regulatorische Elemente identifiziert werden, die für die UV-abhängige Transkriptionsregulation wichtig sind. Hierzu sollte das Reportersystem eingesetzt werden mit dem es möglich ist, Promotoraktivitäten *in vivo* in *S. solfataricus* zu messen und zu quantifizieren. Die Charakterisierung *cis*-regulatorischer Elemente sollte als Voraussetzung für eine spätere Identifizierung von Transkriptionsregulatoren in *S. solfataricus* dienen.

## **2. Material**

### **2.1 Kultivierungsmedien, Puffer und Lösungen**

#### **2.1.1 Medien**

##### **- Luria Bertani (LB) Medium für *E.coli* (pro Liter)**

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

für Festmedium: Agar 15 g/l

Antibiotika: Ampicillin 100 mg/l, 50 mg/l

Kanamycin 50 mg/l

Blau/Weiß-Selektion: X-Gal 40 mg/l

##### **- SOB-Medium (Hanahan, 1983) für *E.coli***

2 % (w/v) Bacto Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

10 mM NaCl

1,5 mM KCl

##### **- SOC-Medium, für *E.coli***

SOB-Medium mit 20 mM Glucose und 20 mM Mg<sup>2+</sup>

##### **- Brock's Basalsalzmedium, für *Sulfolobus solfataricus* (alle Angaben pro Liter)**

###### **100x Teilmedium**

130 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

25 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

2 g FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

200x Teilmedium

56 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
360 mg  $\text{MnCl}_2$   
44 mg  $\text{ZnSO}_4$   
10 mg  $\text{CuCl}_2$   
6 mg  $\text{VO}_2\text{SO}_4$   
6 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$   
0,9 mg  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$

1000x Teilmedium

70 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  zusätzlich für Festmedien: 6,4 g Gelrite  
3 ml 0,5 M  $\text{CaCl}_2$   
5 ml 5 M  $\text{MgCl}_2$

C-Quellen (w/v)

0,2 % Saccharose und 0,1 % Hefeextrakt (SY) oder  
0,2 % D-Arabinose und 0,1 % Trypton (AT)  
pH 3-3,5 mit ca. 350  $\mu\text{l}$  50 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  einstellen

**2.1.2 Puffer und Lösungen****- TAE-Puffer (Trisacetat-Puffer)**

40 mM Tris  
20 mM Eisessig pH 8,2-8,4  
2 mM EDTA

**- TE-Puffer**

20 mM Tris/HCl pH 7,5  
1 mM EDTA

**- DNA/RNA-Auftragspuffer:**

50 % (w/v) Saccharose  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
0,1 M EDTA pH 8

### **2.1.2.1 Puffer für Gesamt-DNA-Isolierung von *Sulfolobus solfatari-* *CUS***

#### **- TEN-Puffer**

20 mM Tris-HCl pH 8

1 mM EDTA

100 mM NaCl

#### **- TENST-Puffer**

TEN-Puffer + 1,6 % (w/v) Natrium-N-Laurylsarcosin

0,12 % (w/v) Triton X-100

### **2.1.2.2 Puffer für Northern Analysen**

Die Gesamt-RNA wurde mittels des mirVana Isolation Kit der Firma Applied Biosystems isoliert und anschließend in RNase-freiem DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert.

#### **- 10x MOPS Laufpuffer**

41,8 g MOPS in 800 ml DEPC H<sub>2</sub>O lösen

einstellen eines pH 7 mit NaOH (=200 mM MOPS)

+ 16,6 ml 3 M DEPC-behandeltes Na-Acetat

+ 20 ml 0,5 M DEPC-behandeltes EDTA pH 8

- auf 1000 ml mit DEPC-H<sub>2</sub>O auffüllen und steril filtrieren

#### **- 10x RNA Gelpuffer**

10x MOPS Laufpuffer, pH 8 – mit NaOH Plättchen einstellen

#### **- RNA-Mix**

250 µl Formamid

83 µl 37 % Formaldehyd

50 µl Gelpuffer pH 8

50 µl DNA/RNA Auftragspuffer

#### **- 20x SSC**

3 M NaCl

0,3 M Natriumacetat pH 7

### **Färbelösung:**

#### **- Methyleneblau-Lösung**

0,04 % (w/v) Methyleneblau in 0,5 M Natriumacetat pH 5,5

#### **- Hybridisierungspuffer**

50 % Formamid

1 % (w/v) SDS

10 % (w/v) Dextransulfat

1 x SSPE

0,5 % (w/v) Magermilchpulver

#### **- SSPE**

3M NaCl

0,2 M  $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P}$

0,02 M EDTA

- in ca. 800 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  lösen

- auf 1 l auffüllen und autoklavieren

#### **- DIG-Waschpuffer**

0,3 % (v/v) Tween 20 in Puffer 1

#### **- Puffer zum Entfernen von DIG-Sonden**

0,2 M NaOH / 0,1 % SDS

#### **- Puffer 1**

0,1 M Maleinsäure

0,15 M NaCl pH 7,5 mit fester NaOH einstellen

#### **- Puffer 2**

Puffer 1 + 1 % Blockierungsreagenz

**- Puffer 3**

100 mM Tris/HCl  
100 mM NaCl  
50 mM MgCl<sub>2</sub> pH 9,5

**- CSPD-Lösung**

CSPD 1:100 in Puffer 3

**- Ethidiumbromid stock Lösung**

10 mg/ml Ethidiumbromid in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**Lösungen für Proteinanalysen:**

**- Puffer für β-Galaktosidase (*lacS*) Aktivitätstests**

10 mM TRIS-HCl pH 8  
50 mM NaPO<sub>4</sub>-Puffer  
2,8 mM ONPG in 50 mM NaPO<sub>4</sub>-Puffer

**- Bradford-Reagenz**

0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G 250  
4,75 % (v/v) Ethanol  
8,5 % (v/v) Phosphorsäure

**2.2 Chemikalien und Hilfsmittel**

| <b>Chemikalien</b>                        | <b>Hersteller</b>   |
|---|---|
| Acillit pH-Streifen                       | Merck, Darmstadt  |
| Agarose (SeaKern ME)                      | FMC / Biozym, Oldendorf                                   |
| Ampicillin                                | Roche Diagnostics, Mannheim                               |
| Bacto-Agar, -Trypton, - Hefeextrakt       | Difico, Detroit CSPD Bio Trace™                           |
| Biodyne A Nylonmembran<br>(CSPD-Substanz) | Pall Gelman GmbH, Dreieich<br>Roche Diagnostics, Mannheim |
| Blocking Reagent                          | Roche Diagnostics, Mannheim                               |
| BSA                                       | MBI Fermentas   |

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| D-Arabinose                                    | Fluka, Biochemika              |
| DEPC   | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| DMSO   | MBI Fermentas                  |
| DIG dNTP Labelling Mix                         | Roche Diagnostics, Mannheim    |
| dNTPs  | MBI Fermentas                  |
| N-Dimethylformamid                             | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| Ethanol  | AppliChem, Darmstadt           |
| Ethidiumbromid                                 | AppliChem, Darmstadt           |
| Formaldehyd                                    | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| Formamid                                       | Sigma-Aldrich, USA             |
| Glycerin                                       | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| Gellan Gum (Gelrite)                           | Kelco, San Diego               |
| Glykogen                                       | MBI Fermentas                  |
| Guanidiniumthiocyanat (GTC)                    | Labor-Service GmbH, Darmstadt  |
| Mini-Elute™ PCR Purification Kit               | Qiagen, Hilden                 |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                     | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| O-Phosphorsäure                                | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| ONPG   | Serva, Heidelberg              |
| Natrium-N-Laurylsarcosin                       | Serva, Heidelberg              |
| Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol               | Sigma-Aldrich, USA             |
| Polyklonale DIG-ANTI Schafsantikörper          | Roche Diagnostics, Mannheim    |
| QiaprepR™ Spin-Miniprep-Kit                    | Qiagen, Hilden                 |
| Rundfilter (Porengröße 0,025 µm)               | Millipore                      |
| Röntgenfilme (Single Emulsion Film, Biomax MR) | Kodak, Rochester               |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris)       | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| Triton X-100                                   | Sigma, St. Louis               |
| Trypton  | Difco, Detroit                 |
| Tween-20                                       | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe |
| Uracil   | Serva, Heidelberg              |
| Whatman-Papier                                 | Machery & Nagel                |
| X-Gal  | AppliChem, Darmstadt           |

Alle hier nicht angeführten Chemikalien und Hilfsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen:

- AppliChem
- Boehringer Ingelheim
- LS-Labors
- Merck
- Roche Diagnostics
- Roth
- Sigma
- und Serva.

### **2.3 Größenstandards**

#### **DNA**

- Gene Ruler™ DNA Ladder Mix #SM0331
- Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Ladder Mix #SM1331
- Lambda DNA/EcoRI + HindII Marker 3#SM0191

#### **RNA**

- RiboRuler™ High Range RNA Ladder, 200-6000 bases #SM1821

### **2.4 Enzyme**

|   |               |
|---|---------------|
| - Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)     | MBI Fermentas |
| - Long PCR Enzyme Mix                             | MBI Fermentas |
| - Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase | Finnzymes     |
| - Pfu-DNA Polymerase                              | MBI Fermentas |
| - RNase   | MBI Fermentas |
| - Taq-DNA-Polymerase                              | Invitrogen    |
| - GoTaq® DNA polymerase                           | Promega       |

|                                 |                                    |
|---------------------------------|------------------------------------|
| - Restriktionsendonukleasen     | MBI Fermentas; New England Biolabs |
| - T4-DNA-Ligase                 | New England Biolabs                |
| - T4-Polynukleotid Kinase       | MBI Fermentas                      |
| - Alkalische Shrimp Phosphatase | USB                                |
|                                 |                                    |

## **2.5 Mikroorganismen**

- *Sulfolobus solfataricus* M16 (Martusewitsch et al. ,2002)
  
- *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, USA)

## **2.6 Vektoren**

- pSVA11 (S.V. Albers)
- pMJ0305 (Jonuscheit et al. ,2003)

## **2.7 Kits**

- Qiagen PCR Purification Kit
- QIAprep Spin Miniprep Kit
- E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep
- mirVana™ miRNA Isolation Kit

## **2.8 Synthetische Oligonukleotide**

Alle verwendeten Oligonukleotide für PCR-Amplifikationen bzw. Sequenzierreaktionen wurden bei Thermo bestellt. Diese war in getrocknetem Zustand und wurden deshalb anschließend in HPLC-Wasser eluiert um eine 100 mM Lösung zu erhalten. Anschließend wurden sie bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.8.1 Primer für die SLIM - Mutagenese PCR

In Tabelle 1), 2) und 3) 4 verschiedene und unterschiedlich lange Primer wurden für die verschiedenen Deletionen für die SLIM PCR für die Promotoren der Gene SSO0691a und Tind entworfen – 2 Genspezifische, und 2 Oligonukleotide mit einem 18 nt Überhang. Angegeben sind die Sequenzen in 5'-3' Richtung.

Tabelle 1)

| <b>Name</b>          | <b>Oligonukleotidsequenz (5'-3')</b>            |
|----------------------|---|
| TindDel_atg_tail_fwd | TCTTATACAAAAAATATGGACTCATTTCCTCAA-<br>TAGCTTTAG |
| TindDel_atg_fwd:     | GACTCATTTCCTCAAATAGCTTTAGG                      |
| Tind_atg_tail_rev:   | CATATTTTTTTGTATAAGATACATAAGATACACA-<br>GAGTCGAC |
| Tind_atg_rev:        | TACATAAGATACACAGAGTCGAC                         |

Tabelle 2)

| <b>Name</b>          | <b>Oligonukleotidsequenz (5'-3')</b>              |
|----------------------|---|
| SSO0691_bre_tail_fwd | GCAGCATTATTCCCTAGGACATAACTCTCAGCCAT-<br>TAAAAGAAA |
| SSO0691_bre_fwd      | ACATAACTCTCAGCCATTAAAAGAAA                        |
| SSO0691_bre_tail_rev | CCTAGGGAATAATGCTGCCCATCAAACCTTATGTCT-<br>CATTACAA |
| SSO0691_bre_rev      | CCCATCAAACCTTATGTCTCATTACAA                       |

Tabelle 3)

| <b>Name</b>           | <b>Oligonukleotidsequenz (5'-3')</b>           |
|-----------------------|--|
| SSO0691_fwd_catg_tail | TTAAAAGAAAAAATATCATGGACTCATTTCCTCAA-<br>TAGCTT |
| SSO0691_fwd_catg      | ATGGACTCATTTCCTCAAATAGCTT                      |
| SSO0691_catg_tail_rev | GATATTTTTTTCTTTTAATGGCTGAGAGTTATGTGA-<br>AACT  |
| SSO0691_catg_rev      | TGGCTGAGAGTTATGTGAAACT                         |

### 2.8.2 Primer für *lacS*-PCR

Tabelle 4) Die zur Kontrolle auf die erfolgreiche Transformation entworfenen Primer für *Sulfolobus solfataricus* M16. Die Sequenzen sind in 5'-3' Richtung angegeben.

| <b>Name</b> | <b>Oligonukleotidsequenz (5'-3')</b> |
|-------------|--------------------------------------|
| lacS_fwd:   | CATGTA <del>CT</del> CATTTCCAAATAG   |
| lacS_rev:   | TACGCTATTTAAGTGCTCTATT               |

### 3.8.3 Primer für Multiplex-PCR

Tabelle 5) Die zur Kontrolle auf die erfolgreiche Transformation entworfenen Primer für *Sulfolobus solfataricus* M16. Die Sequenzen sind in 5'-3' Richtung angegeben.

| <b>Name</b> | <b>Oligonukleotidsequenz (5'-3')</b> |
|-------------|--------------------------------------|
| LeATFw      | CTTCTCGAGCTAAGAGTGCAACC              |
| LeATRw      | ATAAGCCCGTTTTGGCAACCA                |
| RATRw       | ATATCGGGGTGTAGAACGCA                 |
| RATFw       | GTAGAACGCCTTTATGTTGCCGTC             |

### 3.8.4 Primer für Northern-Blot-Analysen

Tabelle 6) Die für diese Arbeit verwendete DIG-markierte dS-DNA-Sonde von *lacS* für die Northern-Blot-Analyse der Promotorregion SSO0691aDelp2. Die Sequenzen sind in 5'-3' Richtung angegeben.

| <b>Name</b> | <b>Oligonukleotidsequenz (5'-3')</b> |
|-------------|--------------------------------------|
| lacS_fwd:   | CATGTA <del>CT</del> CATTTCCAAATAG   |
| lacS_rev:   | TACGCTATTTAAGTGCTCTATT               |

### 3.8.5 Primer für die Sequenzierung der Vektoren

Tabelle 7) Die für die Sequenzierreaktion verwendeten Primer zur auf die durchgeführten Deletionen (pSVA11-pKLTind-Delp1, pSVA11-pKL0691a-Delp1, pSVA11-pKL0691a-Delp2, pMJ0305-pKLTind-Delp1, pMJ0305-pKL0691a-Delp1 und pMJ0305-pKL0691a-Delp2). Die Sequenzen sind in 5'-3' Richtung dargestellt.

| <b>Name</b> | <b>Oligonukleotidsequenz (5'-3')</b> |
|-------------|--------------------------------------|
| pyrEF_fwd   | AGGATTTGCATCCGAGGAGTCTAC             |

### **3. Methoden**

#### **3.1 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit, genau definierte Gene bzw. Gen-Abschnitte spezifisch zu amplifizieren. Für die gewöhnliche PCR werden 2 Primer für die gewünschte, zu vervielfältigende DNA-Sequenz entworfen. Als Matrize diente entweder chromosomale DNA der Mutante *Sulfolobus solfataricus* M16, beziehungsweise die DNA des Transformationsvektors pMJ0305, oder des Vorvektors pSVA11. Für die Amplifikation der chromosomalen DNA wurden pro Ansatz ca. 100 ng/μl eingesetzt und für Plasmid-DNA ca. 10-20 ng/μl. Weiters wird folgendes für einen 25 μl oder einen 50 μl PCR-Reaktionsansatz mit der Taq- oder Taq-Pfu Polymerase verwendet:

- 1x Taq- Polymerase Puffer (Puffer, die für die DNA-Polymerase die geeignete chemische Bedingung garantieren)
- 0,2 mM dNTP's
- 2 mM MgCl<sub>2</sub>
- 10-25 pmol synthetische Oligonukleotide
- 2 U Taq- Polymerase
- mit H<sub>2</sub>O bidest auf 25 μl oder auf 50 μl auffüllen.

Der PCR-Ablauf bestand aus einer Anzahl von 30-35 Zyklen. Das typische PCR-Programm besteht aus einem 1-2 minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C. Dieser Schritt bewirkt die Trennung der doppelsträngigen DNA in die Einzelstränge. Die Temperatur der anschließenden Hybridisierung der Oligonukleotide an die DNA-Matrize ist abhängig von ihrem jeweiligen GC-Gehalt und wird mit 2 Grad pro A/T-Nukleotid und je 4 Grad pro G/C-Nukleotid berechnet. Dies sichert eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge. Die Verlängerung der Oligonukleotide durch die Polymerase erfolgt bei 72°C und dauerte für 900-1000 nt ca. eine Minute. Im finalen Schritt kommt es zur vollständigen Elongation der sich noch in Synthese befindlichen DNA-Fragmente, wobei die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der Polymerase erhöht wird um eine optimale Zweitstrangsynthese zu erlauben (72°C

für 10 Minuten). Nach der durchgeführten PCR wurden erhaltene DNA-Fragmente auf ihre Größe mittels der Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

### **3.2. SLIM-PCR (Zielgerichtete – Ligase-unabhängige Mutagenese)**

Diese Spezialform der Polymerase-Kettenreaktion wurde verwendet, um mit einer Reaktion in größeren Vektoren (über 8 kb) Insertionen, Deletionen oder Substitutionen einzuführen (Chiu *et al.*, 2008). Für die Amplifikation wurden 4 spezifische Primer entworfen, 2 Gen-spezifische Primer und 2 Primer mit einem 18 nt Überhang. Die Primer wurden so geplant, dass die Sequenz des forward- und revers-Primers mit 18 nt Überhang die gleiche ist, wie die des forward- und revers-spezifischem Oligonukleotids. Ein großer Unterschied zur gewöhnlichen PCR ist, dass die Reaktion in 2 PCR-Ansätzen durchgeführt wird, jeweils in Kombination mit einem Primer mit Überhang plus einem spezifischen Primer. Dadurch erhält man für jede der beiden Reaktionen jeweils am 5'-Ende das 18 nt lange Überhangsstück in zwei getrennten Reaktionsgefäßen.

Ein 50 µl oder 25 µl PCR-Ansatz hat so ausgesehen:

| Reaktion I:   | Reaktion II:   |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- ca. 15 ng/µl DNA</li> <li>- 10-25 pmol Oligonukleotide</li> <li>- 10x long range PCR-Puffer (+MgCl<sub>2</sub>)<br/>(bereits mit 15 mM MgCl<sub>2</sub>)</li> <li>- 0,25 mM dNTP`s</li> <li>- 1-2 µl DMSO</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 10x long range PRC-Puffer</li> <li>- ca. 2 U long range enzyme mix</li> </ul> |
| - mit H <sub>2</sub> O bidest auf 25 µl oder 50 µl auffüllen  |  |

Das dazugehörige PCR—Programm im Thermocycler sah z. B. folgendermaßen aus:

- 94°C 3 Minuten → hot start, d. h. nach den 3 Minuten wurde die Reaktion II zur Reaktion I pipettiert

- 94°C 2 Minuten

- 94°C 15 Sekunden

- 58°C 30 Sekunden

- 68°C z.B. 15 Minuten oder 5,25 Minuten

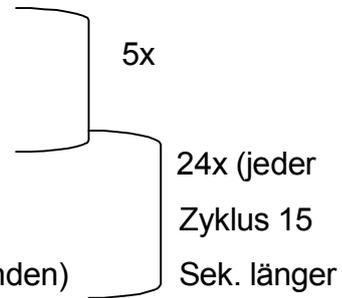
- 94°C 15 Sekunde

- 58°C 30 Sekunden

- 68°C z. B. 15 Minuten oder 5,25 Minuten (xkb x 45 Sekunden)

- 68°C 10 Minuten

- 4°C Pause



Nach der Amplifikation wurde das PCR-Produkt auf einem 1%igen mit Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel kontrolliert und mittels einer Phenol-Chloroform Extraktion aufgereinigt. Es folgte eine halbstündige Inkubation mit dem Enzym DpnI bei 37°C um die Plasmid-DNA von meiner amplifizierten, veränderten DNA zu trennen. DpnI hydrolysiert die Ausgangs-DNA, die methyliert ist, d.h. die amplifizierte DNA wird nicht zerschnitten, da diese unmethyliert ist.

Anschließend werden die beiden Reaktionen im Verhältnis 1:1 gemischt, denaturiert und hybridisiert:

- 99°C 3 Minuten

Denaturierung

- 65°C 5 Minuten

2x Hybridisierung

- 30°C 15 Minuten

Der nächste Schritt ist die Hybridisierung der 2 PCR-Produkte. Dabei formen sich Heteroduplexes durch das Binden der 5'-Überhänge an den entgegengesetzten Enden. Durch dieses Finden der komplementären Überhänge kann das Plasmid ohne das Enzym T4 DNA-Ligase ligieren und von selber von der linearen in die zirkuläre Form übergehen. Wichtig für das Religieren des Vektors ist das 5'-Phosphat der freien DNA-Enden, das entweder durch eine Phosphorylierung der Primer oder nach der Amplifikation der DNA-Fragmente über die PCR hergestellt wird.

### **3.3 Phosphorylierung der Primer**

Um eine selbständige Religierung der Vektoren zu ermöglichen, wurden 100 pmol Primer mit der T4-Polynukleotid Kinase phosphoryliert. Das Enzym transferiert die Phosphatgruppe des ATP auf den 5'-Hydroxyl Terminus der DNA.. Diese Reaktion findet mit einem 10x T4 Polynukleotid Kinase Puffer bei 37°C in einem Ansatz von ca. 20 µl für eine Stunde statt.

24x (jeder Zyklus noch 15 Sekunden länger)

### **3.4 Agarosegelelektrophorese**

Um verschieden große DNA-Fragmente voneinander zu trennen und zu identifizieren, wird die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Diese Methode dient zur Größenbestimmung und kann für Fragmente verschiedenster Länge von 0,5 kb bis ca. 30 kb eingesetzt werden. Abhängig von der DNA-Fragmentgröße wurde eine unterschiedliche Agarosekonzentration in der Mikrowelle mit 1x TAE- Gelpuffer aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurde die geschmolzene Agarose mit ein paar Tropfen Ethidiumbromid versetzt, in einen Gelschlitten gegossen, und mit Hilfe eines Kammes wurden Kammern geformt. Auf das erstarrte und ausgekühlte Agarosegel kam 0,5x TAE-Laufpuffer, bis das Gel bedeckt war. Dann wurden die mit 1:6 Auftragspuffer versetzten PCR- Produkte in die Taschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein Größenstandard mitgeführt, welcher zur Identifizierung der DNA-Fragmentlänge diente. Eine elektrische Spannung zwischen 80 - 120 Volt wurde angelegt, und die DNA lief durch das Gel. Da die DNA negativ geladen ist, wandert sie zum positiven Pol. Je nach Größe der Fragmente migrieren sie schneller oder weniger schnell zur Kathode. Letztendlich betrachtet und fotografiert man das fertige Gel bei UV-Belichtung.

### **3.5 Aufreinigung der PCR-Produkte mittels PCR-clean up kit (NucleoSpin™)**

Nach der Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte wurden diese anschließend mit einem PCR-clean up kit aufgereinigt. Als erstes wurden zu einem Volumen PCR-Produkt 2 Volumen NT-Puffer pipettiert. Anschließend wurde das gesamte Volumen in eine NucleoSpin Extract II Column geladen und 1 Minute bei 11.000 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen, 700 µl von Puffer NT3 auf den Filter pipettiert

und erneut für 1 Minute mit 11.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat, das den Filter passierte wurde wieder verworfen, und für 2 Minuten bei 11.000 rpm zentrifugiert, um auch wirklich das ganze Ethanol des Puffers NT3 zu entfernen. Danach wurde das Säulchen in ein neues Gefäß transferiert, 15-50 µl Elutionspuffer zugegeben und für 1 Minute bei 11.000 rpm zentrifugiert.

#### **3.6 Transformation von DNA in *E. coli* mittels Hitzeschock**

Da nun die gewünschte Mutation eingeführt wurde und das Plasmid nun wieder in zirkulärer Form vorliegt, war der nächste Schritt die Transformation der DNA mittels Hitzeschock in chemisch kompetente *E.coli* Zellen. Pro Transformation wurden 50-100 µl chemisch kompetente TOP10-Zellen aufgetaut und mit 10-20 µl Ansatz versetzt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis und ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für exakt 30 Sekunden. Danach kamen die Zellen sofort wieder auf Eis und wurden mit 250 µl SOC-Medium versetzt, um diese anschließend für eine Stunde bei 37°C und 550 rpm zu regenerieren.

#### **3.7 Plattierung von *E. coli***

Nach der einstündigen Regeneration wurde jeweils mit 50 µl und 100 µl der Transformationsansätze auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Das Antibiotikum Ampicillin wird dem Nährmedium beigegeben, um auf die transformierten *E. coli* Zellen zu selektionieren. Nur jene, die das Plasmid tragen, sind durch die Ampicillin-Resistenz in der Lage zu überleben. Je nach der Größe wurden unterschiedliche Mengen des Antibiotikas eingesetzt, z.B. bei besonders großen Vektoren wurde nur die Hälfte d.h. 50 µg/ml für die Platten eingesetzt und die Inkubation erfolgte ebenfalls über Nacht, jedoch bei einer geringeren Temperatur von 28°C.

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

Es wurden jeweils Klone (Einzelkolonien) mit einem Zahnstocher gepickt und in 5 ml oder 15 ml LB<sub>Amp</sub>-Flüssigmedium (100 µg/ml) bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen 10 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm abzentrifugiert. Es folgte ein

Miniprep zur Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli*, die entweder mit dem Quiaprep Spin Miniprep Kit (Quiagen GmbH) oder dem E.Z.N.A. kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Es folgte erneut ein Restriktionsverdau, um die isolierte Vektor-DNA zu überprüfen.

### **3.9 Restriktionsspaltungen**

Zur Gewinnung der definierten DNA-Fragmente, zur Hydrolyse von Plasmiden über Restriktionsschnittstellen und zur Überprüfung von positiven Klonen, wurden verschiedene Restriktionsenzyme verwendet. Hier wird die DNA durch die passenden Restriktionsendonukleasen hydrolytisch an den spezifischen Basen-Motiven gespalten. Die passenden Schnittstellen-Motive und die dazu zu erwartenden DNA-Fragmente wurden mit der Software Vector NTI ermittelt. Ein Restriktionsansatz hat z.B. so ausgesehen:

MM: z.B. 30 µl Gesamtansatz:

10 µl Plasmid-DNA

1 µl EagI (mindestens 1 U Restriktionsendonuklease)

0,5 µl AvrII

4 µl Red Puffer

14,5 µl H<sub>2</sub>O bidest.

Besonders wichtig bei so einer Restriktionshydrolyse mit zwei Enzymen ist die Verwendung eines Puffers, in dem beide Enzyme effektiv arbeiten können. Außerdem muss die eingesetzte DNA-Menge optimal auf die Units der verwendeten Restriktionsendonuklease angepasst werden. Nach dem Vermengen des Ansatzes wurden die Proben 1,5 bis 3 h bei 37°C inkubiert. Danach muss eine Inaktivierung des Enzyms erfolgen. Dies passiert entweder über eine Denaturierung durch Erhitzung von ca. 15 Minuten bei 65-85°C und anschließendem Abkühlen auf Eis, oder in den meisten Fällen automatisch durch die anschließende Phenolextraktion und dem Fällen der DNA. Die Qualität der Restriktionsspaltung wurde anschließend auf einem mit Ethidiumbromid-gefärbten 1%igem Agarosegel überprüft.

#### **3.10 Phenolextraktion und Fällen von DNA**

Nach dem Restriktionsansatz mit Enzymen von DNA-Proben mussten diese von den überflüssigen Proteinen und Salzen durch eine Phenol-Extraktion gereinigt werden, um inhibitorische Effekte zu verhindern. Die Nukleinsäurelösung wurde bei dieser Aufreinigung nacheinander mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch im Verhältnis 25:24:1 versetzt. Dadurch kommt es aufgrund des Phenol-Chloroforms zu einer Denaturierung der Proteine. Diese liegen durch den Isoamylalkohol stabilisiert in der sogenannten Interphase vor, separiert von der Phenolphase und der gewollten wässrigen Nukleinsäurelösung. Wichtig ist hier ein gutes Vortexen der Lösung, um eine möglichst saubere Extraktion der Nukleinsäuren zu erzeugen. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde diese wässrige Phase in ein neues Gefäß transferiert. Die nun reduzierte wässrige Phase, in der die Nukleinsäuren höher konzentriert vorliegen, wurde mit H<sub>2</sub>O bidest auf 100 µl aufgefüllt und erneut mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt. Wieder wurde für 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der wässrige Überstand vorsichtig abgenommen. Diese Phase wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2), 1 µl Glykogen und mit 2,5 Volumenanteilen eiskaltem 100%igem Ethanol mindestens 30 min bei -20°C gefällt. Dann zentrifugiert man die Nukleinsäurelösung 30 min bei 4°C und 13.000 rpm und wäscht das DNA-Präzipitat mit 70%igem Ethanol. Als nächstes wird noch einmal kurz zentrifugiert (ca. 5-10 Minuten), ehe man die DNA zum Schluss gut getrocknet via Vakuumzentrifuge in TE-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O eluiert.

#### **3.11 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (NucleoSpinExtractII)**

Nachdem Vektor und DNA-Insert mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert wurden, folgte ein 1%iges Agarosegel um die gewünschten Banden elektrophoretisch aufzutrennen.

Das Gel wurde nachträglich mit Ethidiumbromid eingefärbt und die richtige Bande mit einem Skalpell unter UV-Exposition herausgeschnitten. Das Herausschneiden sollte möglichst schnell erfolgen, da die DNA unter UV-Licht sehr empfindlich ist und es sonst zu Strangbrüchen kommen kann. Die ausgeschnittenen DNA-Stücke wurden anschließend mit GeneClean und dem Protokoll für die DNA Extraktion von Agarosegelen herausgelöst und in ddH<sub>2</sub>O oder TE-Puffer eluiert.

### **3.12 Extraktion von großen DNA-Fragmenten aus Agarosegelen („Freeze and Squeeze“)**

Für die Isolierung von größeren DNA-Fragmenten (ab 20 kb) wurde die DNA-Fällung mittels Freeze and Squeeze durchgeführt. Die richtigen Banden wurden aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mechanisch mit einem Spatel zerkleinert. Dann wurde 1 Volumen Phenol zugegeben und alles in flüssigem Stickstoff durchgefroren. Nach einem 10-15 minütigem Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur und 13.000 rpm wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion und das Fällen der DNA wie in Punkt 3.10 durchgeführt.

### **3.13 Sequenzierungs-Reaktion**

Die Sequenzierungs-Reaktion stellte eine zusätzliche Kontrolle für positive Klone und zur Überprüfung von definierten DNA-Sequenzen dar. Hierfür wurde eine DNA-Konzentration von 100 ng/µl eingesetzt. Der große Unterschied zur PCR ist hier, dass nur ein spezifischer Primer für die zu sequenzierende Region nötig ist. Es handelt sich hier um eine Kettenabbruchreaktion durch die Anbringung von fluoreszenzmarkierten 3'-Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP), wobei jede Base mit einer unterschiedlichen Farbe markiert ist. Den ddNTPs (BigDye) fehlt eine Hydroxylgruppe am 3' C-Atom. Somit wird beim Einbau eines fluoreszierenden Nucleosids die Synthese des Stranges abgebrochen, da keine Phosphodiesterbindung ausgebildet werden kann. Zum Schluss hat man eine statische Mischung aus allen unterschiedlichsten neu gebildeten fluoreszenzmarkierten DNA-Einzelsträngen, da es nur selten zum Einbau der ddNTPs kommt, weil diese relativ gering im Reaktionsansatz vorhanden sind.

Ein Sequenzierungs-Programm ist z.B. 1 min 96°C, 20 sec 96°C, 15 sec bei 52°C, 4 min bei 60°C, 15°C Pause und für 30 Zyklen.

### **3.14 Dephosphorylierung von Vektor-DNA**

Durch die Inkubation der Vektor-DNA mit Restriktionsenzymen entstehen zwei kompatible Enden, die wieder miteinander ligieren können. Dieses Problem kann durch eine Dephosphorylierung mit dem Enzym alkalische Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, CIAP) verringert werden.

Das heißt, direkt nach der Restriktionsanalyse entstehen an den freien 5'-Enden Phosphatreste, die für die Ligation benötigt werden. Entfernt man diese mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIAP), verhindert man somit die Selbstligation des linearen Vektors.

In jeden Ansatz wurde 1 µl alkalische Phosphatase beigemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde ein zweites Mal 1 µl CIAP zugegeben, da die enzymatische Aktivität des Enzyms nicht lange stabil bleibt. Gestoppt wurde die alkalische Phosphatase bei 65°C für 15 min. Über eine Phenolextraktion wurde die nun dephosphorylierte DNA von den Proteinen und Salzen gereinigt und gefällt.

#### **3.15 Ligation von DNA-Fragmenten**

Für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Hierfür wurden drei Verhältnisse (1:1, 1:3, 1:5) von dem dephosphorylierten, geschnittenen Vektor (50-100 ng) und Insert-DNA enzymatisch verknüpft.

Rechnung für die Ligationsverhältnisse des Inserts:

$$\text{ngVektor} \times \text{nt-Fragment} / \text{nt-Vektor} \times \text{Verhältnis}$$

Durch die Ligase wird die kovalente Verknüpfung der 3'-Hydroxylgruppe des einen Endes mit der 5'-Phosphatgruppe des anderen Endes, unter ATP-Verbrauch, katalysiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur, und am nächsten Tag wurde die Ligation für 10 Minuten bei 65°C inaktiviert. Es wurde auch eine Negativkontrolle erstellt um die Anzahl der religierten Vektoren zu ermitteln, wobei hier anstatt des DNA-Fragments ddH<sub>2</sub>O eingesetzt wurde.

#### **3.16 Photometrische Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration (NanoDrop)**

Die Konzentration von DNA kann einerseits mittels eines Kontroll-Agarosegels geschätzt oder UV-spektroskopisch bestimmt werden. Das spektroskopische Messen der Nukleinsäuren basiert auf dem gemittelten Absorptionsmaximum der Basen bei einer Wellenlänge von 260 nm und dem Lambert Beer'schen Gesetz.

$$A = \epsilon \times c \times d$$

A...Absorption als Quotient der eingestrahnten und transmittierten Intensität

$\epsilon$ ... molarer, dekadischer Extinktionskoeffizient

c... molare Konzentration

d... Schichtdicke der Küvette

Die Nukleinsäuren liegen in 1:10 TE-Puffer oder in ddH<sub>2</sub>O vor. Bevor die Proben gemessen wurden, eichte man noch das Photometer mit 1  $\mu$ l TE-Puffer oder ddH<sub>2</sub>O. Aus dem Verhältnis 260/280 nm erhält man außerdem die Aussage über eine mögliche Proteinkontamination in der Lösung.

### **3.17 Herstellung von Glycerinkonserven von *E.coli***

Um die positiven plasmidhaltigen *E.coli*-Klone zu konservieren, wurde die Übernachtskultur in einem Verhältnis von 1:1 mit sterilem 60%igem Glycerin gemischt. Dadurch sind die Klone konserviert und können bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### **3.18 Anzucht von *Sulfolobus solfataricus***

*Sulfolobus solfataricus* wurde aerob in einem Volumen von 30-300 ml Brock's Basalsalzmedium (Brock *et al.*, 1972) gezogen. Dieses Medium setzt sich aus 0,1 % Trypton als Stickstoffquelle, 0,2 % D-Arabinose als primäre C-Quelle oder 0,2 % Saccharose und 0,1 % Hefeextrakt zusammen. Zum Schluss wurde ein pH von 3 mit 50%iger Schwefelsäure eingestellt, und das Wachstum erfolgte bei  $78^{\circ}\text{C}$ .

Das Medium wurde in Ölschüttlern oder Heißluftinkubatoren ein paar Minuten vorgewärmt, und entweder mit einem berechneten Volumen einer Vorkultur der stationären Phase oder 200  $\mu$ l eines Glycerinstocks angeimpft. Je nachdem ob es sich um eine Anzucht von Uracil-auxotrophen Stämmen handelte, wurde das Medium zusätzlich mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Uracil angeimpft. Dann wurden die Kulturen 4-6 Tage bei  $78^{\circ}\text{C}$  und ca. 500 rpm inkubiert, und mehrmals die optische Dichte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen und kontrolliert.

#### **3.19 Entsalzung von DNA mittels Tropfendialyse**

Durch die Tropfendialyse werden Puffersalze in der genomischen DNA-Lösung entfernt. Durch die erhöhte Salzkonzentration wird die Leitfähigkeit erhöht, was unter Umständen zu vermehrten Kurzschlüssen während der anschließenden Elektroporation führen könnte. Für die Entsalzung wurde ein steriles Glasgefäß mit einer 1:1000 Verdünnung von Sso-H<sub>2</sub>O und 1 M Tris-HCl vorbereitet. Auf die Oberfläche wurde ein Rundfilter (Millipore, Porengröße 0,025 µm) schwimmend mit den zu transformierenden DNA-Proben gelegt, und darauf für die Elektroporation jeweils 10 µl Transformationsansatz pipettiert. Dialysiert wurde 2 h bei Raumtemperatur.

#### **3.20 Elektroporation von *Sulfolobus solfataricus***

Die Elektroporation wurde nach einer für *Sulfolobus solfataricus* optimierten Methode (Schleper *et al.*, 1992) durchgeführt.

Um diese Transformation durchführen zu können, wurde am Vortag von einer stationären M16 Kultur so überimpft, dass sie sich am Versuchstag in der exponentiellen Phase befand. Vor der Elektroporation wurden aus dieser Kultur kompetente Zellen hergestellt, in welche anschließend transformiert wurde. Als nächstes streckte man ca. 200-300 ng der dialysierten DNA in eine gekühlte Küvette (Elektrodenabstand 0,1 cm; Bio-Rad) vor, und mischte diese mit 50 µl kompetenter Zellen (OD<sub>600</sub> von ca. 0,3) der Übernachtskultur.

Die Elektroporation fand mit den Einstellungen 1,25 kV, 25 µF und 1000 Ohm statt. Die Zeitkonstante sollte wegen der Transformationseffizienz in einem Bereich von 8,9 bis 9,1 msec liegen, damit die Überlebensrate der Zellen nicht rapide sinkt.

Anschließend wurde 1 ml Wachstumsmedium (Brock's Basalsalzmedium mit 0,1 % Trypton und 0,2 % D-Arabinose) zugegeben, und auf dem Heizblock bei 78°C und 250 rpm für 1-2 Stunden regeneriert. Nach der Regeneration wurden die Transformationsansätze in vorbereitete 50 ml Brock's Basalsalzmedium mit 0,1 % Trypton als Stickstoffquelle und 0,2 % D-Arabinose als Kohlenstoffquelle plus 10 µg/ml Uracil inokuliert. Über das Messen der optischen Dichte wurde das Wachstum der Kulturen in den folgenden 2-3 Tagen beobachtet. Bei einer optischen Dichte von ca. 0,2 bis 0,8 wurden die Kulturen in ein neues 50 ml Brock's Basalsalzmedium mit 0,1 % Trypton und 0,2 % D-Arabinose ohne Zugabe von Uracil überimpft. Durch das Fehlen von Uracil wird nun auf die komplementierten, Uracil-auxotrophen M16 Transformanten

selektioniert. Diese sind nun durch die Transformation mit den *pyrEF*-tragenden Vektoren wieder in der Lage, das lebensnotwendige Uracil zu synthetisieren.

Auch dieses Wachstum wurde wieder photometrisch kontrolliert, und bei einer optischen Dichte von ca. 0,5 erfolgte die Plattierung auf Arabinose/Trypton-Platten ohne Uracil zur Gewinnung der Einzeltransformanten.

### **3.21. Herstellung von *Sulfolobus solfataricus*-Zellen für die Elektroporation**

In 50 ml Brock's Basalsalzmedium wurde eine M16 Übernachtskultur so angeimpft, dass diese zum benötigten Zeitpunkt eine optimalen optischen Dichte von ca. 0,2-0,4 erreichte. Dann wurde die Kultur auf Eis vorgekühlt und 15 Minuten bei 4°C und 4000 rpm abzentrifugiert. Anschließend folgten mehrere Waschschrte zur Entfernung der Salze in unterschiedlichen Volumen einer vorbereiteten und gekühlten 20 mM Saccharose-Lösung (in 50 ml, in 25 ml und in 1 ml). Nach den Resuspendierungsschritten wurde jeweils für 10 Minuten bei 4.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die Konzentration der Zellen wurde durch das Resuspendieren in 1 ml 20 mM Saccharose auf  $10^{10}$  Zellen/ml eingestellt.

### **3.22. Herstellung von *Sulfolobus solfataricus*-Zellen für die Elektroporation**

Von einer Kultur der exponentiellen Wachstumsphase wurden zwischen 1 bis 5 ml abgenommen, und für einige Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C. Das Zellpellet wurde 10fach konzentriert in Brock's Basalsalz mit 25%igem Glycerin (pH 5) resuspendiert. Nun konnte die Zellsuspension aliquotiert und auf -80°C aufbewahrt werden.

### **3.23 Plattierung von *Sulfolobus solfataricus***

Für die Plattierung von *Sulfolobus solfataricus* wurden Platten bestehend aus 0,64 % (w/v) Gelrite, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MgSO<sub>4</sub> und Brock's Basalsalzmedium hergestellt. Da die beimpften Platten für mindestens 5-8 Tage bei 78°C in feuchter Atmosphäre inkubiert (Platten dürfen nicht austrocknen) werden, wurde hier anstatt des Agars Gelrite verwendet. Dieses ist hitzestabiler und ein Polysaccharid aus Uronsäure, das zur Quervernetzung einen erhöhten Anteil an zweiwertigen Kationen benötigt.

### **3.24 Plattierung von *Sulfolobus solfataricus* Transformanten zur Gewinnung von Einzeltransformanten**

Für das Beimpfen der Selektionsmediums-Kultur auf die Tryptonplatten wurden verschiedene Zelldichte-Verdünnungen (Endkonzentrationen  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ) hergestellt. Anfangs wurden 10  $\mu$ l des Selektionsmediums in 990  $\mu$ l 2x Brock's Basalsalzmedium mit 0,1 % Trypton und 0,2 % D-Arabinose vermischt, um bei einer optischen Dichte von 0,4 ( $10^8$  Zellen) eine Konzentration von  $10^6$  (Verdünnung 1:100) zu erreichen. Dann wurden von dieser Verdünnung wieder 100  $\mu$ l abgenommen und in 900  $\mu$ l Medium (Verdünnung 1:10  $\rightarrow$  Konzentration  $10^5$  Zellen) pipettiert. Dies wurde solange weiter verdünnt, bis alle drei gewünschten Zelldichten vorhanden waren.

Danach plattierte man je 100  $\mu$ l dieser Verdünnungen auf die vorbereiteten, mit Gelrite versetzten Tryptonplatten aus und inkubierte diese für 5-8 Tage in feuchter Atmosphäre bei 78°C.

Nach der Inkubation konnte ein X-Gal Test zur Kontrolle auf korrekte Transformanten durchgeführt werden. Dieser qualitative Test ist durch eine Blau/Weiß-Selektion aufgrund der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität möglich. Durch die Transformation mit den Vektoren, die das Reportergen *lacS* tragen, kommt es aufgrund der Promotoraktivität, die durch eine UV-Bestrahlung ausgelöst wird, zur Expressierung des *lacS*. Deshalb wurden die Platten mit einer UV-Dosis von 75 J/m<sup>2</sup> bestrahlt, und anschließend wurden die Einzelkolonien mit dem Farbstoff X-Gal (10 mg/ml in Dimethylformamid gelöst) gleichmäßig besprüht und bei 78°C für eine halbe Stunde inkubiert.

War die Transformation erfolgreich, sollte nun durch die Besprühung mit X-Gal eine Umsetzung des Farbstoffes stattfinden. Dadurch kommt es zu einer Blaufärbung der Kolonien und so kann die  $\beta$ -Galaktosidase qualitativ nachgewiesen werden. Bei diesen Kolonien handelt es sich dann um die gewünschten positiven Einzeltransformanten, welche nun selektioniert werden können.

Einige davon wurden mittels einer Pipettenspitze gepickt und in verschiedene Volumina à 30 ml (*Sulfolobus*-Kolben), 6 ml (Falcons) und 2 ml (Mikrotiterplatte) Brock's Basalsalzmedium mit 0,1 % Trypton und 0,2 % D-Arabinose ohne Zugabe von Uracil angeimpft. Auch hier wurde das Wachstum regelmäßig mittels des Spektrophotometers überprüft, bis eine exponentielle Wachstumsphase erreicht war. Parallel dazu wurde außerdem mit den OD<sub>600</sub>-Werten eine Wachstumskurve erstellt und Proben abgenommen um Glycerinkonserven herzustellen, sowie DNA-Proben für eine Multiplex- und *lacS*-PCR einzufrieren.

### **3.25 Isolierung von Gesamt-DNA aus *Sulfolobus solfataricus***

Von einer Kultur, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand, wurden 5 ml mit einer Glaspipette abgenommen und auf Eis gekühlt. Dann folgte ein 10minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 4.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet in 500 µl TEN-Puffer (pH) 8 aufgenommen. Dann folgte die Zugabe von 500 µl TENST-Puffer und die Proben wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Hier sollten die Zellen nun lysiert vorliegen, und die eigentliche DNA-Extraktion beginnt mit der Zugabe von 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol. Die Proben wurden gut gemischt und 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nochmals 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben, gemischt und 15 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der wässrige Überstand sollte nun klarer vorliegen. Diese Phase wurde abgenommen und mit 500 µl Chloroform versetzt und bei 4°C 15 Minuten und 13.000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde die Fällung der DNA, wie bereits im Punkt 3.10 besprochen, durchgeführt. Die Gesamt-DNA eluierte man anschließend in ca. 60 µl TE-RNase Puffer und inkubierte bei 40°C für 15 Minuten. Anschließend wurde die isolierte DNA UV-spektroskopisch bei 260 nm vermessen.

### **3.26 Multiplex-PCR**

Für eine Multiplex-PCR verwendet man mehrere Primerpaare, um verschieden lange spezifische Amplifikate von unterschiedlichen DNA-Sequenzen, jedoch auf dem gleichen Template, in einem PCR-Ansatz zu produzieren. Voraussetzung dafür ist, dass die Primer keine homologen Sequenzen amplifizieren, da es sonst leicht zu einer Fehlanlagerung der Primer kommt. Wie bei einer gewöhnlichen PCR wurde ein 50 µl Mastermix angesetzt, mit dem Unterschied, dass hier in jedem Ansatz vier verschiedene Primer verwendet wurden. Für die DNA wurde ungefähr eine Konzentration von 100 ng verwendet. Die Schwierigkeit liegt an der Einstellung der Temperatur, die für alle 4 Primer ziemlich gleich sein sollte. Somit war das PCR-Programm:

- 3 Minuten 96°C
- 20 Sekunden 96°C
- 20 Sekunden 55°C

- 1 Minute 50 Sekunden 72°C
- 10 Minuten 72°C
- Pause 4°C und 31 Zyklen

Je nachdem in welcher Form das Plasmid vorliegt, sind verschiedene PCR-Produkte zu erwarten (wichtig um sie anschließend mittels der Agarosegelelektrophorese zu separieren). Mittels dieser speziellen PCR kann man genau sehen, ob das transformierte Plasmid frei, in das Chromosom integriert, oder nur untransformierte M16-Zellen vorliegen. Außerdem kann man durch die Intensität der Banden einschätzen, in welchem Verhältnis die Integration zum z.B. freien Plasmid vorliegt. Zum Schluss wurde das Ergebnis auf einem 1,5%igem mit Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel kontrolliert.

#### **3.27 UV-Induktion von *Sulfolobus solfataricus***

Für die UV-Induktion von *Sulfolobus solfataricus* wurden 200 µl eines Glycerinstocks in 50 µl Brock's Basalsalzmedium mit 0,1 % Trypton und 0,2 % D-Arabinose Medium ohne Uracil angeimpft und 3-5 Tage bei 78°C kultiviert. Waren die Vorkulturen hoch genug angewachsen, wurden sie für den nächsten Tag auf die optimale, exponentielle Wachstumsphase von einer optischen Dichte von 0,2 - 0,3 in 300 - 400 ml Brock's Medium inokuliert. Am nächsten Tag wurde die Versuchskultur gemessen und unter Rotlicht die UV-Bestrahlung vorgenommen. Vorher reinigte man die Arbeitsfläche gründlich mit Ethanol, stellte Bechergläser, Trichter, Kolben und die Schale für die UV-Induktion bereit. Dann begann man mit der Kontrollkultur z.B. M16. Von dieser wurden immer 20 ml in einem gekennzeichneten Becherglas abgemessen, in eine Schale gegossen und für 5 Sekunden in den Crosslinker gestellt, wieder entfernt und in den beschrifteten Kontroll-Kolben geleert. Dies wiederholte man so oft, bis genug Versuchskultur (ca. 100 – 150 ml) vorhanden war. Dann wurde mit der UV-Induktion der selbigen Kultur angefangen. Auch hier wurden jeweils 20 ml vermesen, in die Schale gekippt und für 5 Sekunden mit 75 J/m<sup>2</sup> UV-Licht bestrahlt. Nach der UV-Bestrahlung hatte man daher von jeder Versuchskultur eine Kontrolle (gleiche Behandlung nur ohne UV-Bestrahlung) und die UV-bestrahlte Kultur. Nach der UV-Bestrahlung stellte man sie für 15 Minuten bei Raumtemperatur ins Dunkle, damit die durch die UV-Bestrahlung induzierten Doppelstrangbrüche durch die lichtabhängige

Photolyase nicht repariert werden konnten. Danach wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten DNA, RNA und Proteinproben entnommen, und eine weitere Inkubation der Versuchskulturen erfolgte bei 78°C.

### **3.28 Erstellen einer Wachstumskurve**

Für die Charakterisierung der verschiedenen Mutanten wurden unter anderem Wachstumskurven erstellt. Dadurch kann man die Wachstumsverzögerung nach einer erfolgten UV-Induktion beobachten, und mit dem Wachstum der Kontrollkulturen vergleichen. Abgenommen wurde jeweils vor der Bestrahlung, nach 15 Minuten, 2 Stunden usw. und jeweils die optische Dichte photometrisch ermittelt.

Anschließend wurde eine Grafik mit den gemessenen Werten gegen die Zeit in Stunden erstellt.

### **3.29 Qualitativer Test auf $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität**

Für den qualitativen Test auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden die bei 78°C für 5-8 Tage inkubierten Tryptonplatten mit 10 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid gelöst, besprüht und für eine halbe Stunde inkubiert. Zuvor wurden Einzelkolonien mit 75 J/m<sup>2</sup> im Crosslinker für ein paar Sekunden aktiviert. Dann wartete man, bis sich eine eindeutige Blaufärbung der Kulturen einstellte, um diese zu picken und in Selektionsmedium zu kultivieren.

### **3.30 Herstellung von Proteinextrakten aus *Sulfolobus***

Wie schon im Punkt 3.24 beschrieben, wurden alle 2 Stunden Proben abgenommen, um anschließend die Proteinkonzentration via Bradford-Test und die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zu bestimmen. Hierfür mussten Proteinextrakte gewonnen werden und zu jedem Zeitpunkt 10 ml Kultur mit einer Glaspipette abgenommen, auf Eis gekühlt und 10 Minuten bei 4°C und 4.000 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500  $\mu$ l 10 mM Tris/HCl Puffer (pH 8) resuspendiert. Das Lysieren der Zellen erfolgte durch abwechselndes Durchfrieren in flüssigem Stickstoff und einem anschließenden Erhitzen der Proben auf 65°C für 5 Minuten. Dieser Ablauf wurde insgesamt fünfmal durchgeführt, bis die Lösung klar

vorlag. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt bei 15.000 rpm für 30 Minuten, um die Membranfraktion von der Cytoplasmafraktion zu trennen. Folglich zeigte sich ein Überstand mit den Proteinen und ein Pellet aus den Zelltrümmern. Abgenommen wurde die obere Phase und diese entweder sofort auf  $-20^{\circ}\text{C}$  verwahrt, oder umgehend die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

#### **3.31 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationsextrakten wurde nach dem Protokoll von Bradford (1979) durchgeführt.

Als erstes ist es notwendig eine mit BSA ermittelte Standardkurve zu erstellen. Über diese Kurve ist es möglich über die optische Dichte bei 595 nm die Proteinkonzentration zu berechnen. Für die Regressionsgerade wurden unterschiedliche Verdünnungen des BSA (10 mg/ml) mit Tris-HCl pH 8 (0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml 1 mg/ml) hergestellt. Die Geradengleichung der Standardkurve konnte verwendet werden:

$$y = m \cdot x + b$$

$$y = \text{OD}_{595}$$

$$x = \text{BSA-Konzentration}$$

$$m = \text{Steigung der Geraden}$$

$$b = y - \text{Achsenabschnitt}$$

Für die Eichgerade wurde die BSA-Verdünnungsreihe zweimal gemessen um eine höhere Messgenauigkeit durch die Berechnung des Mittelwerts zu erreichen. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde die optische Dichte bei einem 595 nm gemessen. Für y ergab sich für die BSA-Standardkurve  $0,7789x + 0,0704$ .

Nun begann man mit der eigentlichen Messung, und für jede Proteinprobe musste die Konzentration gefunden werden, welche in diese gemittelte Eichgerade passte. Dazu musste am Beginn die richtige Verdünnung für die Proteine eingestellt werden (1:1, 1:2, 1:4). Auch diese wurden mit dem Puffer Tris/HCl (pH 8) versetzt und mit 980  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz auf 1 ml aufgefüllt. Nach 5 Minuten Inkubation im Dunkeln wurde jede Probe im Duplikat gemessen. Der davon erhaltene Mittelwert, der wiederum auf die Verdünnung aufberechnet wurde, konnte in der nach x umgestellten Gera-

dengleichung eingesetzt werden. Handelte es sich z. B. um eine Protein-Tris/HCl Verdünnung von 1:2 (10 µl : 10 µl), wurde der Wert mal 2 multipliziert, um diesen in die Standardkurve (20 µl) richtig einzurechnen.

Somit war es möglich die Proteinkonzentration des unverdünnten Zellextrakts über die BSA-Standardkurve zu bestimmen.

### **3.32 Quantitativer Test auf $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität**

Nach dem Protokoll von Moracci *et al.* (2001) wurde der Test auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität aus Zellextrakten von *Sulfolobus solfataricus* durchgeführt. Um den hergestellten Testpuffer (2,8 mM ONPG in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,5) aufzuwärmen, wurde ein Wasserbad auf 75°C erhitzt. Dann mischte man 50 µl des Zellextrakts mit 950 µl Testpuffer durch Invertieren. Jetzt folgte die enzymatische Reaktion bei 405 nm für 5 Minuten bei der konstant gehaltenen Temperatur des Photometers von 75°C. Gemessen wurde der Anstieg der spezifischen, enzymatischen Aktivität, welche sich durch die vom UV-VIS-Spektrophotometer durch die angegebene Änderung der Absorption pro Zeiteinheit  $dA/dt$  ( $\text{min}^{-1}$ ) ergab. Das Lambert-Beersche Gesetz wurde angewendet:

$$dA/dt = (dc/dt) \times e \times d$$

e = molare Absorptionskoeffizient ( $1 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )  
 c = Konzentration (M) ONPG  
 d = Schichtdicke der Küvette (cm)

Für ONPG ist der molare Extinktionskoeffizient in 50 mM  $\text{NaPO}_4$ -Puffer pH (6,5)  $3100 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Eine Einheit (U) der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ist definiert als Enzym-Menge, die die Hydrolyse von 1 µmol ONPG pro Minute bei 75°C katalysiert.

Auch diese Messung wurde wieder doppelt durchgeführt, um eine höhere Messgenauigkeit zu erhalten, d. h. von den beiden gemessenen Werten wurde ein Mittelwert ermittelt. Dieser wurde durch den molaren Absorptionskoeffizienten  $3100 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  dividiert. Die mittels Bradford berechnete Proteinkonzentration wurde auf das Volumen des ONPG-Testpuffers aufberechnet (z. B. 1:2 Verdünnung = 10 µl Protein → x5 auf 50 µl). Somit ergab sich die Proteinkonzentration in mg/µl für 50 µl. Zum

Schluss fehlte noch die Berechnung der spezifischen Aktivität in U/ mg, wofür die Proteinkonzentration der untersuchten Zellkultur nun berücksichtigt werden musste.

Für die spezifische Aktivität gilt:

Spez. Akt. (U/ mg) = U/ 50  $\mu$ l / Proteinkonzentration der Zellkultur in mg/ ml

#### **3.33 Isolierung von Gesamt-RNA von *Sulfolobus solfataricus***

Von einer exponentiell gewachsenen Flüssigkultur wurden 5 ml für die Isolierung von Gesamt-RNA abgenommen, auf Eis gekühlt und für 10 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Bevor mit der Extraktion begonnen wurde, war der ganze Arbeitsplatz mit Ethanol zu reinigen um alle RNasen so gut wie möglich zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und 600  $\mu$ l Lysis/Binding Solution des mirVana RNA-Isolation Kits zugegeben. Die Probe wurde dreimal in einer 1 ml Spritze auf- und abgezogen um die Zellen vollständig aufzuschließen. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1/10 Volumen des miRNA Homogenate Additive zum Zellysate pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 10 Minuten auf Eis und anschließend wurde ein Volumen Acid-Phenol:Chloroform beigemischt. Die Probe wurde gut gemischt und 5 Minuten bei 13.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß transferiert. Dann wurden 1,25 Volumen 100%iges Ethanol zur wässrigen Phase gegeben, und die gesamte Lysat/ Ethanol-Mischung in 700  $\mu$ l Schritten durch das Säulchen in kurzen 15 sekundigen Zentrifugationsschritten passiert. Anschließend wurde der Filter zweimal mit 500  $\mu$ l Wash-Solution 2/3 gewaschen und die RNA in 100  $\mu$ l Elution Solution oder RNase-freiem Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) bei 95°C eluiert.

#### **3.34 Northern-Analyse**

Mit der isolierten RNA wurde eine Northern-Analyse durchgeführt, bei dem diese in einem 1,2%igem Gel (Agarose, DEPC-H<sub>2</sub>O, 10x RNA Gelpuffer pH 8 und 37%iger Formamid) mittels Elektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und zum Schluss die gewünschten RNA Fragmente mittels einer DIG-markierten RNA- oder DNA-Sonde detektiert wurden. Wichtig ist hier steril zu arbeiten und alles mit RNase-freiem Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) anzusetzen.

### **Qualitätskontrolle der isolierten RNA**

Die isolierte RNA musste anschließend qualitativ als auch quantitativ überprüft werden. Quantitativ gemessen wurde sie mit dem Spektrophotometer über die Absorption bei 260 nm. Qualitativ wurde die RNA auf einem 1%igem Agarosegel mit 1x TAE-Laufpuffer mittels Gelelektrophorese überprüft. Bevor das Gel mit der ca. 300 ng RNA beladen wurde, denaturierte man diese mit einem RNA-Mix (9 µl) bestehend aus Formamid, 36%igem Formaldehyd, Gelpuffer pH 8 und RNA Auftragspuffer für 10 Minuten bei 65°C. Nachdem im 1%igen Agarosegel die RNA Banden für die 23S-, 16S- und 5S – rRNA-Untereinheiten gut sichtbar und mit gleicher Intensität vorhanden waren, konnte das eigentliche denaturierende 1,2%ige Agarosegel gegossen werden.

### **Northern-Transfer**

1,8 g Agarose wurden eingewogen und in 109,5 ml DEPC-H<sub>2</sub>O und 15 ml 10x MOPS Gelpuffer (pH 8) gelöst.

Zur Herstellung dieses speziellen RNase-freien Wassers musste am Vortag eine 1:1000 Verdünnung von DEPC (Diethylpyrocarbonate) und bidest H<sub>2</sub>O gemischt und über Nacht unter dem Abzug gerührt werden. Danach musste das DEPC-H<sub>2</sub>O noch autoklaviert werden. Mit diesem RNase-freien Wasser wurden sämtliche Puffer und Lösungen angesetzt.

Nachdem die Agarose in der Mikrowelle aufgeköcht wurde, musste man sie auf 65°C abkühlen lassen ehe man 25,5 ml 37%iges Formaldehyd unter dem Abzug dazugab. Dann konnte das 1,2 %ige Gel gegossen werden und anschließend ließ man es für 30 Minuten bei Raumtemperatur erstarren, um es dann mit 1x MOPS Laufpuffer zu überschichten. Wichtig war das Gel unter der Spannung von 100 Volt 10 Minuten vorlaufen zu lassen. In der Zwischenzeit wurden ca. 5 µg RNA mit 15 µl RNA-Mix versetzt, ebenso wie 5 µl RNA-Marker, und für 15 Minuten bei 65°C denaturiert. Danach kam die RNA sofort auf Eis und wurde unter dem Abzug auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt für ca. 2-3 Stunden. Anschließend transferierte man das Gel in eine Plastikwanne und schwenkte es zum Entfernen des Formaldehyds zweimal für 15 Minuten in DEPC-H<sub>2</sub>O. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit 2x SSC für 30 Minuten. Auch die Nylonmembran musste vorbereitet wer-

den, und dafür schwenkte man diese 1 Minute in DEPC-H<sub>2</sub>O und unmittelbar danach für 5-10 Minuten in 20x SSC.

Nun konnte der Blott aufgebaut werden, um über Kapillarkräfte den Transfer der RNA auf die Nylonmembran mit 20x SSC über Nacht durchzuführen. Am nächsten Tag wurde der Blott wieder abgebaut und die Nylonmembran zwischen 2 Whatman-Papieren bei 78°C für 2 Stunden gebacken. Danach schwenkte man die Nylonmembran kurz in DEPC-H<sub>2</sub>O, bevor sie für 5 Minuten in Methylblau Lösung (0,04 % in 0,5 M Natriumacetat pH 5.5) gefärbt wurde. Entfärbungsschritte mit DEPC-H<sub>2</sub>O folgten so lange, bis man die 23S- und die 16S- rRNA gut erkennen konnte. Die Membran wurde eingescannt, die Markerspuren abgeschnitten und bei -20°C aufbewahrt.

#### **Hybridisierung**

Um die Nylonmembran für die Hybridisierung mit der DIG markierten dsDNA-*lacS*-Sonde vorzubereiten, wurde diese luftblasenfrei in eine Plastiktasche mit ca. 20 ml Hybridisierungspuffer eingeschweißt, leicht einmassiert und bei 42°C für 2-3 h inkubiert. Die mit DIG markierte dsDNA-*lacS*-Sonde wurde auf 95°C in einem Wasserbad erhitzt und anschließend wieder auf Eis abgekühlt. Nun schnitt man die Plastiktasche an einer Seite auf und kippte die erkaltete DIG markierte dsDNA-*lacS*-Sonde vorsichtig über die Nylonmembran. Die aufgeschnittene Seite wurde wieder luftblasenfrei zugeschweißt und über Nacht bei 42°C inkubiert.

#### **Waschen der Membran**

Am nächsten Tag wurde die Sonde wieder entfernt und die Membran vorsichtig freigelegt. Es folgte erneut ein Waschschrift mit 0,2x SSC/ 0,1 % SDS für 20 Minuten bei 55°C, 30 Minuten bei 60°C und 30 Minuten bei 65°C um eine Erhöhung der Stringenz zu erreichen. Dann wurde die Nylonmembran in eine kleinere Schale transferiert und 2-3 Minuten in DIG-Waschpuffer (0,3 % Tween 20 in 1x Puffer1) und 30 Minuten in Puffer 2 (Blockierungsreagenz in 1x Puffer 1) geschwenkt. In der Zwischenzeit mischte man 7 µl Anti-DIG-Schafsantikörper mit der alkalischen Phosphatase gekoppelt mit 70 ml Puffer 2. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Die nächsten Schritte waren erneut Waschschrift, 2x für 15 Minuten in ca. 100 ml Waschpuffer 2 und 3-5 Minuten in Puffer 3.

### **Exposition der Membran**

Dafür wurde die Membran in einem möglichst kleinen Volumen einer CSPD-Lösung (CSPD 1:100 verdünnt in Puffer 3) 5 Minuten lang geschwenkt. Hier war es wichtig, nicht unter direktem Lichteinfluss zu arbeiten, da es sonst zu einer Degradierung der Lösung kommen kann. Nun musste die Nylonmembran vorsichtig mit Whatman-Paper zum Trocknen aufgelegt werden. Dann transferierte man sie zwischen zwei klare Folien in eine Film-Box. Der nächste Schritt war das direkte Auflegen eines Röntgenfilms, der aber unbedingt in der Dunkelkammer unter Rotlicht befestigt werden musste. Es folgte ein Inkubationsschritt der Box bei 37°C für eine Stunde. Durch diese Inkubation kam es zur Aktivierung der Reaktion der alkalischen Phosphatase. Wird eine Phosphatgruppe durch die Phosphatase abgespalten, entsteht aus dem CSPD eine metastabile Zwischenstufe, die unter Lichtemission zerfällt (Chemilumineszenz). An den Stellen, wo die DIG markierte dsDNA-/acS-Sonde spezifisch an die RNA gebunden hat, kommt es zu einer Schwarzfärbung des aufgelegten Röntgenfilms.

Dazu wurde der Film in der Dunkelkammer kurz in einer Entwicklungslösung geschwenkt. Sobald ein Erscheinen von Banden zu erkennen war, wurde der Film in eine Stop-Lösung gegeben, worin sie ca. für 15 Sekunden geschwenkt wurde. Dann kam der Röntgenfilm kurz in ein Wasserbad, ehe er in einer Fixierungslösung kurz eingelegt wurde. Nach der Entwicklung wurde der Film noch kurz mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und getrocknet.

## 4. Ergebnisse

Zu Beginn wurden Sequenzstudien der Promotorregionen der Gene  $T_{ind}$  und SSO0691a durchgeführt, um mögliche *cis*-regulatorische Elemente zu identifizieren.

### 4.1 Sequenzstudien der Promotorregionen

Um eine Verkürzung der Promotorregionen für die Identifizierung wichtiger regulatorischer Elemente zu planen, wurden die beiden Promotoren-Sequenzen verglichen.

```

SSO0691a:-----CTATCTATCATCAGTTTCACATAACTCTCAGCCATTTAAAAGAAAAAATATCACGGATAAGTGATGGCTAATATAGTTC 79bp
Tind:      TACACAAACAGAGTTAGTCGACTCTGTGTATCTTATGTATCTTATACAAAAAATATGGGATGTGCAAAAAT----- 70bp
          „BRE“  „TATA“
          +1TSS

```

Abb.1) Alignment der Promotorsequenzen von SSO0691a und  $T_{ind}$ . Ausrichtung nach dem BRE-Element (grau), TATA-Box (violett) und den Transkriptionsstartpunkten (TSS). In grün hervorgehoben der 5'UTR-Bereich von SSO0691a. Weder TATA-Box noch BRE-Element sind eindeutig konserviert. Konsensus TATA-Box:  $T^A/T^A TA^A/T^A A$ ; Konsensus BRE-Element  $^A/_G N^A/_T AA^A/_T$ .

Für beide Sequenzen liegt keine eindeutige TATA-Box mit dem Konsensus für *Sulfolobus*  $T^A/_T TA^A/_T A$  vor. Auch der Konsensus für das BRE-Element ( $^A/_G N^A/_T AA^A/_T$ ) konnte nicht identifiziert werden. Der Transkriptionsstartpunkt für SSO0691 wurde von Daniela Teichmann mittels einer Primer-Extension-Reaktionen 188 nt stromauf des annotierten Translationsstarts bestimmt. Die Promotorelemente des  $T_{ind}$ -Transkriptes wurden bereits von W.D.Reiter untersucht, wobei auch der Transkriptionsstartpunkt experimentell bestimmt worden war (Reiter *et al.*, 1987). Hier liegt der Transkriptionsstart auf einem Adenosin, das gleichzeitig auch das ATG des Translationsstarts bildet.

Um etwaige konservierte Sequenzabfolgen in UV-induzierbaren Promotoren zu identifizieren, wurde ein Alignment erstellt. Alle UV-induzierbaren Gene der Microarray-Analyse von *Sulfolobus solfataricus* (Fröls *et al.*, 2007) wurden auf gleiche oder ähnliche Sequenzmotive untersucht (Abbildung 2).

Die Transkriptionsstartpunkte der übrigen UV-induzierbaren Promotorregionen sowie 5'UTR-Bereiche und Startcodons konnten mithilfe der Daten des sequenzierten Transkriptoms von P2 bioinformatisch identifiziert werden (Wurtzel *et al.*, 2009). Beim genauen Blick auf die stromauf des Transkriptionsstarts liegenden Sequenzen kon-

| +1              |  |   |
|-----------------|--|---|
| AAAGAAAAAATAT   | <u>C</u> AACGATAA <u>G</u> TGATGGCTAATATAGTT   | <u>CCCATGG</u> ACT <i>SSO0691a neues Protein (-8)</i> |
| ACTTAATTTAGATT  | <u>G</u> GGGTAAAAGTT <u>T</u> TGGTTTCAGCTAAGGACATA                                   | <i>SSO0771 cdc6 (-12)</i>                             |
| CCAAATTAATACT   | <u>A</u> GGTGAAAA <u>A</u> TGAGTGAGGAAAGAATCCATTAATAGGAGAAAGAT                       | <i>SSO02121 (-10)</i>                                 |
| ATAAGTAGTAATCT  | <u>T</u> GATTAACCTATTAGAAGAGCTGGATAAA <u>A</u> TGAGTTCCGAAGCTAAGA                    | <i>SSO0770 (-29)</i>                                  |
| TCGAACCTTATATTC | <u>A</u> TGGCTGACGTTTTTCATACAAATGCTTAGTGACGCTGTTACTG                                 | <i>SSO1501 (0)</i>                                    |
| GAGAGATGTAACAC  | <u>A</u> TGGGAAGAACACAACCCTCATAACCATGGCGGTGAACAGAGAATTGG                             | <i>SSO8124 (0)</i>                                    |
| CGTGAATTTTAAAC  | <u>A</u> TGAAAAAGGGAATATCATCAATCCTAGGTGCAATTATATTAATA                                | <i>SSO0037 (0)</i>                                    |
| GTTATTGTTTTTCAT | <u>A</u> TGCAATGCCCTGCATGTGGTTCGAATGAAATAAATTGGGATAATAAGA                            | <i>SSO0280 (0)</i>                                    |
| ACAATACTATATAT  | <u>A</u> TGATTTCTCTAACTAAATGGAGGGCGTCTTCATACATAAAATTGCTTG                            | <i>SO1823 (0)</i>                                     |
| GTAAGCTATTAGAT  | <u>A</u> TGGAACCTTACTCCTAGGCTTCAAGATATAATAAATATGCTAAAGAATAA                          | <i>SSO3242 (0)</i>                                    |
| CCAAAACCTTAAAC  | <u>A</u> TGATTTGGCAAGGATGACGTCTTTGCTCTTATATTGAGTGAATATAAGGA                          | <i>SSO2751(0)</i>                                     |
| GTTAATAACATCC   | <u>G</u> TCTTAAAAGATGTATCAGTAAAAGTAAGTTAAGAG <u>A</u> TGAGTGATATAAATTGATGA           | <i>SSO0257(-36)</i>                                   |
| --AAGAGTCTAGAC  | <u>A</u> TGATAGTACACAGTAATAAATCAGAAAAGGAGGAGTAGGCAAAACAACGACTTCAGT                   | <i>SSO0034 (0)</i>                                    |
| CTAAATTAGTGAGT  | <u>T</u> AGCATGTTTGATAAGTTACCATTTATTTTAAACAACGAGAAGAGGCCGAAAGGCTC                    | <i>SSO0910 (-3)</i>                                   |
| ACAAGAACAAGATT  | <u>A</u> GAGCCGAA <u>A</u> TGCGCTCAAGTAAAGTAGAAGATTCGTAAGAATTGGGGAG                  | <i>SSO0881 (-9)</i>                                   |
| ----TATGCTATTT  | <u>G</u> AGTTTCT <u>A</u> TGAAAATAAACCCTGTAAGTAAACTACCAGAGCAGTTTCGGAAGCAATAG         | <i>SSO5826 (-8)</i>                                   |
| TGAATCATATAACC  | <u>A</u> TGAAGAAAAGGGTGGAAATCCTAATAGTAGAGGATTTATAGTGGAAATCCCAAAA                     | <i>SSO6687 (0)</i>                                    |
| -AAGCCTATACTAC  | <u>A</u> TGAGCCATTCTATTCAAGTCTATAATAGAACAGTAGGAATAGCTCATGATAT                        | <i>SSO10704 (0)</i>                                   |
| CAGATTAGTGTGA   | <u>A</u> GTTAGTATTACAGTTAGATGATCAGAAATATTTTACGTTGATGGCGTAAT                          | <i>SSO3207 (0)</i>                                    |
| TAATGTTAAATGGT  | <u>C</u> ATGGAAAGGGGAGAGATTATAGGAATAGTACTGCAGAAGAGCGAAGCAAATGAAA                     | <i>SSO2200 (-1)</i>                                   |
| -----TTTCTGCT   | <u>T</u> AATGATGAAGGT <u>T</u> AAAAGCTCCTATTAG <u>A</u> TGACGAATCTCCGCTATCTGAAGAGCCC | <i>SSO0911(-28)</i>                                   |
| CATAAGGATAACTT  | <u>G</u> AAGAAAT <u>A</u> TGCAACAGTAAAGTTCAAGTACAAAGGAGAAGAGAAGCAAGTAGAT             | <i>SSO9180 (-7)</i>                                   |
| TTTAAGAATAGCTT  | <u>G</u> GAGATATCA <u>A</u> TGCAACAGTAAAGTTCAAGTACAAGGAGAAGAGAAGGAAGT                | <i>SSO10610 (-10)</i>                                 |
| ATAAGGATATCTTG  | <u>A</u> AGAAAT <u>A</u> TGCAACAGTAAAGTTCAAGTATAAAGGAGAAGAAAAACAAGTAGACA             | <i>SSO9535 (-7)</i>                                   |

Abb. 2) Alignment der UV-induzierten Gene von *S. solfataricus*, welche in der Datenbank des gesamten Transkriptom von P2 (Wurtzel *et al.*, 2010) auf Transkriptionsstartpunkte und 5'UTR-Bereiche analysiert wurden. In gelb dargestellt die 5'UTR-Bereiche, jeweils umrahmt die Transkriptions- und Translationsstartpunkte. Unterstrichen sind die unterschiedlich lange konservierten Sequenzabfolgen in den 5'UTR-Bereichen.

nten keine identischen Motive entdeckt werden. Analysiert man jedoch die 5'UTR Bereiche, welche unmittelbar nach dem Transkriptionsstartpunkt beginnen und beim ersten möglichen Methionin der Translation enden, findet man ein unterschiedlich langes Motiv (TAAG, TAAAAG). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass sich hier ein *cis*- regulatorisches Transkriptionselement befinden könnte.

Aufgrund dieser Informationen wurde noch ein weiteres Alignment mit den nah verwandten *Sulfolobales* angefertigt. Verglichen wurde die Promotorsequenz des Gens SSO0691a mit homologen Genen von *Sulfolobus islandicus*, *Sulfolobus tokodaii* und *Sulfolobus acidocaldarius* (Abbildung 4).

Durch den Vergleich der UV-induzierbaren Promotorsequenz von SSO0691a mit den homologen Regionen der anderen *Sulfolobales* ist ersichtlich, dass *S. islandicus* ebenfalls das gleiche Motiv (TAAG – TAAAAG – TAG) an der gleichen Position aufweist wie *Sulfolobus solfataricus*. Bei *S. acidocaldarius* und *S. tokodaii* konnte aber kein vergleichbares Motiv gefunden werden. Dennoch könnte man annehmen, dass dies gute Hinweise für ein eventuell vorhandenes *cis*-regulatorisches Transkrip-

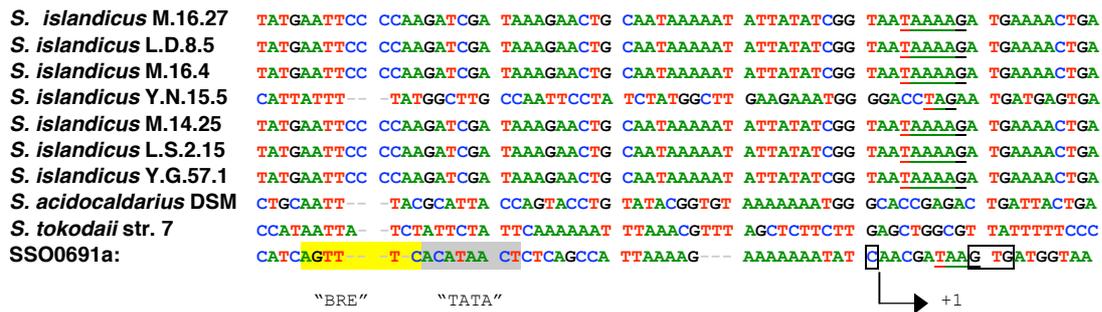


Abb. 3) Sequenzvergleich der Promotorregion von SSO0691a mit *S. islandicus*, *S. tokodaii* und *S. acidocaldarius*. In gelb dargestellt das bestimmte BRE-Element und in grau die TATA-Box. Die unterstrichenen Bereiche sind die gleichen Sequenzmotive, die hauptsächlich in *Sulfolobus islandicus* entdeckt wurden.

tionselement in der Promotorregion von SSO0691a sind.

Ausgehend von diesen Informationen wurden Deletionen im Bereich der 5'UTR-Regionen in der Promotorregion von SSO0691a geplant.

$T_{ind}$  wurde nicht in die Vergleiche miteinbezogen, da in der Promotorregion kein 5'UTR Bereich vorhanden ist, und der Transkriptionsstart auch gleichzeitig das Startcodon für die Translation ist. Deswegen war nicht davon auszugehen ein gleiches Sequenzmotiv für diesen Promotor zu finden.

Ausgehend von diesen Informationen wurden die Deletionen geplant, und im Zuge dessen synthetische Oligonukleotide designt. Weiters wird beschrieben, wie und wo die verschiedenen Deletionen durchgeführt wurden.

#### 4.2 Deletion des Promotors von Tind

Für den UV-induzierbaren Promotor des ersten Transkripts des Virus SSV1 wurde eine Deletion hinter dem Transkriptionsstart geplant. Durch diese Deletion von 18 nt wurde das ATG des Reportergens *lacS* auf die Transkriptionsstartstelle gelegt. Somit hatte der Promotor eine Größe von 52 bp. Das zu erwartende Resultat war keine große Veränderung in der Expression der  $\beta$ -Galaktosidase, da hier der künstliche, durch die Klonierung eingeführte 5'UTR-Bereich gelöscht wurde.

Der gekürzte Promotorbereich sollte für weitere Deletionen dienen.

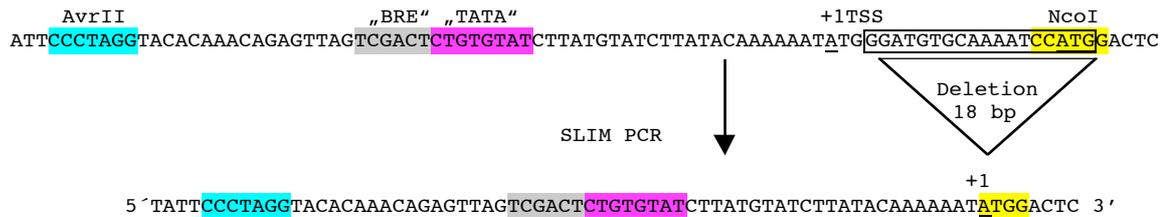


Abb. 4) Hier dargestellt der Ausgangspromotor  $T_{ind}$ . Dieser wurde um 18 nt gekürzt und somit das ATG des Reportergens *lacS* gelöscht und auf die Transkriptionsstartstelle (TSS) gelegt. In blau dargestellt die Restriktionsschnittstelle *AvrII*, in grau das BRE-Element, in violett die TATA-Box und in gelb die Schnittstelle *NcoI*, außerdem unterstrichen der Transkriptionsstartpunkt, der zugleich das Startcodon für die Translation darstellt. Eingerahmt dargestellt die geplante Deletion.

### 4.3 Deletionen des Promotors von SSO0691a

Für den am stärksten UV-induzierbaren Promotor SSO0691a wurden zwei verschiedene Deletionen geplant:

#### 1. Deletion

Durch die Deletion von 18 bp stromauf der TATA-Box bis zur *AvrII* Schnittstelle, wurde die Region entfernt, die möglicherweise das BRE-Element (transcription factor B recognition element) enthält. Hiermit sollte getestet werden, ob diese Region, die keinen sichtbaren BRE-Konsensus aufweist, für die Transkription notwendig ist.

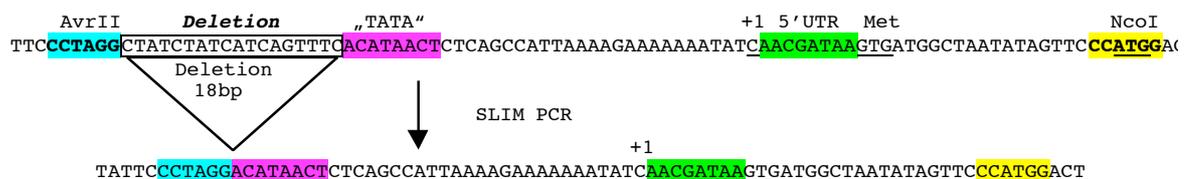


Abb. 5) Hier dargestellt der Ausgangspromotor pDT-0691aDelp mit einer Größe von 79 bp. Deletiert wurde der Bereich zwischen der Restriktionsschnittstelle *AvrII* und der TATA-Box. Somit wurde das gesamte BRE-Element gelöscht. Es bleibt eine Restgröße von 61 bp. In blau dargestellt die Restriktionsschnittstelle *AvrII*, daneben eingerahmt die durchgeführte Deletion, in violett die potentielle TATA-Box, in grün die 5'UTR-Region, davor unterstrichen der TSS +1 und stromab das erste mögliche Startcodon GTG und in gelb die Restriktionsschnittstelle *NcoI*.

#### 2. Deletion

In einer zweiten Deletion sollte die 5'UTR-Region entfernt werden, in der keine Shine-Dalgarno-Sequenz (GAGGUGAU, Bell et al., 1998) gefunden werden konnte. Durch das Entfernen von insgesamt 29 nt hatte der Promotor nur mehr eine Länge von 50

## 4. Ergebnisse

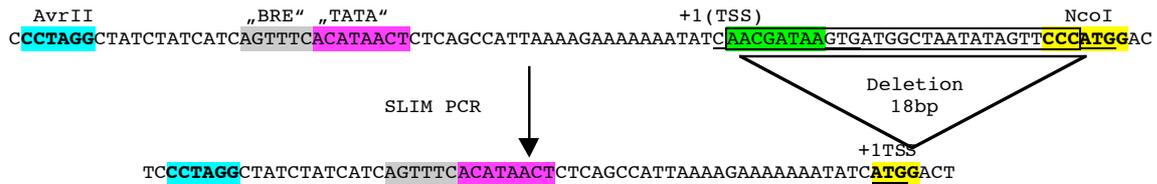


Abb. 6) 2. Deletionsschema für den Promotorbereich von SSO0691a. Entfernt wurde die gesamte Region stromab des Transkriptionsstartpunkts bis zum ATG der Restriktionsschnittstelle *NcoI*. Der Restpromotor weist nun eine Größe von 50 bp auf. In blau die Restriktionsschnittstelle *AvrII*, in grau das BRE-Element, in violett die TATA-Box, in grün der 5'UTR-Bereich, unterstrichen der TSS und das GTG für die Translationsinitiation, in gelb *NcoI*.

bp. Eventuell befindet sich hier eine Bindestelle für ein regulatorisches Transkriptionselement. Würde in dieser Region ein Aktivator binden, würde die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität im Falle der Deletion im Reportersystem stark abnehmen.

Im folgenden Punkt wird die verwendete Methode für die geplanten Deletionen in den Ausgangsplasmiden beschrieben, und die dadurch aufgetretenen Probleme diskutiert.

### 4.4 Ausgangsplasmide

Die gekürzten UV-induzierbaren Promotoren waren sowohl in einen Vorvektor pSVA11 als auch in den *shuttle* Vektor pMJ0305 kloniert.

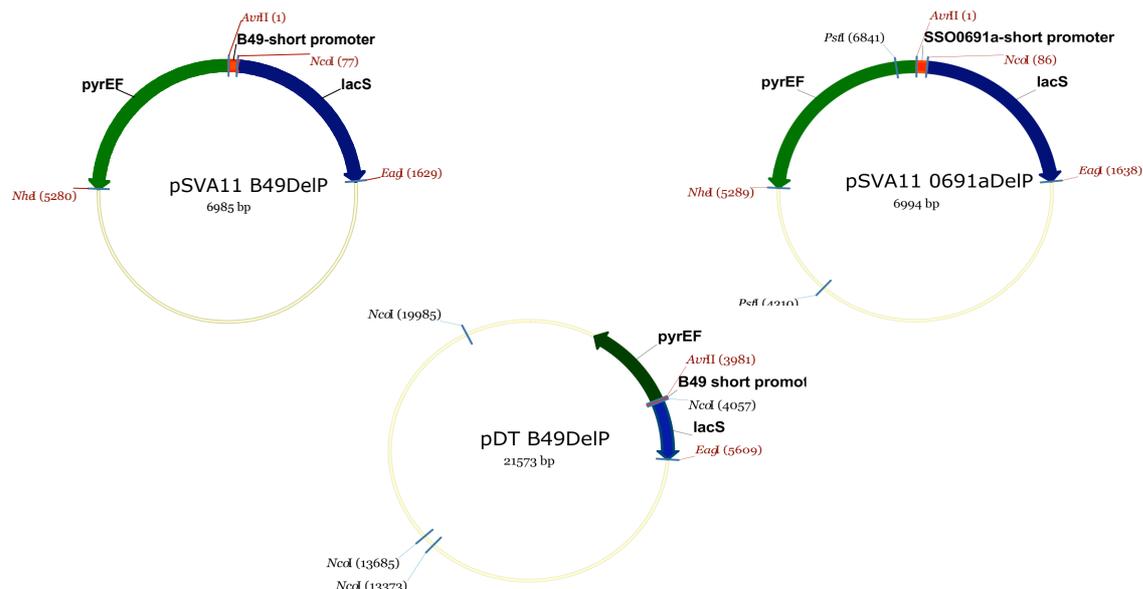


Abb. 7) Die Vorvektoren pSVA11-TindDelp mit 6.985 bp, pSVA11-0691aDelp mit 6.994 bp und der shuttle Vektor pDT-TindDelp mit 21.573 bp und den klonierten verkürzten UV-induzierbaren Promotorregionen. Hier ersichtlich die Restriktionsschnittstellen *AvrII*, *NcoI* und *EagI* in den Vektoren.

#### 4.5 Deletionen via SLIM-PCR (Zielgerichtete – Ligase-unabhängige Mutagenese)

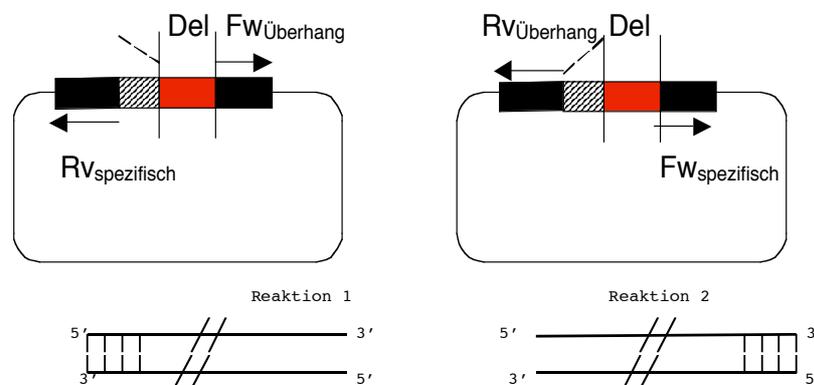
Via SLIM-PCR ist es möglich, Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Plasmiden größer als 8 kb einzuführen (Chiu *et al*, 2008).

Es wurde versucht diese Art der Polymerase-Kettenreaktion zu verwenden, um einen aufwendigen Klonierungsschritt über den Vorvektor pSVA11 in den Zielvektor pMJ0305 zu vermeiden.

##### Schritt 1: Slim PCR

Reaktion 1: FWÜberhang + RVspezifisch

Reaktion 2: FWSpezifisch + RVÜberhang



- DpnI Behandlung und Phosphorylierung

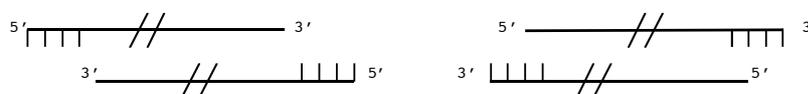
Mischen

##### Schritt 2: SLIM Hybridisierung:

Denaturierung & Hybridisierung

99°C/ 3 min  
65°C/ 5 min  
30°C/ 15 min

2x



Heteroduplex Formation

Hitzeschock *E.coli*  
Keine Ligation!

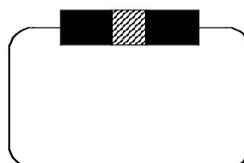


Abb. 8) Das Schema der SLIM-Mutagenese-PCR. Details zum Ablauf siehe Methoden-Teil unter Punkt 3.2., Rv = revers, Fw = forward, Del = Deletion

#### **4.5.1 Schema der Methode SLIM-PCR**

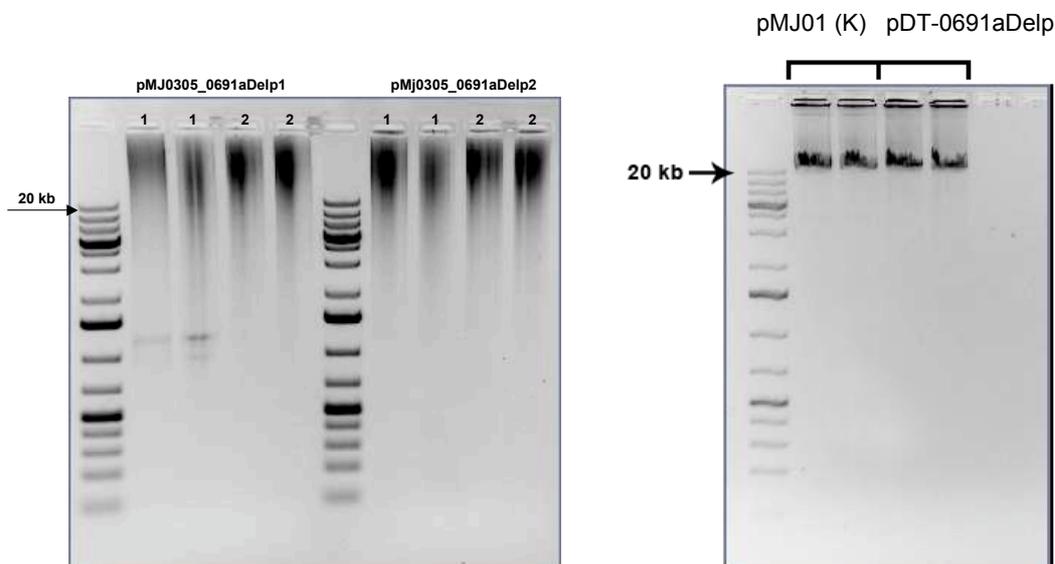
In der vorherigen Abbildung 8) ist der Ablauf der verwendeten Mutagenese-PCR, dargestellt.

Da die Amplifikation der Plasmide mit den klonierten Promotorregionen zu Komplikationen führte, wird im Punkt 4.5.2 die Optimierung des Protokolls beschrieben.

#### **4.5.2 Optimierung des SLIM-PCR Protokolls**

Die Konzentrationen der isolierten Plasmide pDT-TindDelp und pDT-0691aDelp wurden spektroskopisch bei 260 nm vermessen und anschließend wurde die DNA auf ca. 15 ng/µl verdünnt.

Dann folgten die Versuche die Plasmide pDT-TindDelp und pDT-0691aDelp mit den 4 verschiedenen Primern zu mutieren. Leider wurden keine PCR-Produkte erhalten und Verschiedenes wurde zur Optimierung ausprobiert, z.B. Gradienten-PCR, Erhöhung der Zyklenzahl, Zusatz von DMSO, unterschiedliche Konzentrationen der Polymerasen „Phusion“ und „long-range“ und unterschiedliche Konzentrationen an eingesetzter DNA.



9A)

9B)

Abb. 9A): 1%iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Kontrolle des PCR-Produkts der SLIM-PCR der Plasmide pDT-0691aDelp1, pKL-0691aDelp2. Marker: GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder 1) Reaktion 1 mit jeweils fwd-18 bp Überhang und rev Oligonukleotid, 2) Reaktion 2 mit jeweils fwd und rev-18 bp Überhang-Primer

Abb. 9B) 1%iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit dem Kontroll-Plasmid pMJ01 und den dazu designierten Primern. Gleiche wurden für das Plasmid pDT-0691a verwendet. Marker GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

Doch auch nach etlichen PCR-Versuchen war auf einem 1%igem Agarosegel nicht mehr zu sehen, als unspezifische Banden bzw. eine Schmier (Abbildung 9A).

Nach der SLIM-PCR sollte ein Produkt mit einer Größe von 21.564 bp sichtbar sein. Wie auf dem Bild zu erkennen ist, wurden aber nur Produkte mit unterschiedlicher Größe erhalten, die als Schmier erkennbar sind (Abbildung 9A). Der Verdacht bei diesem Ergebnis war, dass zuviel DMSO eingesetzt wurde. Deswegen wurde durch eine zusätzliche Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion versucht, um die PCR-Produkte aufzureinigen. Da auch dies nicht das erhoffte Ergebnis zeigte, wurde eine Kontroll-SLIM-PCR mit ähnlich konzipierten Primern angesetzt. Diese wurden für eine Region (im Reporter gen *lacS*) entworfen und sollten auch für das Plasmid pMJ0305 ein ähnliches Produkt zeigen. In der Abbildung 9B) ist ersichtlich, dass die Amplifikation für 19 kb für das Plasmid pMJ01, und für 21 kb mit dem Ausgangsplasmid pDT0691-Delp funktionierte. Zum Vergleich mit diesen Primern hatten die für die geplanten Deletionen entworfenen Primer wahrscheinlich zu hohe Annealing-Temperaturen. Dadurch konnten die Oligonukleotide eventuell nicht spezifisch binden und die Amplifizierung konnte zu keinem positiven Ergebnis führen.

Es war somit nicht möglich die Mutagenese-PCR im 21 kb großen Vektor pJM0305 durchzuführen. Deswegen wurden die Deletionen im Vorvektor pSVA11 in den 2 verschiedenen klonierten Promotorsequenzen durchgeführt. Das gewünschte Resultat konnte nun mittels zwei verschiedener Ansätze erreicht werden. Zum einen mit der SLIM-PCR und den entworfenen 4 Primern, und zum zweiten mit einer PCR mit den 2 Primern ohne Überhänge und dem Enzym Phusion-Polymerase. Mit letzteren Produkten wurde eine blunt-end Ligation durchgeführt.

In den Abbildungen 10 A) und 10 B) sind jeweils die erhaltenen Produkte der Mutagenese-PCR der Vektoren pSVA11-0691aDelp1 und pSVA11-0691aDelp2 mit den richtigen Größen (pSVA11-0691aDelp1 6.967 bp, pSVA11-0691aDelp2 6.956 bp) dargestellt.

Davon abhängig, ob die Amplifikation mit der Phusion-Polymerase bewerkstelligt wurde, war eine anschließende Behandlung mit dem Enzym *Pfu*-Polymerase notwendig um die 3'-Überhänge zu entfernen. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Isoamyl

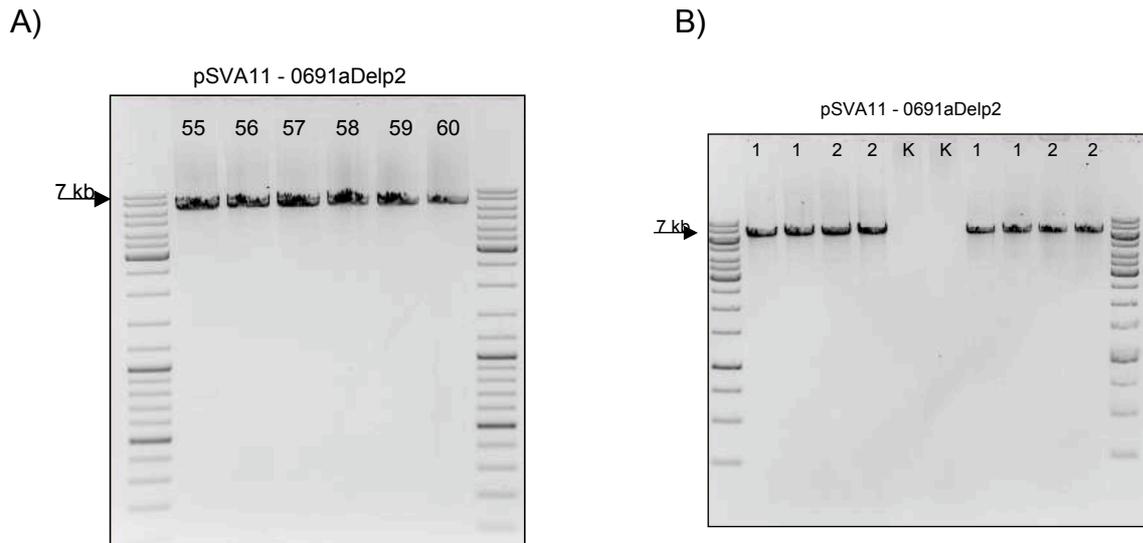


Abb. 10 A) 1%iges mit Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit dem Produkt einer Gradienten-PCR und den Primern ohne Überhängen mit den Temperaturen von 55°C bis 60°C. Marker GeneRuler DNA Ladder Mix 1 kb.

Abb. 10 B) 1%iges mit Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel mit dem Produkt der SLIM-PCR im Vorvektor pSVA11. Marker GeneRuler™ DNA-Ladder-Mix.

Aufreinigung wie im Punkt 3.10 beschrieben, und eine photometrische Messung der DNA-Konzentration im Spektrophotometer. Um eine Ligation zu ermöglichen, wurde die lineare DNA mit der T4 Polynukleotid Kinase inkubiert. Dadurch kommt es zu einer 5'-Phosphorylierung der PCR-Produkte. Gleichzeitig fand eine Inkubation mit dem Enzym *DpnI* statt, durch welche die methylierte Ausgangs-DNA abgebaut wird und es dadurch zu einer Trennung von amplifizierter und Ausgangs-DNA kommt.

Im nächsten Schritt folgte ein Mischen, eine Denaturierung und eine Hybridisierung der linearen Plasmide. Je nachdem, welche PCR-Reaktion vorlag, wurde entweder eine „blunt-end“-Ligation durch die Zugabe der T4 DNA-Ligase durchgeführt, oder eine Heteroduplex-Formation der SLIM-PCR Amplifikate durch die Hybridisierung der Enden. Als nächstes wurden die Plasmide in *E.coli* transformiert. Um die erhaltenen Plasmide pSVA11-0691aDelp1, pSVA11-0691aDelp2 und pSVA11-TindDelp1 aus *E.coli* zu isolieren, wurde ein Miniprep aus den erhaltenen Klonen durchgeführt.

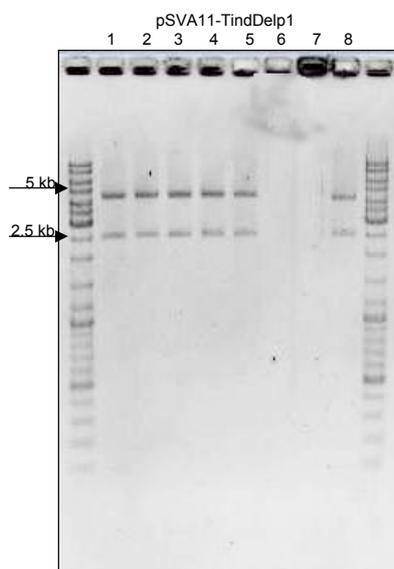
#### **4.6 Überprüfung der mutagenisierten Promotorregionen**

Die Plasmide mit den Ausgangspromotoren sowie den beiden mutierten Promotoren wurden einer Restriktion mit den Endonukleasen *NcoI* und *PstI* unterzogen. Durch die Deletion ist die *NcoI* Schnittstelle in den mutierten Promotorregionen nicht mehr vor-

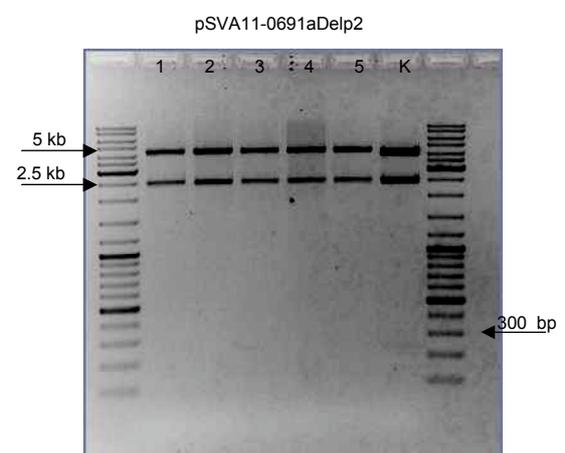
handen und so sollte ein Unterschied nach der *NcoI*-Hydrolyse im Vergleich zum Ausgangsplasmid zu sehen sein.

Im Falle der eingestellten Deletion des Promotors pSVA11-TindDelp1 zeigen sich für die Mutanten 2 Banden mit 4.744 bp und 2.531 bp. In Abbildung 11A) sind die Resultate der Restriktionsanalyse auf einem 1%igen, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel, dargestellt. Im Falle von pSVA11-TindDelp1 kann man nach der Agarosegelelektrophorese die positiven Klone 1, 2, 3, 4, 5 und 8 aufgrund der beiden richtigen Banden erkennen.

In der Abbildung 11B) zeigt sich ein ähnliches Bild des verdauten Vektors pSVA11-0691aDelp2 mit den fehlenden 29 nt. Hier wurden 5 gepickte und restrigierte Klone aufgetragen. Zu sehen sind die erwarteten Fragmente von 4.434 bp und 2.531 bp. Ganz rechts wurde das Ausgangsplasmid als Positivkontrolle pipettiert, welche die gewünschten 3 Banden aufzeigt (4.224 bp, 2.531 bp und 239 bp), da diese auch noch die ursprüngliche *NcoI*-Schnittstelle besitzt.



11A)



11B)

Abb. 11A) Restriktionsspaltung von pSVA11-TindDelp1 mit den Endonukleasen *NcoI* und *PstI* auf einem 1%igen mit Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel mit 4.744 bp und 2.531 bp. Marker GeneRuler DNA-Ladder Mix™ und in der Abb. 11B) Selbige Spaltung ebenfalls mit 2 Banden für pSVA11-0691aDelp2 (4.434 bp, 2.531 bp) und als Kontrolle das Ausgangsplasmid mit 4.224 bp und 2.531 bp plus einem zusätzlichen Fragment von 239 bp.

Zusätzlich wurde eine Sequenzierreaktion durchgeführt, um die Promotorsequenzen auf jedes Nukleotid genau zu überprüfen. Dafür wurden jeweils 3 Klone ausgesucht und analysiert. Weiters wurde auch für die Mutante pSVA11-0691aDelP1 eine Sequenzierreaktion für 3 Klone angesetzt. Bei dieser Deletion war es nicht möglich, die Promotorsequenz mit Hilfe eines Restriktionsverdau zu kontrollieren. Alle 9 ausgesuchten Klone konnten anhand ihrer Sequenz als positiv nachgewiesen werden.

#### 4.7 Klonierungsschema

Die Klonierung der mutagenisierten Promotorsequenzen in dem *S. solfatarius*/*E. coli* shuttle Vektor erfolgte nach folgendem Schema:

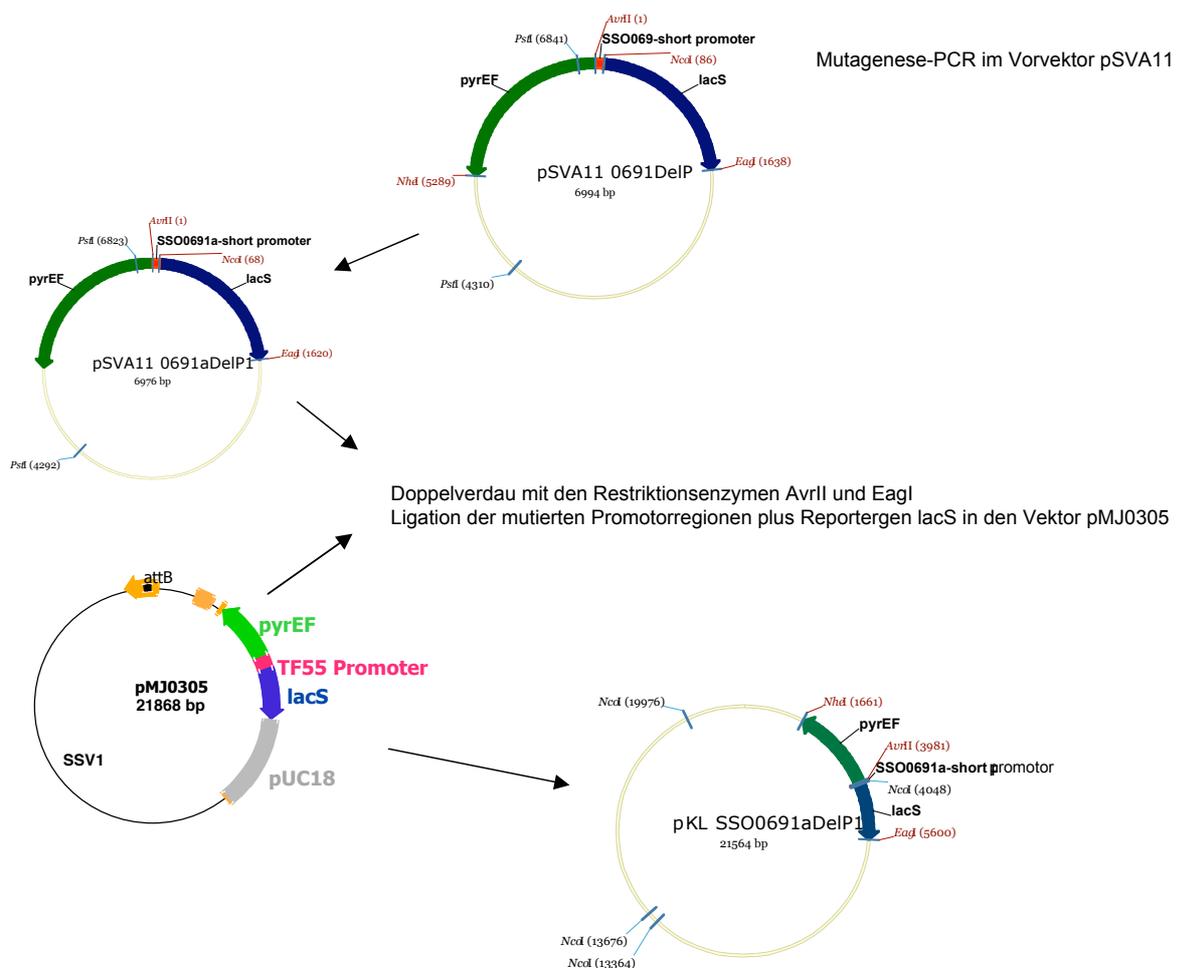


Abb. 12) Ablauf der einzelnen Klonierungsschritte vom Ausgangsplasmid pSVA11 und dem benötigten Vektor pMJ0305. Details siehe Text.

Im Folgenden werden nun die Restriktionsspaltungen und die anschließende Ligation beschrieben.

#### **4.8 Umklonierung in den shuttle Vektor pMJ0305**

Es wurde ein Restriktionsansatz hergestellt, um den verkleinerten Promotorbereich mit dem Reporter gen *lacS* aus dem Vorvektor mit den Endonukleasen *AvrII* und *EagI* herauszuschneiden. Für den Vektor pSVA11-TindDelp1 war eine Größe von 5.537 bp zu erwarten und für die Promotor-*lacS*-Kassette mit dem zum Teil deletierten Promotor eine Bande von 1.610 bp. Gleichzeitig wurde der shuttle Vektor pMJ0305 mit denselben Enzymen behandelt, um den hitzeinduzierbaren Promotor TF55 und das Reporter gen zu entfernen (Fragmente 19.945 nt und 1.923 nt). Nach der Inkubation wurden die Produkte auf ein 1%iges mit Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel aufgetragen und mittels Elektrophorese wurden die Fragmente aufgetrennt. Die benötigten Fragmente wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht herausgeschnitten (siehe Abb. 13A) und 13B)).

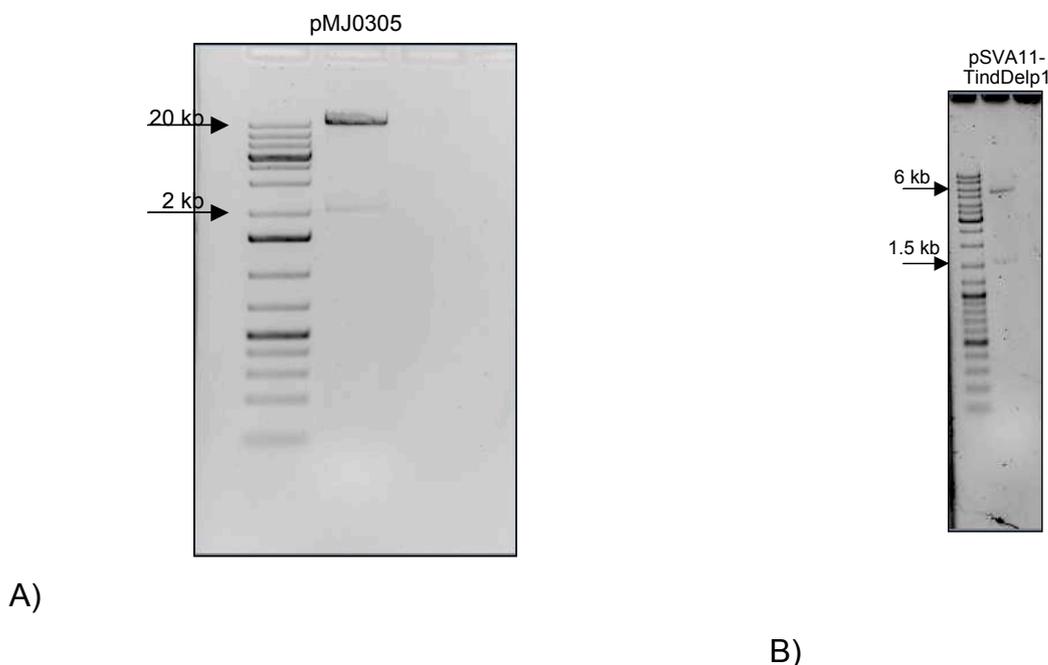


Abb. 13A) 1%iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Kontrolle des Restriktionsverdaus mit *AvrII/Eag I* des Vektors pMJ0305. Marker GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

Abb. 13B) Zur Überprüfung des Endonukleaseverdaus, hier als Beispiel pSVA11-TindDelp1 mit der Bande für den Promotor plus *lacS* und dem geschnittenen Vorvektor mit der größeren Bande. Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix

#### 4. Ergebnisse

Tabelle 1: Übersicht mit den nach der Transformation von *E. coli* erhaltenen Kolonien

| Vektor                | molares Ligationsverhältnis (ng-Vektor : nt-Insert) | ausplattierter Transformationsansatz | gezählte Transformatanten |
|-----------------------|---|--------------------------------------|---------------------------|
| pMJ0305-pKL-0691Delp1 | 1:3   | 50 µl                                | 27                        |
| pMJ0305-pKL-0691Delp1 | 1:3   | 100 µl                               | 83 (5 Klone)              |
| pMJ0305-pKL-0691Delp1 | 1:5   | 50 µl                                | 37                        |
| pMJ0305-pKL-0691Delp1 | 1:5   | 100 µl                               | 116                       |
| pMJ0305- neg.K        | 1:3   | 100 µl                               | 12                        |
|                       |   |                                      |                           |
| pMJ0305-pKL-0691Delp2 | 1:3   | 50 µl                                | 14 (Klon 1 u 2)           |
| pMJ0305-pKL-0691Delp2 | 1:3   | 100 µl                               | 11                        |
| pMJ0305-pKL-0691Delp2 | 1:5   | 50 µl                                | 43 (Klon 3, 4 u 5)        |
| pMJ0305- neg. K       | 1:3   | 100 µl                               | 8                         |
|                       |   |                                      |                           |
| pMJ0305-pKL-TindDelp1 | 1:3   | 100 µl                               | 3                         |
| pMJ0305-pKL-TindDelp1 | 1:3   | 50 µl                                | 0                         |
| pMJ0305-pKL-TindDelp1 | 1:5   | 100 µl                               | 65                        |
| pMJ0305-pKL-TindDelp1 | 1:5   | 50 µl                                | 30                        |
| pMJ0305- neg. K       | 1:3   | 100 µl                               | 0                         |
| pMJ0305- neg. K       | 1:5   | 50 µl                                | 0                         |

Wichtig für die folgende Ligation war die zusätzliche Behandlung des Vektors pMJ0305 mit dem Enzym alkalische Phosphatase um diesen zu dephosphorylieren. Durch die Behandlung mit dem Enzym kann es aufgrund der fehlenden 5'-Phosphatreste zu keiner Religation des Vektors kommen.

Vor der Ligation wurde nochmals eine Gelelektrophorese durchgeführt, um die DNA-Konzentrationen genauer abzuschätzen. Die Fragmentgrößen schienen korrekt und deswegen konnten die Ansätze ligiert werden. Für die verschiedenen Ligationen wurde jeweils das Insert im drei- und fünffachen molaren Überschuss im Verhältnis zum Vektor in die Reaktion eingesetzt. Außerdem wurde eine Negativkontrolle hergestellt, in der anstatt des Inserts das adäquate Volumen an ddH<sub>2</sub>O verwendet wurde. Dadurch konnte im Anschluss der Anteil der Religanten ermittelt werden. Ligiert wurde in zwei Ansätzen, einmal über Nacht und einmal für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend fand eine Transformation von *E. coli* statt, und am nächsten Tag wurden jeweils 5 Klone gepickt (siehe Tabelle 1).

Nach der Isolierung der Plasmid-DNA wurde eine Restriktion mit der Endonuklease *NcoI* durchgeführt, um die Klone mit dem Zielvektor zu identifizieren. Geschnitten wurden wieder pKL-TindDelp1 und pKL-0691aDelp2 sowie die dazugehörigen Ausgangspromotoren pDT-TindDelp und pDT-0691aDelp2, die wieder eine Bande mehr

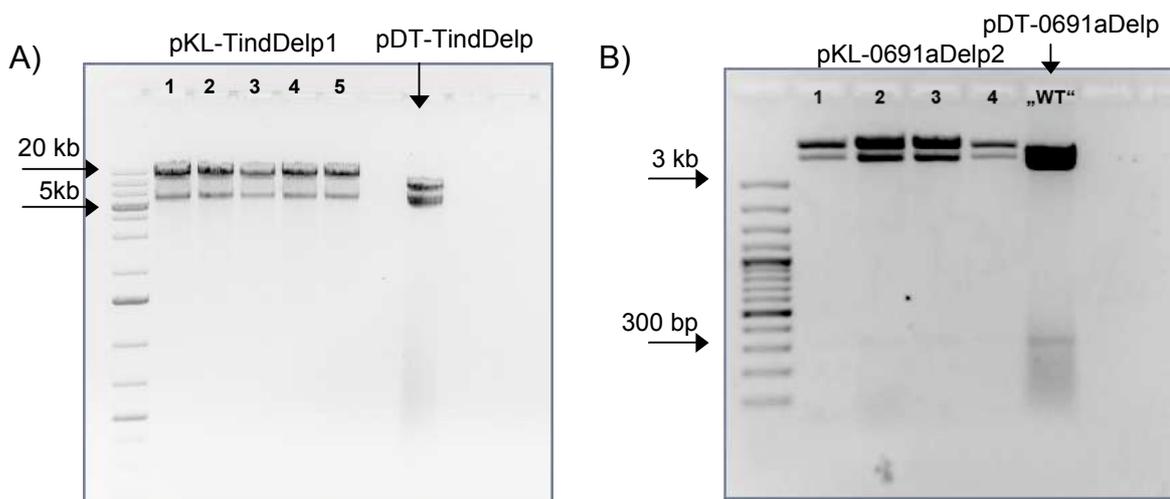
aufweisen sollten. In Tabelle 2) sind die erwarteten Banden für den Restriktionsverdau mit *NcoI* abgebildet.

Tabelle 2: Übersicht der unterschiedlichen Fragmentgrößen nach der Restriktionsanalyse mit *NcoI*:

| Plasmid-DNA    | Fragmentgrößen                       |
|----------------|--------------------------------------|
| pDT-TindDelp   | 5.645 nt, 9.316 nt, 6.300 nt, 312 nt |
| pKL-TindDelp1  | 14.943 nt, 6.300 nt, 312 nt          |
| pDT-0691aDelp  | 9.316 nt, 6.300 nt, 5.645 nt, 312 nt |
| pKL-0691aDelp2 | 14.941 nt, 6.300 nt, 312 nt          |

Wie in Abb. 14A) und 14B) zu sehen ist, zeigten sich die erwarteten Ergebnisse nach der Agarosegelelektrophorese.

Das Plasmid pKL-0691aDelp1 konnte mit dieser Restriktionsanalyse wieder nicht kontrolliert werden, da es hier keine Deletion einer Schnittstelle gibt, und somit kein unterschiedliches Bild auf einem Kontrollgel sichtbar wäre. Deswegen wurden von diesem Klonierungsansatz 4 Klone mit einer Sequenzierreaktion analysiert, und von pKL-0691aDelp2 und pKL-TindDelp1 jeweils 2. Von den insgesamt 8 Klonen konnten 6 als korrekt identifiziert werden.



B)

Abb. 14A) und 14 B): Mit Ethidiumbromid-gefärbte 1%ige Agarosegele für die Kontrolle auf die richtigen Deletionen mit der Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA plus *NcoI*, welche aus *E.coli* isoliert wurden. Marker GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder in 14A). In 14B) GeneRuler™ 100 bp Plus DNA-Ladder, unpassender Marker deswegen konnten die Banden nicht beschriftet werden. Alle Ansätze wurden mit dem Restriktionsenzym *NcoI* durchgeführt. Jeweils gegenübergestellt die Ausgangsplasmide mit den Zielvektoren, die aufgrund der Deletion eine *NcoI*-Schnittstelle weniger aufweisen.

#### **4.9 Expressionsstudien in *Sulfolobus solfataricus***

Für die Überprüfung der Funktionalität der mutierten Promotoren wurden sowohl die Ausgangs-, also auch die mutierten Plasmide für *in vivo* Studien zur Transformation von *S. solfataricus* M16 eingesetzt. Hier wurde angestrebt, durch ein verändertes Expressionslevel des Reports Informationen über UV-abhängige cis-regulatorische Elemente zu bekommen.

##### **4.9.1 Transformation von *S. solfataricus* und Gewinnung von Einzeltransformaten**

Für die Transformation von *S. solfataricus* M16 wurde eine Kultur in Arabinose-Trypton Medium plus Uracil inokuliert. Nachdem diese exponentiell angewachsen war, konnten die Plasmide pDT-TindDelp, pKL-TindDelp1, pDT-0691aDelp, pKL-0691aDelp1 und pKL-0691aDelp2 in M16 elektroporiert werden. Der Stamm M16 ist eine Uracil-auxotrophe Mutante. Das bedeutet, diese ist entweder auf die Zugabe von Uracil angewiesen, oder kann durch die transformierten Plasmide mit den *pyrEF*-Genen komplementiert werden. Durch das Fehlen des intakten Reportergens *lacS* kann die Mutante M16 keine eigene funktionelle  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren. Dadurch ist es möglich, mittels einer Blau/Weiß-Selektion die transformierten und nicht transformierten Kolonien zu unterscheiden.

Nach der Elektroporation und Regeneration wurden die Transformanten in Brock's Arabinose-Trypton Medium mit Uracil inokuliert. Die gemischten Transformanten wurden 4 Tage kultiviert und im Anschluss in das Selektionsmedium ohne Uracil überimpft. Dadurch war es möglich, auf die erfolgreich transformierten Zellen zu selektionieren. Nun wurden die Kulturen 5-7 Tage lang kultiviert, bis sie die exponentielle Wachstumsphase erreicht hatten.

Aus den erstellten Wachstumskurven war deutlich erkennbar, dass die Komplementation der Stammes M16 erfolgreich war. Die Mutante M16 zeigte mit der Zugabe von Uracil ein normales Wachstum, im Gegensatz zum Selektionsmedium ohne Uracil, in denen der Stamm nicht mehr wachsen konnte. M16 mit den Plasmiden transformiert zeigte ein langsames Wachstum zu Beginn, welches sich nach einiger Zeit wieder normalisierte. Dies war ein eindeutiges Indiz dafür, dass die Komplementation mit den *pyrEF* Genen erfolgreich stattgefunden hatte und dass sich der shuttle Vektor als Virus in der Kultur ausbreiten konnte.

Für die Gewinnung der Einzeltransformanten wurden verschiedene Verdünnungen der Mischkulturen auf Glucose-Trypton Platten mit Gelrite plattiert. Anschließend inkubierten die Platten bei 78°C in feuchter Atmosphäre. Nach 7-10 Tagen Inkubation waren Kolonien auf den Platten zu sehen, welche mit einer Dosis UV-Licht Dosis von  $75\text{J/m}^2$  bestrahlt und anschließend mit X-Gal besprüht wurden. Durch das Besprühen des Farbstoffes war es aufgrund der Blaufärbung möglich, positive Einzeltransformanten nachzuweisen. Nach einer Inkubation von etwa 20-30 Minuten zeigten sich die Blaufärbungen wie in Abbildung 15) dargestellt.

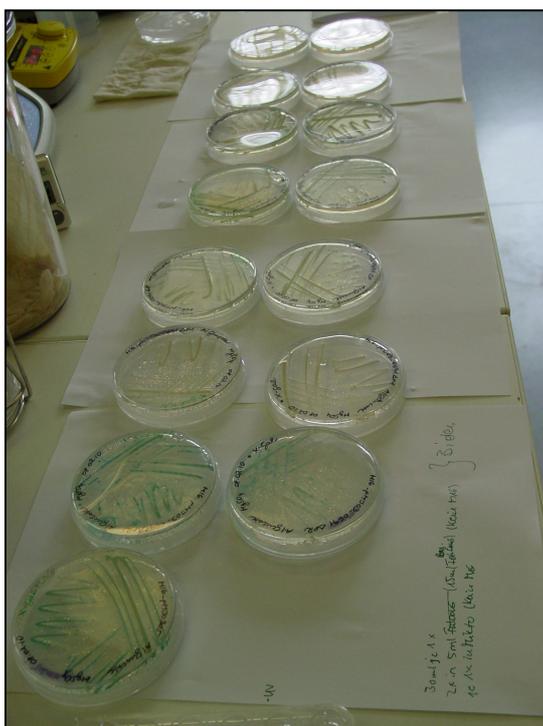


Abb. 15) Platten mit qualitativem Test auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach einer Bestrahlung von  $75\text{J/m}^2$  und anschließendem Besprühen der Platten mit X-Gal zur Identifizierung positiver Einzeltransformanten. Durch die Blau/Weiß Kennzeichnung der Kolonien konnte man zwischen den positiven, mit den Vektoren transformierten Kolonien aufgrund der Blau-Färbung und den weißen, untransformierten Kolonien unterscheiden.

Auf allen Platten zeigten sich blaue Kolonien mit unterschiedlicher Intensität. Davon wurden jeweils 4 Einzelkolonien gepickt und in unterschiedlichen Volumina mit Uracil inokuliert (1x 2ml Mikrotiterplatte, 2x 6 ml Reagenzglas, 1x 30 ml). Nach dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Einzeltransformanten wieder in das Selektionsmedium ohne Uracil angeimpft, um auf die plasmid-tragenden Transformanten zu selektionieren. Es wurden hiervon Wachstumskurven erstellt, die in Abb. 16) ersichtlich sind.

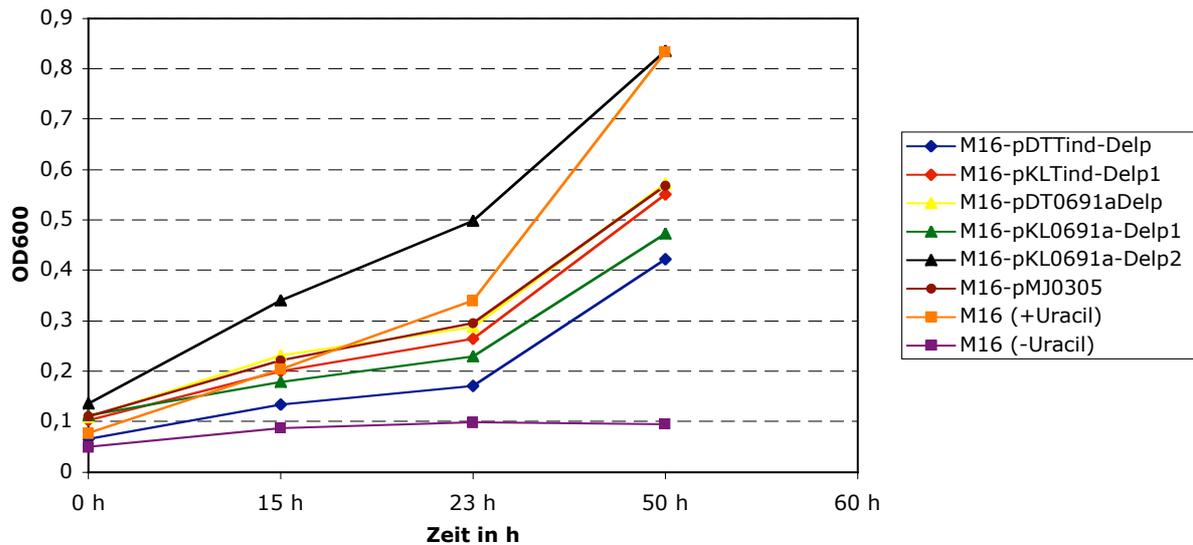


Abb. 16) Wachstumsverlauf der Einzeltransformanten im Selektionsmedium Arabinose-Trypton ohne Uracil.

In dieser Analyse ist erkennbar, dass es für die Uracil-auxotrophe Mutante M16 (violett) aufgrund des Fehlens der *pyrEF*-Gene nicht möglich war zu wachsen. Vergleicht man den Wachstumsverlauf der Mutante mit den transformierten Einzelkolonien, kann man einen deutlichen Wachstumsunterschied erkennen. Letztere zeigen am Anfang ein etwas langsames und verzögertes Wachstum, welches auf eine erfolgreiche Komplementation des Stammes M16 mit den *pyrEF* Genen hinweist, da das Virus wachstumsverzögernd wirkt.

Um eine weitere phänotypische Charakterisierung vorzunehmen, wurden die verschiedenen Transformanten nochmals auf Glucose-Trypton Platten ohne Uracil ausplattiert (Abbildung 17). Es zeigte sich ein ähnliches Wachstumsverhalten wie in den Arabinose-Trypton Flüssigkulturen, da auch hier M16-pKL0691a-Delp2 wiederum ein deutlicheres Wachstum aufwies als M16-pDT0691a-Delp und M16-pKL0691a-Delp1. Auch auf der Platte sichtbar, das bessere Wachstum der Mutante M16-pKLTind-Delp1 im Gegensatz zu weniger Kolonien der Transformanten M16-pDTTind-Delp.

#### **4.9.2 Überprüfung des Genotyps der Transformanten**

Die Gesamt-DNA der Primär- (+ Uracil), Sekundär- (-Uracil), und Einzeltransformanten wurde isoliert, um sie mittels PCR-Tests zu überprüfen. In Abbildung 18) ist eine Multiplex-PCR die mit 4 unterschiedlichen Primern (RATFw, RATRw, LeATrw und LeATFw) durchgeführt wurde. 2 Primer binden spezifisch für SSV1

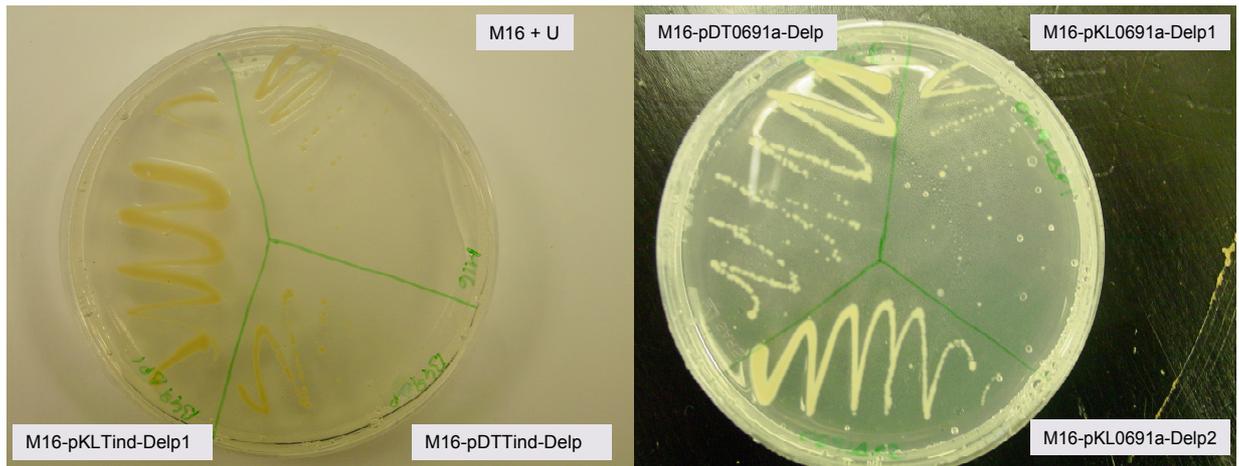


Abb. 17) Plattierung der Einzeltransformanten zur Charakterisierung des Phänotyps auf Glucose-Trypton Platten ohne Uracil.

SSV1 DNA und 2 weitere Primer binden stromauf und stromab der Integrationsstelle von SSV1 im *S. solfataricus* Chromosom. Je nachdem in welcher Form das SSV1-Plasmid in der Mutante M16 vorliegt (zirkulär oder integriert linear), sind verschieden lange Fragmente zu erwarten. Liegt das Plasmid frei in den Zellen von M16 vor, erwartet man eine Bande mit 359 nt und eine Bande das Chromosom mit 717 nt. Liegt der shuttle-Vektor integriert durch die sequenzspezifische Rekombination mit dem Chromosom von M16 vor, zeigt sich dies mit zwei Integrationsbanden von 482 nt für die linke Flanke, und von 562 nt für die rechte Flanke der attachment site (attP-Sequenz).

Auf dem Gel der Multiplex-PCR in Abbildung 18) sind in der Tasche 1-7 die Primärgemische der Transformanten angezogen aufgetragen. Deutlich zu erkennen ist, dass das jeweilige Plasmid frei in der Zelle mit einer starken Bande bei 359 nt vorliegt. In der Tasche 1 wurde zur Kontrolle M16 + Uracil aufgetragen, und eine leere chromosomale „attachment site“ mit 717 nt wurde wie erwartet amplifiziert.

Somit scheint die Elektroporation erfolgreich gewesen zu sein, mit der Ausnahme einer Einzeltransformante von pKL0691a-Delp2 (Spur 6 im Gelbild). In den Taschen 8-14 sind die PCR-Produkte der Transformanten aufgetragen, die im Selektionsmedium ohne Uracil kultiviert wurden. Hier können nur noch jene Zellen überleben, welche mit den pMJ0305-Derivaten transformiert wurden, und für die dadurch eine Komplementation der benötigten *pyrEF*-Gene erfolgte. Auch hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie das der Primärgemische. Der Unterschied besteht

#### 4. Ergebnisse

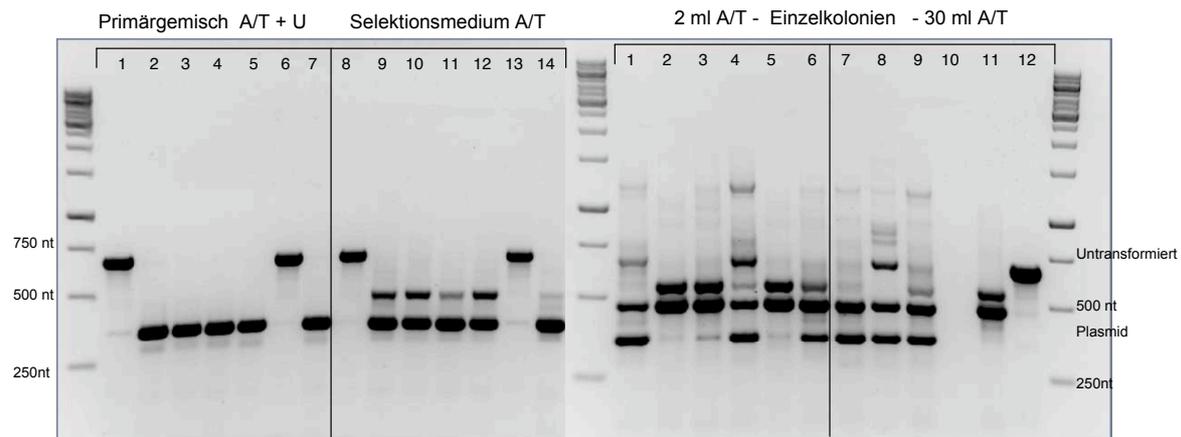


Abb. 18) Multiplex-PCR auf einem 1,5%igem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel zur Kontrolle auf die Transformation des Plasmids pMJ0305 mit den klonierten Promotorregionen der Gene  $T_{ind}$  und SSO0691a. 3 mögliche Produkte mit unterschiedlich großen Fragmenten. 717 nt leerer M16, 359 nt Plasmid, 482 nt Integration linke Flanke, 562 nt Integration rechte Flanke; Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix. 1) M16+U, 2) M16-pDTTind-Delp, 3) M16-pKLTindDelp1, 4) M16 – pDT0691a-Delp, 5) M16-pKL0691aDelp1, 6) pKL0691a-Delp2, 7) M16-pMJ0305, 8) M16+U, 9) M16-pDTTind-Delp, 10) M16-pKLTind-Delp1, 11) M16-pDT0691a-Delp, 12) M16-pKL0691aDelp1, 13) M16-pKL0691a-Delp2, 14) M16-pMJ0305, 1) M16-pDTTind-Delp, 2) M16-pKLTind-Delp1, 3) M16-pDT0691a-Delp, 4) M16-pKL0691aDelp1, 5) M16-pKL0691a-Delp2, 6) M16-pMJ0305, 7) M16-pKLTind-Delp1, 8) M16-pDT0601a-Delp, 9) M16-pKL0691aDelp1, 10) M16-pKL0691a-Delp2, 11) M16-pMJ0305, 12) M16+U

darin, dass es durch den Selektionsdruck zur Integration des Plasmids in das Chromosom gekommen ist. Dies ist durch die zusätzliche Bande mit einer Größe von 482 nt sichtbar. In der Spur 13 ist die Mutante M16-pKL0691a-Delp2 aufgetragen und eine stärkere Bande für den leeren Wildtyp im Gegensatz zur leichten Bande für den Vektor ist erneut sichtbar (linke Flanke). Somit konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die Transformation in diesem Fall nicht erfolgreich stattgefunden hatte. Nach einer Plattierung auf Glucose-Trypton Platten wurden nach einer 8-10 Tage langen Inkubation blaue Einzelkolonien gepickt und wieder in Selektionsmedium ohne Uracil gezogen. Diese sind in unterschiedlichen Arabinose-Trypton Volumina (2 ml und 30 ml) gewachsen, und das Multiplex-PCR Produkt wurde jeweils in Tasche 1-12 (rechte Hälfte Abbildung 18) aufgetragen. Auch hier stellt sich ein ähnliches Bild ein, wie das des Selektionsgemisches zuvor. Die große Bande für das Wirtsgenom M16 von 717 nt ist kaum in einer Kultur sichtbar. Hingegen scheint es, dass sich die unterschiedlichen Plasmide pDT und pKL erfolgreich in das Wirtsgenom integriert haben. In der Tasche 2, 3, 5, 6, 7, 8 und 9 sind sogar beide Integrationsbanden für die linke (482 nt) und rechte Flanke (562 nt) der attachment Stelle sichtbar. Soweit scheint die Transformation und die Integration der Plasmide für alle Transformanten außer M16-pKL0691a-Delp2 er-

folgreich gewesen zu sein. In der Spur 11 ist die Kontrolle mit dem transformierten Plasmid pMJ0305 aufgetragen, welches nun auch integriert vorliegt, und in 1 und 2 die Negativkontrolle für die untransformierte Mutante M16 mit 717 nt. Prinzipiell kann man sagen, dass die Integration der Vektoren im Selektionsmedium stattgefunden hat, während es ohne diesen Druck zu keiner Integration im Wirtsgenom kam. Die Einzeltransformanten enthielten nun die Plasmide, welche aufgrund chromosom- und plasmidspezifischer Primer nachgewiesen werden konnten.

Weiters wurde noch eine zweite Kontroll-PCR für das Reportergen mit den *lacS* spezifischen Primern angesetzt, welche in Abbildung 19) ersichtlich ist. Auch hier sind unterschiedliche Bandengrößen, je nachdem ob es sich um das *lacS* der Mutante oder des transformierten Vektors handelt, sichtbar. Das Reportergen *lacS* des Plasmids pMJ0305 weist eine kleinere Größe von 1,5 kb auf, während das gleiche Gen der Mutante durch ein Insertionselement unterbrochen ist, und dadurch im Agarosegel eine Bande von 2,5 kb zeigt.

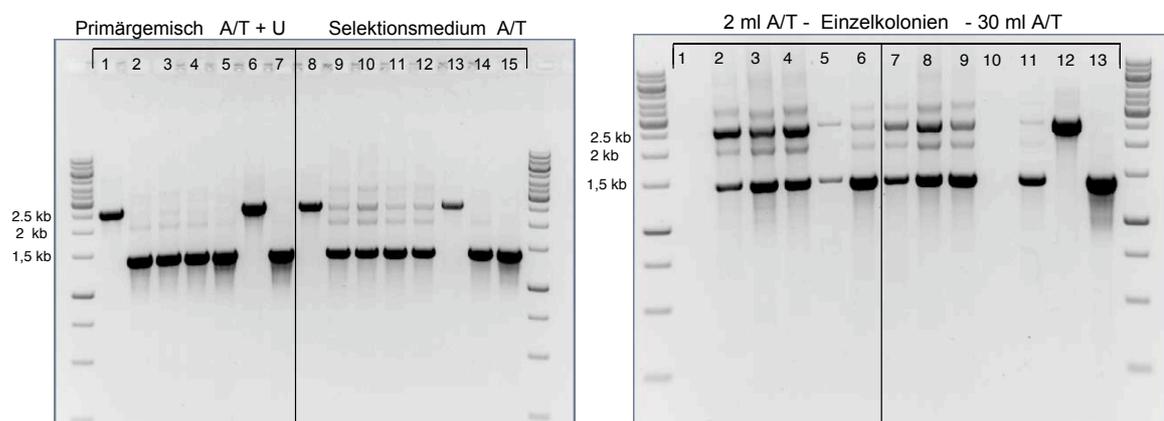


Abb. 19) 1,2%iges Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel zur Kontrolle der Transformation auf das Reportergen mittels *lacS*-PCR. Primärgemisch 1) M16+U, 2) M16-pDTTind-Delp, 3) M16-pKLTindDelp1, 4) M16-pDT0691a-Delp, 5) M16-pKL0691a-Delp1, 6) M16-pKL0691a-Delp2, 7) M16-pMJ0305, Selektionsmedium 8) M16+U, 9) M16-pDTTind-Delp, 10) M16-pKLTind-Delp1, 11) M16-pDT0691a-Delp, 12) M16-pKL0691a-Delp1, 13) M16-pKL0691a-Delp2, 14) M16-pMJ0305, 15) pDT-0691aDelp, Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix. 1) M16--pDTTindDelp, 2) M16-pKLTindDelp1, 3) M16-pDT0691aDelp, 4) M16-pKL0691aDelp1, 5) M16-pKL0691aDelp2, 6) M16-pMJ0305, 7) M16-TindDelp1, 8) M16-pDT0691aDelp, 9) M16-pKL0691a-Delp1, 10) M16-pKL0691aDelp2, 11) M16-pMJ0305, 12) M16 + U, 13) pDT0691aDelp, Marker GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Weiters wurde noch ein zweite Kontroll-PCR für das Reporter gen mit den *lacS* spezifischen Primern angesetzt, welche in Abbildung 19) ersichtlich ist. Auch hier sind unterschiedliche Bandengrößen, je nachdem ob es sich um das *lacS* der Mutante oder des transformierten Vektors handelt, sichtbar. Das Reporter gen *lacS* des Plasmids pMJ0305 weist eine kleinere Größe von 1,5 kb auf, während das gleiche Gen der Mutante durch ein Insertionselement unterbrochen ist, und dadurch im Agarosegel eine Bande von 2,5 kb zeigt.

#### **4.9.3 UV-Exposition der Einzeltransformanten**

Nachdem die Einzeltransformanten mittels Multiplex- und *lacS*-PCR erfolgreich nachgewiesen werden konnten, folgte die UV-Bestrahlung, um die Aktivität der Promotoren und somit die Expression des Reporter gens über die spezifische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase in den Zellen zu überprüfen.

Die Kulturen wurden erneut in Arabinose-Trypton Selektionsmedium angeimpft, und über Nacht bis zu einem Wachstum der exponentiellen Phase mit einer optischen Dichte von 0,2-0,4 gezogen. Dafür wurden die Transformanten in einem größeren Volumen von ca. 300-400 ml ohne Uracil angeimpft. Zusätzlich wurde M16 mit Uracil als Positivkontrolle in Arabinose-Trypton Medium inokuliert. Sobald die optimale Wachstumsphase erreicht war, konnte die UV-Bestrahlung mit einer Dosis von  $75\text{J/m}^2$  für 5 Sekunden durchgeführt werden. Für die Bestrahlung wurden die Kulturen in einen Kontroll- (gleiche Behandlung nur ohne UV-Exposition) und in einen UV-Licht behandelten Ansatz aufgeteilt, um den Wachstums- bzw. Aktivitätsunterschied darstellen zu können. Nach der UV-Induktion wurden die Kulturen nach einer kurzen Aufbewahrung im Dunkeln weiter auf  $78^\circ\text{C}$  inkubiert und es wurde stündlich das Wachstum gemessen. Außerdem wurden auch noch DNA-, RNA- und Proteinproben zu verschiedenen Zeitpunkten für weitere Analysen abgenommen.

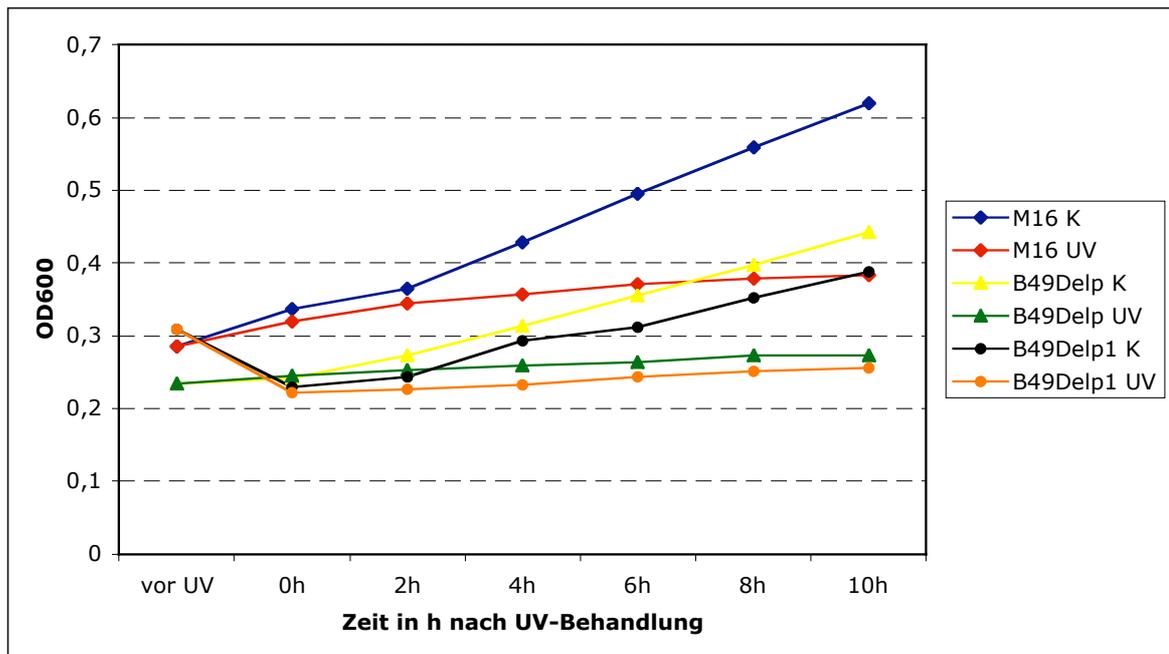


Abb. 20) Wachstumskurve der Einzeltransformanten M16, M16-pDTTind-Delp und M16-pKLTind-Delp1. M16 wurde in Brock's Arabinose-Trypton Medium plus Uracil kultiviert, während die transformierten Kulturen jeweils in Selektionsmedium kultiviert wurden. Jeweils gegenübergestellt eine Kontrolle und UV-induziert mit  $75\text{J/m}^2$ .

#### **4.9.4. Phänotypische Charakterisierung der Einzeltransformanten nach der UV-Bestrahlung mittels Wachstumskurven**

Wie in Abbildung 20) sichtbar, stellt sich für die Kontrollkultur M16 in Brock's Arabinose-Trypton Medium mit Uracil, das schnellste Wachstum ein. Grund dafür ist, dass es sich hier um die untransformierte Mutante M16 handelt, welche nicht mit dem Virus SSV1 infiziert wurde.

Wird eine Kultur mit SSV1 und den SSV1-Derivaten (pMJ0305, pDT und pKL) transformiert, stellt sich eine Wachstumsverzögerung aufgrund der Vermehrung des Transformationsplasmids ein. Gegenübergestellt in dieser Abbildung ist jeweils eine Kontrollkultur (gleiche Behandlung nur ohne Exposition mit einer Dosis von  $75\text{J/m}^2$  für 5 Sekunden) und die gleiche Kultur nach UV-Bestrahlung. Auch hier sind die Unterschiede eindeutig zu vermerken. Ein wichtiger Hinweis für eine erfolgreiche UV-Bestrahlung ist das verzögerte Wachstum der bestrahlten Kulturen im Gegensatz zur Kontrolle. Die Kontrollkulturen weisen immer ein schnelleres Wachstum auf.

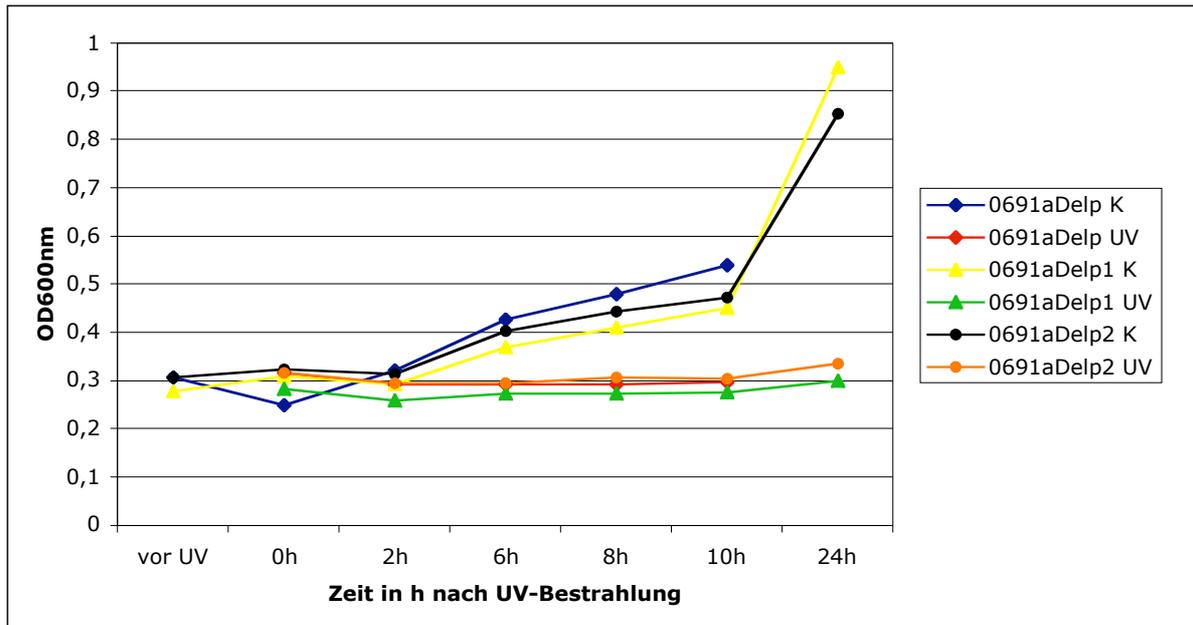


Abb. 21) Wachstumskurve der Einzeltransformanten M16-pDT0691a-Delp, M16-pKL0691aDelp1 und M16-pKL0691aDelp2 in Brock's Arabinose-Trypton Selektionsmedium ohne Uracil kultiviert. Jeweils gegenübergestellt eine Kontroll-Kultur und eine UV-induzierte.

Betrachtet man die UV-bestrahlten Kulturen stellt man fest, dass diese eigentlich kaum noch in der Lage sind hochzuwachsen und eigentlich im Wachstum stagnieren. Genau der gleiche Effekt ist in den restlichen Einzeltransformanten in der Abbildung 21) zu beobachten. Alles in allem konnte man darauf schließen, dass die Kulturen durch das UV-Licht induziert zu sein scheinen.

#### **4.9.5. Quantitativer Test der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität**

Nach dem Abnehmen der Proben von den UV-bestrahlten- und Kontrollkulturen, wurde ein quantitativer Test der Einzeltransformanten zum Nachweis auf die UV-Induzierbarkeit der unterschiedlich langen Promotoren von den Genen  $T_{ind}$  und SSO0691a auf die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase durchgeführt.

Als erstes wurden die Zellpellets von 10 ml Kultur in 500  $\mu$ l 10 mM Tris/HCl Puffer pH 8 aufgenommen. Danach folgte ein Aufschließen der Zellen durch mehrmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff, und anschließendem Erhitzen auf 65°C. Dann zentrifugierte man für 30 Minuten und konnte nun die Membranfraktion und die überflüssigen Zelltrümmer abtrennen. Der flüssige Überstand wurde abgenommen und dieser für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford und den anschließenden Aktivitätstests weiterverwendet.

Prinzipiell ist nach einer UV-Bestrahlung eine zunehmende spezifische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase durch die Induktion der Promotorregionen der Einzeltransformanten M16-T<sub>ind</sub> und M16-SSO0691a im Gegensatz zu den Kontrollkulturen messbar.

#### **4.9.6 Quantitativer Test der $\beta$ -Galaktosidase des veränderten Mutationspromotors T<sub>ind</sub>**

Die Promotorregion von T<sub>ind</sub> wurde um weitere 18 Nukleotide mittels der SLIM-PCR im Vorvektor pSVA11 auf 52 nt deletiert. Somit ist die gesamte restliche Promotorregion stromab des Transkriptionsstarts +1 gelöscht, und der Translationsstart ATG ist nun identisch mit diesem. Durch die Deletion dieser Region wurde keine gravierende Veränderung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität erwartet, was auch in der Abbildung 22A) und 22B) bestätigt werden konnte. Dargestellt sind die absoluten Werte und die x-fache Induktion des Enzyms nach der UV-Induktion der Kulturen.

In Abbildung 22A) ist ersichtlich, dass die Einzeltransformanten (grün M16-pDTTindDelp Ausgangspromotor, orange M16-pKLTindDelp1 Mutante) nach einer UV-Bestrahlung eine zunehmende spezifische Aktivität des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase bis zu 10 h aufweisen. Betrachtet man die Werte der Aktivität des Enzyms vor der UV-

A)

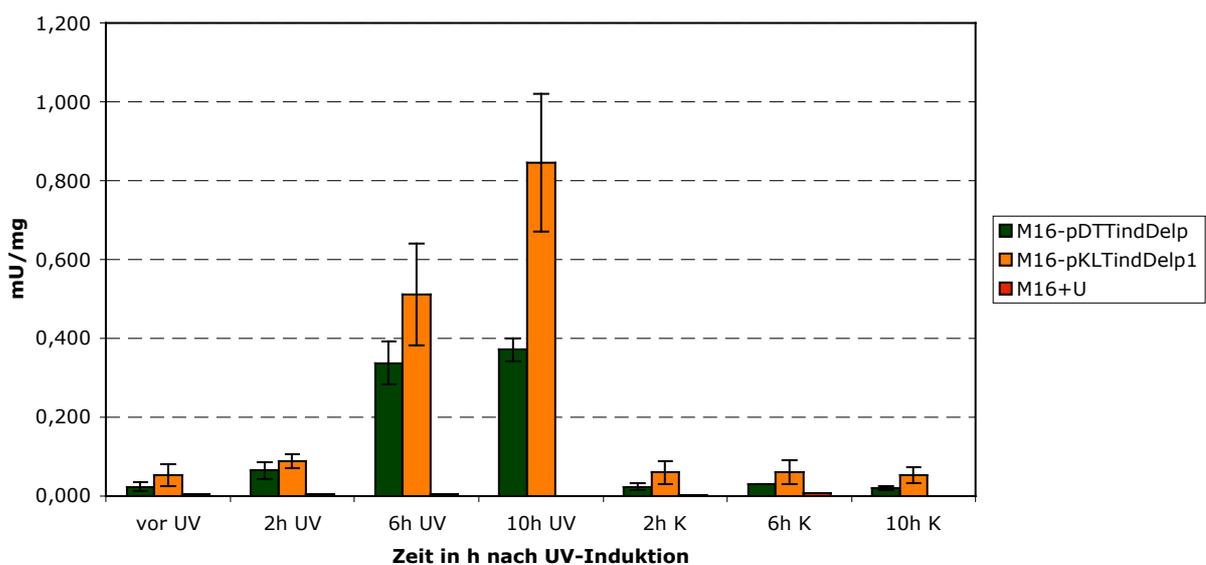
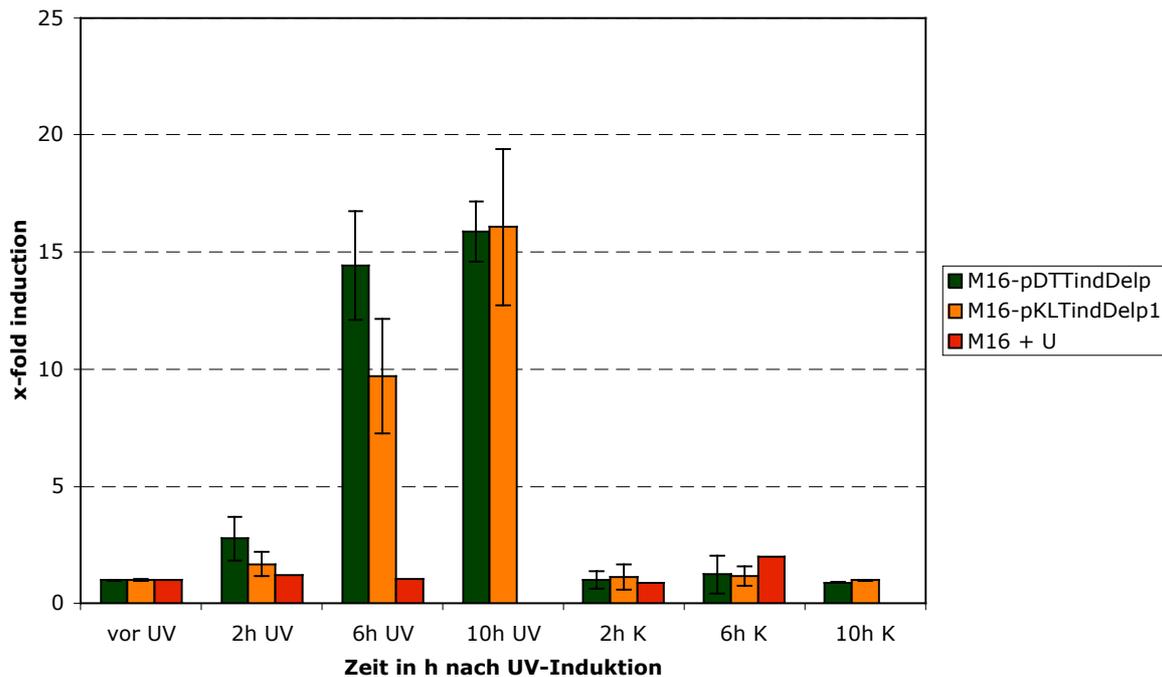


Abb. 22 A) Quantitativer Test der  $\beta$ -Galaktosidase (absolute Werte 22A, x-fache Induktion 22 B) der Einzelkolonien mit dem transformierten Ausgangspromotor M16-pDTTindDelp und der Mutante M16-pKLTindDelp1. In rot die nicht transformierte Negativkontrolle M16 + Uracil.



22B)

Exposition, ist hier kaum etwas messbar. Vergleicht man die vor UV-Werte mit der Negativkontrolle der Mutante M16 (in rot dargestellt), ist ein Unterschied der Induktion ersichtlich. Danach kommt es zu einem gleichmäßigen Anstieg der Aktivität über die Zeit mit dem höchsten Wert für den Ausgangspromotor M16-pDTTind-Delp von ca. 0,4 mU/mg. In orange ersichtlich die spezifische Aktivität des Enzyms des verkürzten Promotors der Mutante M16-pKLTind-Delp1. Diesem UV-induzierbaren Promotor wurden 18 nt stromabwärts des Transkriptionsstarts deletiert, und wie es scheint hat er bei 10 h nach UV-Bestrahlung einen höheren Wert der Aktivität von ca. 1 mU/mg. Rechts im Bild dargestellt die Kontrollkulturen, welche gleich behandelt wurden nur ohne UV-Bestrahlung. Diese weisen eine gleichbleibende Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase über die Zeit auf, wieder vergleichbar mit den Werten vor UV-Bestrahlung. Somit konnte bestätigt werden, dass die spezifische Aktivität des Enzyms auf die UV-Induktion der Promotoren zurückzuführen ist, und nicht auf die Behandlung der Kulturen.

Abbildung 22B) zeigt ebenfalls den quantitativen Test der  $\beta$ -Galaktosidase mit der x-fachen Induktion von M16-pDTTind-Delp, M16-pKLTind-Delp1 über die Zeit. Die x-fache Induktion der Promotoren bezieht sich jeweils auf die erhaltenen Werte vor der UV-Bestrahlung und hat daher eine Induktion von 1. Bei 2 h nach der UV-

Bestrahlung ist kaum ein Unterschied für die x-fache Induktion verglichen mit vor UV vermerkbar. Aber bei 6 h nach UV-Bestrahlung ist ein deutlicher Anstieg der UV-Induktion von fast 17fach für die Einzeltransformante M16-pDTTind-Delp, und für die Einzeltransformante M16-pKLTind-Delp1 von 13fach erreicht. Bei 10 h nach UV-Bestrahlung stellt sich wieder die höchste Induktion ein, wobei auch hier höhere Werte für die verkürzte Einzeltransformante M16-pKLTind-Delp1 gemessen werden konnte. Rechts in Abbildung 22B) wieder die Kontrollkulturen mit den gleich bleibenden Werten, nicht mehr induziert als vor UV-Exposition, also nicht erhöht.

#### **4.9.7 Quantitativer Test der $\beta$ -Galaktosidase der veränderten Mutationspromotoren SSO0691a**

In der Promotorregion für das UV-induzierbare Gen SSO0691a wurden 2 verschiedene Verkürzungen durchgeführt. In der ersten Deletion wurden 18 nt direkt stromaufwärts der „TATA“-Box entfernt. In der Abbildung 24) ersichtlich ist der quantitative Test auf die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität mit den absoluten Werten in mU/mg

Auch hier wurden die Messungen von zwei Einzeltransformanten für ein biologisches Replikat verwendet. Beide wiesen keine Induzierbarkeit des Promotors mehr auf, je-

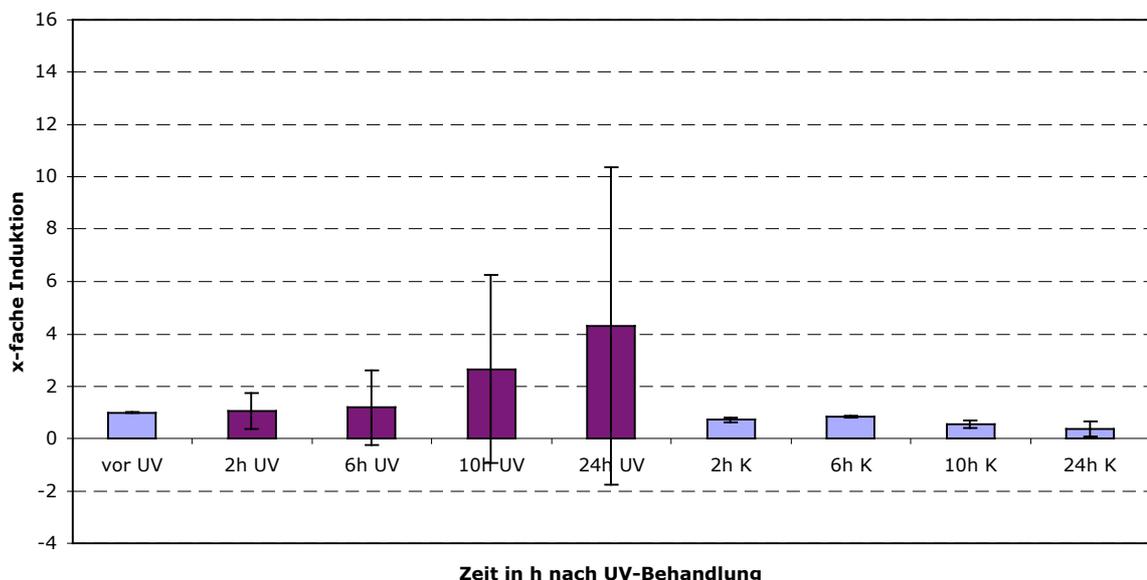


Abb. 23) Quantitativer Test der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität als x-fache Induktion dargestellt. Nach UV-Bestrahlung zeigt das biologische Replikat der beiden vermessenen Einzeltransformanten der Mutante M16-pKL0691a-Delp1 große Standardabweichungen. In blau dargestellt die Kontrollkulturen mit schwachen Standardabweichungen und in violett die UV-induzierten Kulturen von M16-pKL0691a-Delp1.

doch unterschieden sie sich so stark, dass die statistische Auswertung der Einzeltransformante M16-pKL-0691a schwierig war und für die Darstellung eines biologischen Replikats nicht verwendet werden konnte. Daher wurde jede Einzeltransformante als Duplikat vermessen und getrennt dargestellt.

In Abbildung 23) klar ersichtlich ist die große Standardabweichung des biologischen Replikats von 2 Einzelkolonien. Deswegen konnte für diese Mutante ein Vergleich zur Einzeltransformante des Ausgangspromotors M16-pDT0691a nur mit einem quantitativen Test der  $\beta$ -Galaktosidase für die absoluten Werte der beiden Einzelkolonien separat durchgeführt werden. Diese sind unterschiedlich bezeichnet als MT (gezogen in einer Mikrotiterplatte mit 2 ml Brock's Basalsalz-Medium) und als SC (Einzelkolonie in 30 ml Selektionsmedium gezogen).

In Abbildung 24) sind die Ergebnisse dem Ausgangspromotor M16-pDT0691a-Delp gegenübergestellt. Aus dem Diagramm ist die ansteigende Induzierbarkeit des Promotors der Einzeltransformante M16-pDT0691a-Delp in grün ersichtlich. Die Aktivität des Enzyms für den Ausgangspromotor erreichte einen Wert von 0,6 mU/mg und war höher als die Mutante M16-pKL0691a-Delp1 bei beiden Einzelkolonien. Mit Hilfe der absoluten Werte des quantitativen Tests für die Aktivität des Enzyms sind nun die Unterschiede zwischen den beiden Einzelkolonien sichtbar. Während die Einzelkolonie MT in rot keine Aktivität zeigt, sieht man in orange die Kolonie SC mit einer 10fach

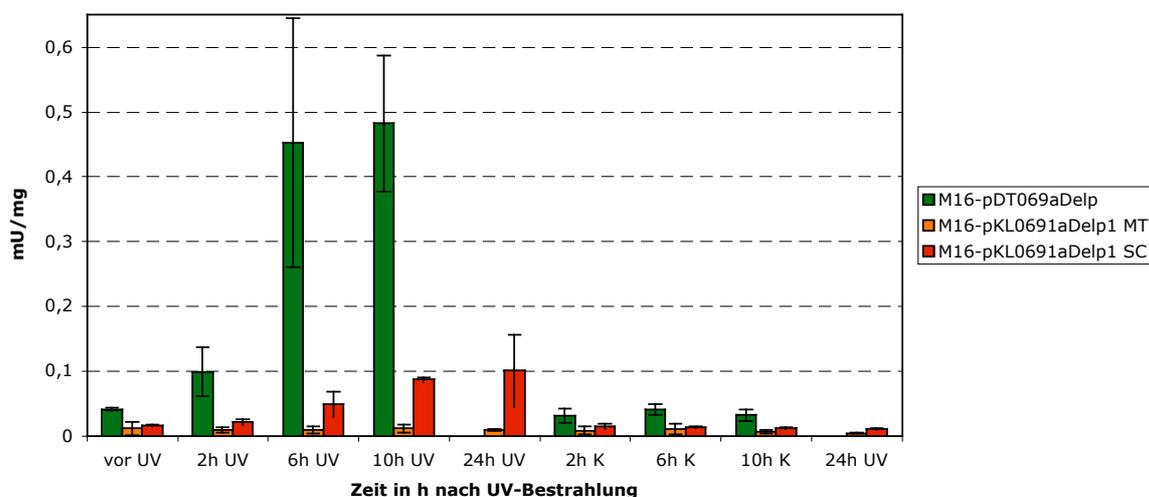


Abb. 24) Quantitativer Test auf die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität der Mutanten M16-pDT0691aDelp in grün, M16-pKL0691aDelp1 in orange und M16-pKL0691aDelp2 in rot mit den absoluten Werten in mU/mg. MT=Einzelkolonie gezogen in einer Mikrotiterplatte; SC=Einzelkolonie in 30 ml Selektionsmedium inokuliert.

höheren Aktivität. Vergleicht man die Werte mit den Kontrollkulturen, welche nicht mit UV-Licht bestrahlt wurden, sind diese ungefähr gleich mit den UV-behandelten Kulturen der Mutante M16-pKL0691a-Delp1 vor UV.

Um die Ursache für die unterschiedlichen  $\beta$ -Galaktosidase Werte zu eruieren, wurde eine Sequenzierreaktion mit spezifischen *lacS*-Primern angesetzt. Diese binden vor und im Reporter gen und somit konnte die Promotorregion auf eventuelle spontane Mutationen analysiert werden. Wie im Anhang ersichtlich, konnten die Promotorsequenzen für die beiden Einzelkolonien (MT und SC) der Mutante M16-pKL0691aDelp1 als komplett identisch nachgewiesen werden. Auch aus der phänotypischen Charakterisierung mittels einer Wachstumskurve konnte kein unterschiedliches Verhalten nachgewiesen werden (Abb. 25). In dieser Wachstumskurve ist wieder das verzögerte und kaum noch vorhandene Wachstum der UV-behandelten Kulturen verglichen mit den Kontrollkulturen ersichtlich. Auch wenn hier der Grund für die verschiedene kaum vorhandene spezifische Aktivität nicht eindeutig geklärt werden konnte, steht fest, dass ein wichtiges Element für die *archaeale* Transkription deletiert wurde, und somit der Promotor des Gens SSO0691a nicht mehr induziert werden konnte.

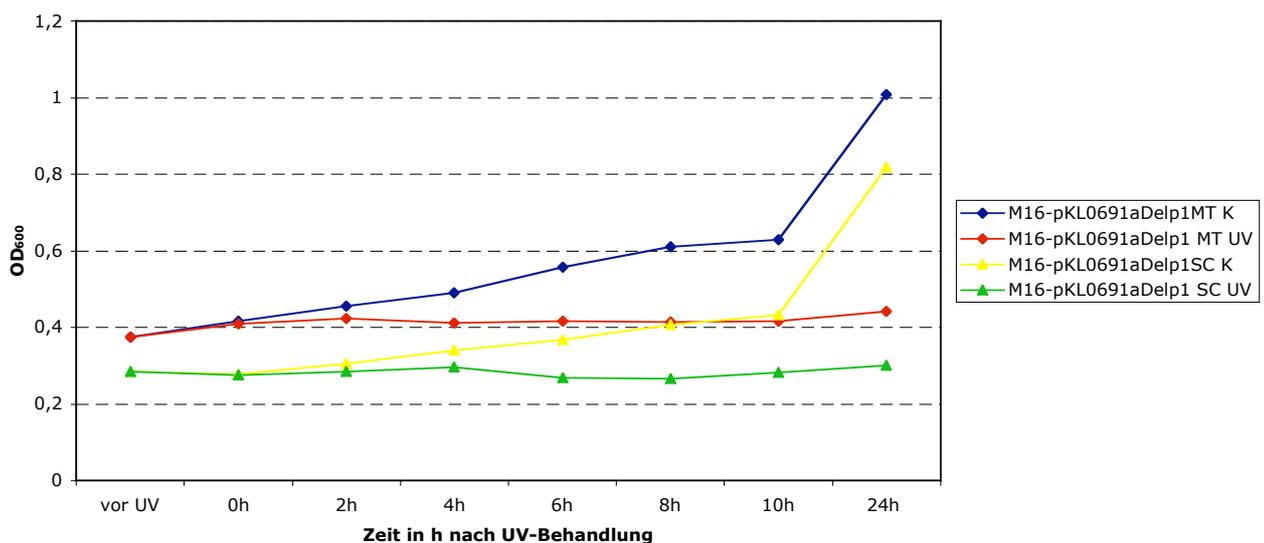


Abb. 25) Wachstumskurve der Einzelkolonien MT und SC der Mutante M16-pKL0691a-Delp1. Jeweils gegenübergestellt die Kontrollkultur mit der UV-behandelten Kultur.

Die zweite Mutation, die in der Promotorregion des UV-induzierbaren Gens SSO0691a durchgeführt wurde, befindet sich direkt stromabwärts des Transkriptionsstartpunkts +1 und die Deletion umfasst 29 nt (Abb. 29). Somit wurde der vollständige 5'UTR-Bereich (untranslated region) mit 8 nt bis zum Startcodon ATG des Reportergens *lacS* deletiert. Der TSS befindet sich dadurch gleich neben dem dem ATG für den Translationsstart (CATG).

In der folgenden Abbildung 26) zeigt sich das Ergebnis für die x-fache Induktion des Promotors der Mutante M16-pKL0691a-Delp2. Auffällig ist, dass die UV-induzierte Kultur von M16-pKL0691a-Delp2 keine signifikant höhere Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase zeigt als die Kontrollkultur.

Die Kontrolle mit der basalen Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase, welche in einer Zeitspanne von 2 h bis 24 h gemessen wurde ist hier in blau zu sehen. Links davon die UV-bestrahlte Kultur von M16-pKL0691a-Delp2, mit einer leicht kontinuierlichen Steigung der x-fachen Induktion bis zu einem Wert von 1.5fach. In Abbildung 27) sind zusammenfassend nochmal die Ergebnisse der x-fachen Induktion von der Mutante M16-pKL0691a-Delp2 verglichen mit der Einzeltransformante M16-pDT0691a-Delp (Ausgangspromotor) und der BRE-Mutante M16-pKL0691a-Delp1 abgebildet. Aus der Ge-

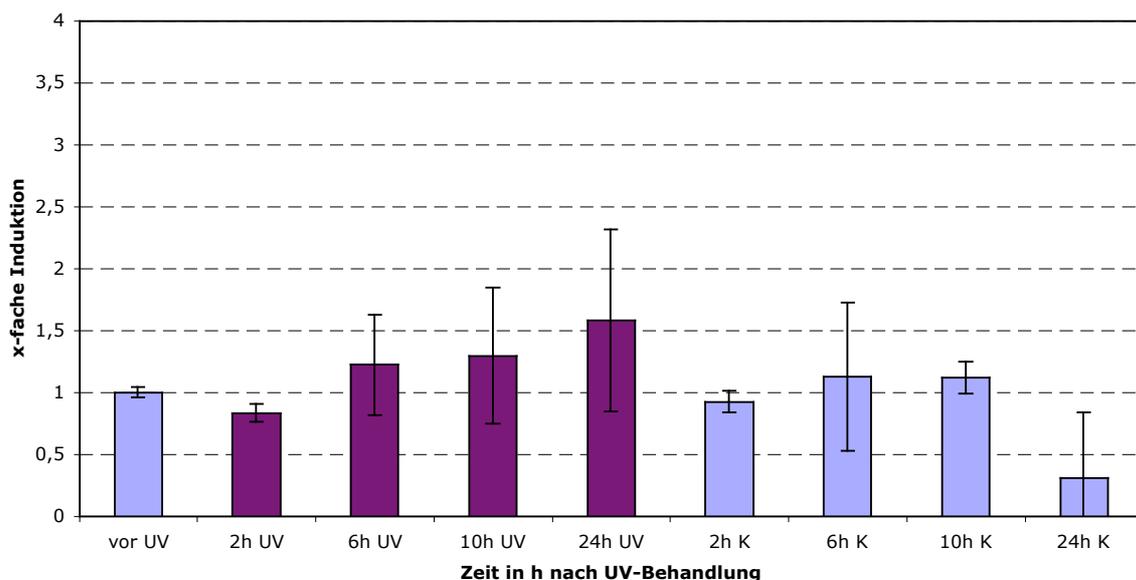


Abb. 26) Spezifische  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität mit den Werten der x-fachen Induktion des Promotors der Mutante M16-pKL0691a-Delp2 vor und nach UV-Bestrahlung. In blau dargestellt die Kontrollkulturen.

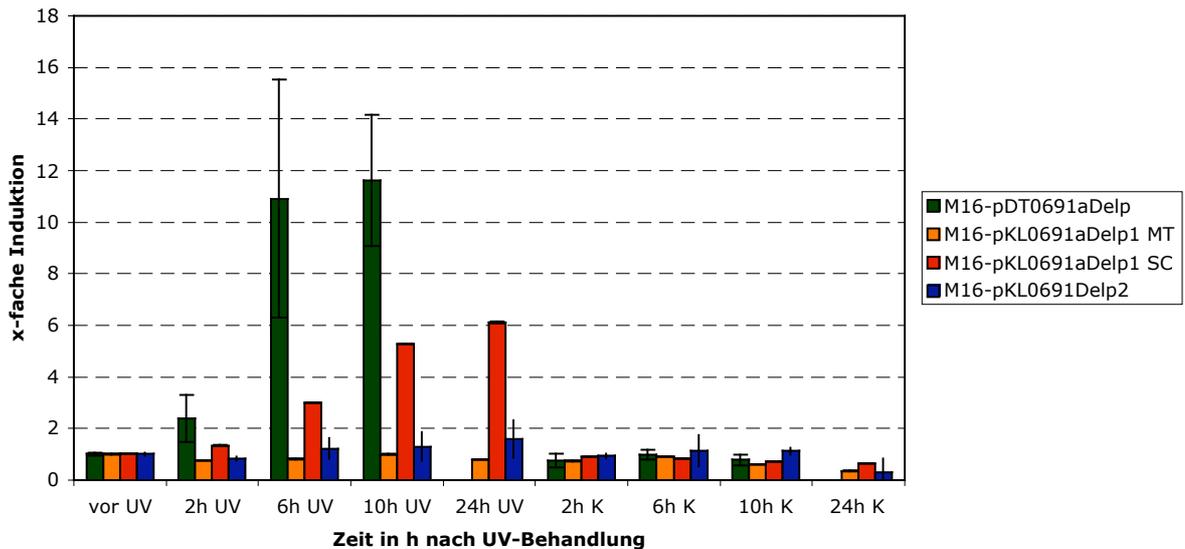


Abb. 27) Quantitativer Test auf die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase mit den Werten der xfachen Induktion von M16-pDT0691a-Delp (grün), M16-pKL0691a-Delp1 (orange) MT, M16-pKL0691a-Delp1 (rot) SC und M16-pKL0691aDelp2 (blau).

genüberstellung in diesem Diagramm sind deutlich die Unterschiede in der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität sichtbar. In grün der bis zu 16fach durch UV-Bestrahlung induzierte Ausgangspromotor der Einzeltransformante M16-pDT0691a-Delp, und im Vergleich dazu in blau die Aktivität von M16-pKL0691a-Delp2, welche im Bereich der Kontrollkulturen liegt. Auch hier bezieht sich die x-fache Induktion der Promotoren jeweils auf die erhaltenen Werte vor UV-Bestrahlung und hat daher eine Induktion von 1.

Dieses Ergebnis führte zur Annahme, dass durch die Deletion ein regulatorischer Faktor nicht mehr an die DNA binden kann und es dadurch nicht mehr zur transkriptionellen Induktion kommt. Die zweite Folgerung war, dass es durch den fehlenden Sequenzabschnitt zu keiner vollständigen Translation mehr kommen könnte, wodurch ebenfalls weniger Protein umgesetzt würde.

Um zu überprüfen, ob es sich bei diesem Ergebnis um eine Regulation auf transkriptioneller oder translationeller Ebene handelt, wurde ein Northern Blot zum Nachweis der induzierten Expression der  $\beta$ -Galaktosidase durchgeführt.

#### 4.10 Northern Blot Analyse von M16-SSO0691a-Delp2

Die Gesamt-RNA der Proben von M16-pDT0691a-Delp (Ausgangspromotor) und von M16-pKL0691a-Delp2 von verschiedenen Zeitpunkten wurde isoliert, und diese quantitativ und qualitativ überprüft. Als nächstes wurden für die Northern-Hybridisierung je 5 µg der RNA-Proben von M16-pDT0691a-Delp und M16-pKL0691a-Delp2 auf einem denaturierenden 1,2 %igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert.

Auf das denaturierende Agarosegel wurden jeweils 4 verschiedene Zeitpunkte nach UV-Induktion von den Stämmen M16-pDT0691a-Delp als Kontrolle und M16-pKL0691a-Delp2, plus einer dazugehörigen Kontrolle ohne UV-Bestrahlung und zusätzlich eine Negativkontrolle mit M16, UV-bestrahlt, aufgetragen. Nach dem Blotten wurde die Nylonmembran gewaschen, nachdem sie mit einer DIG-markierten dsDNA-Sonde von *lacS* hybridisiert worden war (Abb. 28). Wie auf der Nylonmembran ersichtlich ist, war die RNA-Konzentration nicht vollkommen gleichmäßig, jedoch ist die Intensität der 23S rRNA und der 16S rRNA jeder Probe zueinander gleich stark, was auf keinen Abbau der RNA deutet.

Das erwartete Ergebnis der Northern Blot Analyse sollte einen Unterschied der UV-bestrahlten- und Kontrollkultur anhand der Transkriptmenge von *lacS* mRNA aufwei-

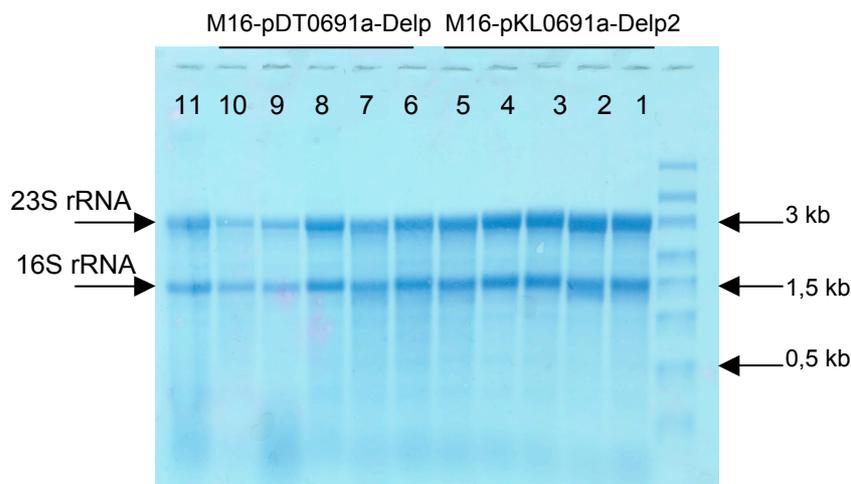


Abb. 28) Northern-Blot Analyse zum Nachweis des *lacS*-Transkripts der Einzeltransformante M16-pKL0691a-Delp2 mit 1) vor der UV-Induktion, 2) 2 h UV, 3) 6 h UV, 4) 10 h UV, 5) 6 h K und M16-pDT0691a-Delp, M16-pDT0691a-Delp mit 6) vor UV, 7) 2 h UV, 8) 4 h UV, 9) 8 h UV, 10) 6 h K und eine Negativkontrolle M16 + U 11) 6 h UV, Methylenblau gefärbte Nylonmembran zum Nachweis der 23S rRNA und 16S rRNA.

sen. Außerdem sollte der Versuch Aufschluss darüber geben, ob die schwächere Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase der Einzeltransformante M16-pKL0691a-Delp2 ein Resultat eines nicht mehr bindenden transkriptionellen Faktors an die DNA ist, oder einer nicht mehr vollständig ablaufenden Translation.

Das *lacS*-Transkript zeigte die erwartete Größe von 1,6 kb auf dem Röntgenfilm. Für M16-pDT0691a-Delp (Ausgangspromotor) sah man wie erwartet einen Anstieg der Intensität der Transkriptmenge über die Zeit von vor UV bis zu 8 h nach UV-Bestrahlung. Eigentlich sollte man eine zunehmend stärker werdende Bande für das 1,6 kb sehen, jedoch ist auf dem Röntgenfilm in der Abbildung 29) ein zunehmender Schmier erkennbar. Dennoch ist die kontinuierlich stärker werdende 1,6 kb Bande für das *lacS*-Transkript detektierbar, mit einem Maximum bei 8 h nach UV- Bestrahlung. Hier kommt es offensichtlich zu einer starken Expression des Reportergens *lacS* durch die UV- Induktion des Promotors des Gens SSO0691a. In der Spur 11 befindet sich die Negativkontrolle M16 bei 6 h nach UV-Bestrahlung. Hier ist keine spezifische *lacS*-Bande erkennbar, dh es wurde wie erwartet kein detektierbares *lacS*-Transkript gebildet.

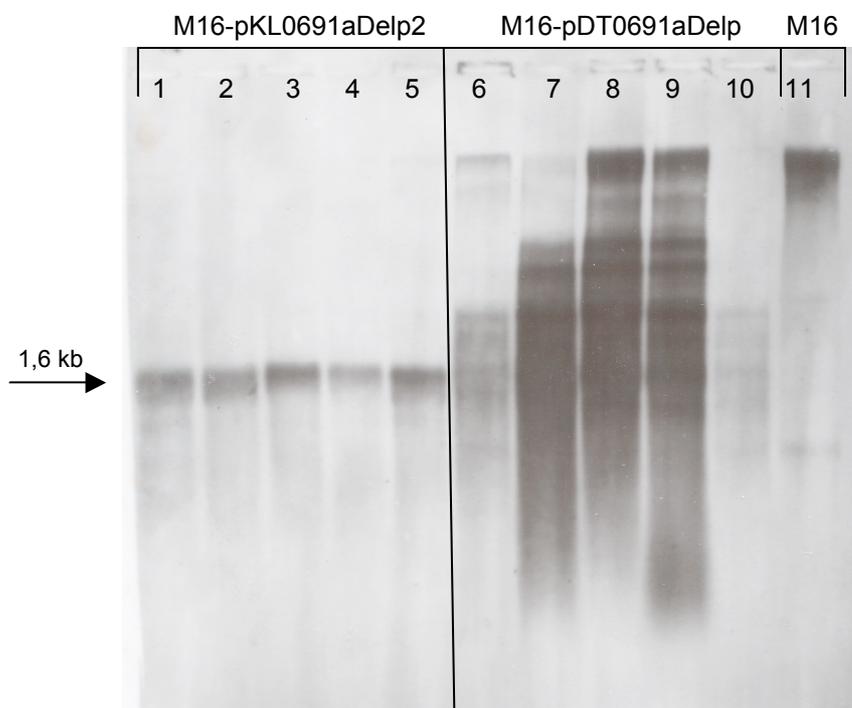


Abb. 29) Northern-Blot Analyse zum Nachweis des *lacS*-Transkripts der Einzeltransformante M16-pKL0691a-Delp2 mit 1) vor der UV-Induktion, 2) 2 h UV, 3) 6 h UV, 4) 10 h UV, 5) 6 h K und M16-pDT0691a-Delp, M16-pDT0691a-Delp mit 6) vor UV, 7) 2 h UV, 8) 4 h UV, 9) 8 h UV, 10) 6 h K und eine Negativkontrolle M16 + U 11) 6 h UV, Röntgenfilm, Dedektion mit einer DIG-markierten dsDNA-Sonde von *lacS*.

In der Spur 1-5 ist die Mutante M16-pKL0691a-Delp2 mit der Deletion von 29 nt sichtbar. Die Northern-Blot Analyse bestätigt die Ergebnisse des quantitativen Tests auf die spezifische Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase. Auf dem Röntgenfilm ist die gleichbleibende basale Transkription durch die konstante Expression der 1,6 kb langen *lacS*-mRNA, erkennbar.

Insgesamt lässt sich hier sagen, dass mittels der Northern-Blot Analyse auf RNA-Ebene das *lacS*-Transkript nachgewiesen werden konnte, und eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Aktivitätstests festgestellt werden konnte.

## **5. Diskussion**

In dieser Diplomarbeit wurden die Promotorregionen von zwei stark UV-induzierbaren Genen aus *S. solfataricus*, SSO0691a und das erste Transkript des *Sulfolobus shibatae* Virus SSV1 T<sub>ind</sub> auf mögliche *cis*-regulatorische Transkriptionselemente untersucht. Diese beiden Gene gehören zu den am stärksten induzierten nach UV-Bestrahlung der Zellen (Fröls *et al.*, 2007). Weiters konnte in einer zuvor durchgeführten Diplomarbeit gezeigt werden, dass eine UV-induzierte Transkription im Reportersystem von *S. solfataricus* darstellbar ist (Teichmann 2007).

Basierend auf diesen Promotorstudien wurden in dieser Arbeit mittels einer Mutagenese-PCR verschiedene Deletionen vorgenommen, und die verkleinerten Konstrukte wurden vor das Reportergen *lacS* in den *shuttle* Vektor pMJ0305 kloniert. Nach einer Transformation von *Sulfolobus solfataricus* M16 wurden Tests auf die Induzierbarkeit der Promotorregionen mittels Expressionsstudien des Reportergens *lacS* durchgeführt. Außerdem wurden die beiden Promotorregionen noch mittels Alignments mit anderen induzierten Genen von *S. solfataricus* und homologen Genen anderer *Sulfolobales* Spezies auf eventuell vorhandene *cis*-regulatorische Elemente analysiert.

### **5.1 Vergleichende Charakterisierung der UV-induzierten Promotorsequenzen**

Beide Promotorregionen von T<sub>ind</sub> und SSO0691a weisen keine eindeutigen Konsensusmotive für die basalen Transkriptionselemente einer TATA-Box oder eines direkt stromaufwärts liegenden BRE-Elements auf. Im Falle von T<sub>ind</sub> wurde dies schon von Reiter *et al.* (1987) beschrieben. Außerdem kann man hier auch keine Shine-Dalgarno-Sequenzen im 5'UTR Bereich finden, welcher in *Bacteria* (und manchmal auch in *Archaea*) für die Initiation der Translation wichtig ist. Im Falle der Promotorregion von SSO0691, konnte der experimentel bestimmte Transkriptionsstart auf 188 nt stromauf des annotierten Translationsstarts determiniert werden. Dies würde eine sehr lange 5'UTR Region darstellen. Tatsächlich deutet ein konservierter, kleiner offener Leserahmen in dieser Region auf ein

weiteres Gen hin, SSO0691a. Auch in einer Publikation von Wurtzel *et al.* (2009), basierend auf der Transkriptom-Analyse des gesamten Genoms von *Sulfolobus solfataricus* P2 wurde die Transkription von 0691a bestätigt. Aufgrund dieser Analyse ist der 5'UTR-Bereich 8 nt lang. Interessanterweise war es auch in dieser Studie nicht möglich, einen eigenen Transkriptionsstart für das Gen SSO0691 zu finden. Dies bestätigt das Ergebnis der Primer-Extension-Reaktionen, bei denen es ebenfalls nicht möglich war, den TSS für das Gen zu finden. Das bedeutet höchstwahrscheinlich, dass die beiden Gene als Operon vorliegen und co-transkribiert werden.

Außerdem wurde in dieser Analyse auch festgestellt, dass in den meisten Transkripten von *Sulfolobus* P2 keine 5'UTR-Sequenzen gefunden werden konnten. Dies wurde auch in einer anderen Studie von Brenneis *et al.* (2007) in *Haloarchaea* gezeigt, und selbst jene, die eine 5'UTR aufwiesen beinhalteten meistens keine Shine-Dalgarno-Sequenz.

In dieser Arbeit wurden einige Gene der Transkriptomanalyse herausgesucht (Wurtzel *et al.*, 2009), welche in der Studie von Fröls *et al.* (2007) als UV-induziert identifiziert werden konnten. Beim Vergleich der Promotorregionen konnte festgestellt werden, dass nur ein Teil der UV-induzierbaren Promotorsequenzen einen 5'UTR-Bereich aufweisen. Die 5'-untranslatierten Regionen haben eine unterschiedliche Länge zwischen 3 und 36 nt, jedoch ohne erkennbare Shine-Dalgarno-Sequenz.

Bei weiterer Betrachtung der stromauf des Transkriptionsstartpunkts liegenden Sequenzen, konnten keine gemeinsamen potentiellen *cis*-regulatorischen Elemente identifiziert werden. Deswegen wurden auch die stromabwärts liegenden Basen genauer analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass diejenigen Gene, die einen 5'UTR-Bereich aufweisen, ähnliche Sequenzabfolgen (TAAG, TAAAG, TAAAAAG usw.) in dieser Region besitzen (Abbildung 3). Durch diese Entdeckung könnte man vermuten, dass der 5'UTR Bereich der UV-induzierbaren Gene von *Sulfolobus solfataricus* vermutlich eine wichtige Rolle für die Regulation der Transkription darstellen könnte, und dass hier eventuell eine Bindestelle für einen UV-spezifischen Transkriptionsregulator vorzufinden wäre.

Aufgrund dieser Informationen war es nun interessant, sich zusätzlich die Promotorsequenz für das Gen SSO0691a in den nah verwandten *Sulfolobales* anzusehen. Hierfür wurde erneut eine Sequenzstudie mittels eines Alignments vorgenommen. Das Ergebnis dafür war jedoch nicht aussagkräftig, es zeigte nur, dass *S. islandicus* der einzige Stamm neben *S. acidocaldarius* und *S. tokodaii* ist, der ebenfalls ein solches Sequenzmotiv aufweisen könnte (Abbildung 4).

## **5.2 Untersuchung der UV-aktivierbaren Promotoren im Reportersystem von *Sulfolobus solfataricus***

Für die Promotorregionen von den beiden stark UV-induzierbaren Genen  $T_{ind}$  und SSO0691a wurden verschiedene Deletionen zur Identifizierung von *cis*-regulatorischen Elementen durchgeführt. Für  $T_{ind}$  wurde eine Deletion hinter dem TSS geplant und somit wurde das ATG des Reportergens *lacS* auf die Transkriptionsstartstelle gelegt. Im Falle von SSO0691a wurden zwei Verkürzungen geplant, wobei einmal die Region entfernt wurde, die normalerweise das BRE-Element enthält und in der zweiten Deletion wurde die 5'UTR-Region entfernt.

Nachdem die Promotordeletionen in dem Vorvektor pSVA11 erfolgreich durchgeführt waren, konnten die verkürzten Promotoren in den *shuttle* Vektor pMJ0305 kloniert werden, um diesen anschließend in die *S. solfataricus* PH1 Mutante M16 einzubringen. Dadurch war es möglich *in vivo* Expressionsstudien mit dem Reportergen  $\beta$ -Galaktosidase durchzuführen, denn die Mutante ist durch eine Unterbrechung des entsprechenden chromosomalen Gens nicht imstande, eine funktionelle  $\beta$ -Galaktosidase auszubilden. Durch die Transformation des *shuttle* Vektors war es durch das Einbringen der *pyrEF*-Gene möglich, die auxotrophe Mutante M16 zu komplementieren. Diese erfolgreiche Komplementation konnte durch das typische langsamere Wachstum der Primärtransformanten im Selektionsmedium aufgezeigt werden. Nach der Gewinnung von Einzeltransformanten über Glucose-Trypton Platten, wurde der erste qualitative Test auf die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach einer UV-Bestrahlung mit einer Dosis von  $75\text{J/m}^2$  und ohne Bestrahlung durchgeführt. Hierfür wurden die Einzeltransformanten mit dem Farbstoff X-Gal besprüht und nach ca. einer halben Stunde stellte sich jeweils auf den Platten eine Blaufärbung ein (Abbildung 15). Ein erkennbarer Un-

terschied im Bezug auf die Blaufärbung der Transformanten, je nachdem ob sie vor der Besprühung mit dem Farbstoff nicht bestrahlt, oder mit UV-Licht bestrahlt wurden, konnte gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wies die nicht-transformierte Negativkontrolle M16 weder ein Wachstum im Selektionsmedium noch auf den Glucose-Trypton Platten auf, da aufgrund der fehlenden Uracil-Prototrophie die notwendigen Überlebensbedingungen nicht geschaffen werden konnten.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine Dosis von  $75\text{J/m}^2$  ausreichend ist, um einen UV-induzierbaren Promotor zu aktivieren, und eine Expression des Reportergens *lacS* in den Transformanten herbeizuführen.

Die positiven blauen Kolonien wurden gepickt und konnten erfolgreich als Inokulum für Arabinose-Trypton Medium verwendet werden. Sie zeigten ein gutes Wachstum, obwohl sie zuvor mit UV-Licht bestrahlt und mit dem Farbstoff X-Gal besprüht worden waren (Abbildung 16). Ein außergewöhnlich schnelles Wachstum im Verhältnis zu den anderen Mutanten, welches sogar schneller war als das der Positivkontrollen, zeigte die Einzeltransformante M16-pKL0691a-Delp2. Demnach war hier eine Veränderung des Phänotyps M16-pKL0691a-Delp2 erkennbar. Außerdem zeigte dieser bei der Multiplex-Kontroll-PCR auch das Bild, als wäre die Transformation von pKL-0691a-Delp2 in M16 nicht erfolgreich gewesen. Das gleiche Ergebnis stellte sich für die zweite Kontroll-PCR auf das Reportergen *lacS* ein. Ein etwas unwahrscheinlicher Grund für das aufgetretene Phänomen der Mutante M16-pKL0691a-Delp2 wäre eine Rekombination der *pyrEF*-Gene des Plasmids mit dem *pyrEF*-Locus im Chromosom von M16, um den Wildtyp-Phänotyp wiederherzustellen. Hier ist aber zu erwähnen, dass sich dieses Erscheinungsbild nur für das Primärgemisch und das Selektionsmedium zeigte. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den anschließend gewonnenen Einzelkolonien, kann man auch bei M16-pKL0691a-Delp2 eine erfolgreiche Integration des Shuttlevektors in das Wirtsgenom erkennen.

Für den quantitativen Test auf die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurden die Kulturen bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 mit einer Dosis von  $75\text{J/m}^2$  UV-Licht für fünf Sekunden bestrahlt. Anschließend wurde das Wachstum der Kontrollkulturen (gleiche Behandlung nur ohne Bestrahlung) und die der bestrahlten Kulturen

verglichen, wodurch eine Wachstumsverzögerung aufgrund einer erfolgreichen UV-Bestrahlung zu vermerken war (Abbildung 20 und 21).

Beim Test zum Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität konnte für die längere Promotorsequenz von M16-pDTTindDelp ein maximaler Wert von ca. 12 mU/mg, und somit eine 7fache UV-Induzierbarkeit des Promotors gemessen werden. Dieser Promotor wurde in der Arbeit von Daniela Teichmann von 141 bp auf 70 bp verkürzt, und wies dadurch nur eine minimale Reduktion der spezifischen Aktivität des Enzyms auf. Im Zuge einer Mutagenese-PCR in dieser Arbeit wurden die 70 bp auf 52 bp gekürzt, und dabei der Bereich stromab des Transkriptionsstarts (gleichzeitig der Translationsstart) bis zum ATG des Reportergens *lacS* deletiert. In der Abbildung 24A) ist eine zunehmende spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nach UV-Bestrahlung bis zu 10 h ersichtlich. Der höchste messbare Wert für die Aktivität des Ausgangspromotors M16-pDTTind-Delp war bei 0,4 mU/mg Zellprotein. Im Vergleich damit zeigte die verkürzte Mutante M16-pKLTind-Delp1 sogar etwas höhere Werte mit 1 mU/mg Gesamtprotein. Betrachtet man die x-fache Induktion dieser beiden Einzeltransformanten, auf die Werte vor UV bezogen, sieht man für den Ausgangspromotor pDT mit 70 bp eine Induktion von 17fach. Diese ist minimal geringer als das Ergebnis für die auf 52 bp verkürzte Promotorregion mit einer Induktion von 19fach. Demnach kann man schließen, dass sich in der 18 bp Deletion des SSV1-Transkripts keine Bindestellen für einen regulatorischen Transkriptionsfaktor befindet da es hier zu keinem Rückgang bezüglich der UV-abhängigen Expression des Reportergens *lacS* gekommen ist.

Ein anderes Bild zeigte sich für den am stärksten induzierten Promotor der UV-spezifisch regulierten Gene mit der Deletion von 18 bp, direkt stromauf der „TATA-Box“ bis zur Restriktionsschnittstelle von *AvrII*. Hierdurch wurde die Region stromauf der potenziellen TATA-Box deletiert. Bei der Vermessung der Promotoraktivitäten konnte keine Transkription des Reportergens *lacS* mehr festgestellt werden. Dennoch verhielten sich die Replikate etwas unterschiedlich und konnten deshalb nur als Duplikate der Einzeltransformanten dargestellt werden (in Abbildung 27 ersichtlich). Es wurde versucht die Ursache für die verschiedenen Werte zu eruieren. Ein Verdacht war, dass es hier eventuell zu einer spontanen Mutation im Promotorbereich einer der Transformanten kam, aber dieser konnte

aufgrund einer Sequenzier-Reaktion nicht bestätigt werden (Abbildung 31). Eine weitere recht unwahrscheinliche Möglichkeit für die abweichenden Werte könnte eine Veränderung in der Sequenz von *lacS* sein, welche hier aber nicht kontrolliert wurde. Weiters könnte ein Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Einzeltransformanten sein, dass möglicherweise durch die Transformation des Vektors in die Mutante mehr Plasmid in der Zelle vorlag und es dadurch zu einer höheren messbaren Expression des Reportergens *lacS* kommen konnte.

Dennoch war es überraschend, dass aufgrund der Deletion der Region, in der sich wahrscheinlich das BRE-Element befindet, keine Expression des Reportergens *lacS* mehr messbar war. Deswegen kann man daraus schließen, dass dieser Bereich eine wichtige Funktion für die basale Aktivierung der Transkription darstellt.

Ein anderes Bild im Bezug auf die UV-Induzierbarkeit zeigte sich im zweiten hergestellten Promotorkonstrukt von SSO0691a-Delp2. Hier wurden 29 bp direkt stromab des Transkriptionsstarts, inklusive dem 8 nt langen 5'UTR-Bereich bis zum ATG des Reportergens *lacS*, deletiert. Unter anderem wurde hier zusätzlich der natürlich vorkommende Translationsstart GUG entfernt und somit das Startcodon des *lacS* direkt neben den Transkriptionsstart gesetzt. Somit handelt es sich hier um eine ähnliche Deletion wie im Promotor des Gens  $T_{ind}$ , nur um 11 nt länger. Am Resultat für die x-fache Induktion des verkürzten Promotors ist zu erkennen, dass die UV-induzierte Kultur von M16-pKL0691a-Delp2 kaum eine höhere Aktivität der spezifischen  $\beta$ -Galaktosidase zeigt, als die Kontrollkultur (Abbildung 26). Dadurch dass die Expression des Reportergens über einen Zeitverlauf von 24 h nur auf ein 1,5faches stärker induziert vorliegt als vor UV, kann davon ausgegangen werden, dass ein regulatorischer Transkriptionsfaktor nicht mehr an die deletierte DNA-Sequenz binden kann. Wie schon zuvor diskutiert, wurde in der 5'UTR-Region des Promotors von SSO0691a-Delp2 eine unterschiedliche lange A/T reiche Sequenz (TAAG, TAAAG, TAAAAAG usw.) in fast allen an der UV-Regulation beteiligten Gene mit 5'UTR-Bereich identifiziert. Eventuell könnte hier eine Bindestelle für einen Regulationsfaktor positioniert sein. Möglicherweise kann auch der generelle Transkriptionsfaktor TFB nicht mehr

vollständig binden, da seit kurzem vermutet wird, dass A/T-reiche Abschnitte in der Promotorsequenz als zusätzliche Bindestellen für diesen dienen (Torarinsson *et al.*, 2005, Peng *et al.*, 2009). Eine andere Überlegung für die nur kaum vorhandene UV-Induktion war, dass es durch den fehlenden Sequenzabschnitt nicht mehr zu einer vollständigen Initiation der Translation kommen kann. Weiters besteht auch noch die Möglichkeit, dass durch die Deletion des natürlich vorkommenden Startcodons GUG eine korrekte Erkennung der mRNA am Ribosom nicht mehr möglich ist, und dadurch ein nicht mehr korrektes oder zu kurzes Protein prozessiert wird.

Um folglich zu überprüfen, ob es sich bei dem Ergebnis des quantitativen Tests auf die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase um eine Regulation auf transkriptioneller oder translationeller Ebene handelt, wurde ein Northern Blot zum Nachweis der Expression von *lacS*-mRNA durchgeführt.

### **5.3 Northern Blot Analyse von M16-pKL0691a-Delp2**

Um die Regulation des Gens SSO0691a auf mRNA-Ebene zu analysieren, wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Dadurch sollte ersichtlich werden, ob es sich bei dem eingestellten Ergebnis der Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase von M16-pKL0691a-Delp2 um einen transkriptionellen oder translationellen Effekt handelt.

Das Ergebnis zeigte, dass trotz der fehlenden 29 bp eine Bildung von mRNA möglich ist. Ein deutlicher Unterschied zur Kontrolle M16-pDT0691a-Delp auf *lacS*-mRNA Level ist erkennbar. Durch die zunehmende Intensität des Signals der *lacS*-Sonde konnte gezeigt werden, dass es nach der UV-Induktion über eine Zeitspanne von 8 h zu einer stärkeren Expression des Reportergens (Abbildung 32) kommt. Auf dem Röntgenfilm ist ein immer stärker werdender Schmier erkennbar, der zum Teil allerdings auch auf unspezifische Hybridisierung zurückzuführen sein könnte.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass mit der Northern Blot Analyse erfolgreich gezeigt werden konnte, dass bei der verkürzten Mutante M16-pKL0691a-Delp2 zwar mRNA gebildet wird, das Signal jedoch gleich stark wie die Kontrolle ist. Somit konnte das Ergebnis des quantitativen Tests auf das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase bestätigt werden. Daher wurde anscheinend eine wichtige Binde-

stelle für ein regulatorisches Element zur Transkription deletiert, wobei es sich um einen Aktivator handeln könnte. Grund für diese Annahme ist, dass im Falle eines nicht mehr bindenden Aktivators es zu keiner Verstärkung der Expression des *lacS*-Reportergens mehr kommen kann, was dieses gleichbleibende starke Signal der 1,6 kb großen Bande erklären könnte.

## 6. Ausblick

Die Identifizierung des *cis*-regulatorischen Elementes in der Promoterregion von SSO0691a eröffnet nun die Möglichkeit, das entsprechende regulatorische Protein aus Rohextrakten von UV-induzierten *S. solfataricus* Zellen zu isolieren. Hierzu könnte beispielsweise das *in vitro* Transkriptionssystem von *Sulfolobus* verwendet werden. Mit dem Promoter, der das Element enthält, sowie der RNA Polymerase und der basalen Transkriptionsfaktoren könnte *in vitro* Transkriptionsaktivität vermessen werden, die sich mithilfe von UV-bestrahltem Zellextrakt verstärken lassen sollte. Eine Fraktionierung des Zellextraktes kann so zur Anreicherung oder Reinigung eines Aktivators führen. Alternativ könnte das kurze identifizierte *cis*-regulatorische Element dazu genutzt werden, um über Bindungsassays ein Protein direkt aus UV-induzierten Extrakten zu „fischen“. Hierzu könnte das Sequenzelement an magnetische Beads gekoppelt werden.

Zur Identifizierung weiterer *cis*-regulatorischer Elemente UV-spezifischer Transkriptionsregulatoren, könnte außerdem ein Mutagenese-Screening durch eine Raster-Mutationsanalyse der gekürzten Promotoren durchgeführt werden, die anschließend im Reportersystem getestet werden müssten.

## **7. Literaturverzeichnis**

Bell, S.D. (2005), *Archaeal* transcriptional regulation – variation on a *bacterial* theme? Trends in Microbiology 13: 262-265

Bell, S.D., Magill, C.P., Jackson, S.P. (2001) Basal and regulated transcription in *archaea*. Biochemical Society 4: 392-395

Bell, S.D., Cairns, S.S., Robson, R.L. and Jackson, S.P. (1999a) Transcriptional regulation of an *archaeal* operon *in vivo* and *in vitro*. Mol. Cell. 4, 971-82

Bell, S.D., Jackson, S.P. (1998) Transcription and translation in *archaea*: a mosaic of *eukaryal* and *bacterial* features. Trends in Microbiology 6

Brenneis, M., Hering, O., Lange, C. and Soppa, J. (2007) Experimental Characterization of *Cis*-Acting Elements Important for Translation and Transcription in *Halophilic Archaea*. PLoS Genet 3: 229

Brinkman, A.B., Bell, S.D., Lebbink, R.J., de Vos, W.M., and Van der Oost, J. (2002) The *Sulfolobus solfataricus* Lrp-like protein LysM regulates lysine biosynthesis in response to lysine availability. J Biol Chem 277: 29537-29549

Brock, T.D., Brock, K.M., Belly, R.T., Weiss, R.L. (1972) *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing *Bacteria* living at low pH and high temperature. Arch. Microbiol. 84: 54-68

Brochier-Armanet, C., Bousseau, B., Gribaldo, S., Forterre, P. (2010) Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing *archaea* supports the phylum *Thaumarchaeota*. Nature Reviews Microbiology 6: 245-252

Chiu, J., Tillett, D., Dawes, I.W. and March, P.E. (2008) Site-directed. Ligase-independent Mutagenesis (SLIM) for highly efficient mutagenesis of plasmids greater than 8 kb. Journal of Microbiological Methods 73: 195-198

Elkins, J.G., Podar, M., Graham, D.E., Makarova, K.S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B.P., Brochier-Armanet, C., Kunin, V., Anderson, I., Lapidus, A., Goltsman, E., Barry, K., Koonin, E.V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N., Wanner, G., Richardson, P., Keller, M., Stetter, K.O. (2008) A *korarchaeal* genome reveals insights into the evolution of the *Archaea*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105(23):8102-7

Fröls, S., White, M.F., Schleper, C. (2009) Reactions to UV-damage in the model *archaeon Sulfolobus solfataricus*. Biochem. Society Transactions 37:1

Fröls, S., Ajon, M., Wagner, M. Teichmann, D., Zolghadr, B., Folea, M., Boekerna, E.J., Arnold, J.M., Driessen, Schleper, C., Albers, S-V. (2008) UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic *archaeon Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. Mol. Microbiology 70: 938-952

Fröls, S., Gordon, P. M.K., Panlilio, M.A., Duggin, I.G., Bell, S.D., Sensen, C.W., Schleper, C. (2007) Response of the Hyperthermophilic *Archaeon Sulfolobus solfataricus* to UV Damage. Journal of Bacteriology 8708-8718

- Fröls, S., Gordon, P.M.K., Panlilio, M.A., Schleper, C., Sensen, C.W. (2007) Elucidating the transcription cycle of the UV-inducible hyperthermophilic *archaeal* virus SSV1 by DNA microarrays. *Virology* 365: 48-59.
- Garret, G.A. and Klenk, H.P. (2007), „*Archaea* Evolution, Physiology and Molecular Biology“ by Blackwell Publishing Ltd. ISBN: 978-1-14051-4404-9
- Guillière, F., Peiseiro, N., Kessler, A., Raynal, B., Desnoues, N., Keller, J., Delepierre, M., Prangishvili, D., Sezonov, Guennadi, Guijarro, J.I. (2009) Structure, Function, and Targets of the Transcriptional Regulator SvtR from the Hyperthermophilic *Archaeal* Virus SIRV1. *J. Biol. Chem.* 284: 22222-22237
- Grünberg, S., Bartlett, M.S., Naji, S., And Thomm, M. (2007) Transcription factor E is a part of transcription elongation complexes. *J Biol Chem* 282: 35482-35490
- Grogan, D.W., (1989) Phenotypic characterization of the *archaeobacterial* genus *Sulfolobus*: comparison of five wild type strains. *J. Bacteriol.* 171: 6710-6719
- Hain, J., Reiter, W.D., Hüdepohl, U., Zillig, W. (1992), Elements of an *archaeal* promoter defined by mutational analysis, *Nucleic Acids Research* 20:5423-8
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166(4):557-80
- Hausner, W., Wettach, J., Hethke, C. and Thomm, M. (1996), Two transcription factors related with the *eucaryal* transcription factors TATA-binding protein and transcription factor II B direct promoter recognition by an *archaeal* RNA-polymerase. *J Biol Chem* 271, 30144-8
- Hofacker, A., Schmitz, K.M., Cichoncyk, A., Sartorius-Neef, S. and Pfeiffer, F. (2004) GvpE- and GvpD-mediated transcription regulation of the p-gvp genes encoding gas vesicles in *Halobacterium salinarum*. *Microbiology* 150: 1829-1838
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C. and Stetter, K.O. (2002), A new phylum of *archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417: 63-67
- Jonuscheit, M., Martusewitsch, E., Stedman, K.M., Schleper, C. (2003) A reporter gene system for the hyperthermophilic *archaeon* *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative *shuttle* vector. *Mol. Biol.* 48: 1241-1252
- Kessler, A., Brinkman, A.B., van der Oost, J., Prangishvili, D., (2004) Transcription of the rod-shaped viruses SIRV and SIRV2 of the hyperthermophilic *archaeon* *Sulfolobus*. *J. Bacteriol.* 186 (22), 7745-7753
- Krüger, K., Herrmann, T., Armbruster, V., Pfeifer, F., (1998) The transcriptional activator GvpE for the *halobacterial* gas vesicle genes resembles a basic region leucine-zipper regulatory protein. *J.Mol.Biol.* 279:761-771
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P., Zillig, W. (1995), Transcription in *archaea*: Similarity to that in *eukarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5768-5772
- Martin, A., Yeats, S., Janekovic, D., Reiter, W.D., Aicher, W., Zillig, W. (1984) SAV 1, a temperate UV-inducible DNA virus-like particle from the *archaeobacterium* *Sulfolobus acidocaldarius* isolate B12. *EMBO J.* 3(9):2165-8

- Martusewitsch, E., Sensen, C.W., Schleper, C. (2000) High spontaneous Mutation rates in Hyperthermophilic *Archaeon Sulfolobus solfataricus* Is Mediated by Transposable Elements. *Journal of Bacteriology* 2574-2581
- Moracci, M., Ciaramella, M., Rossi, M. (2001) Beta-glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *Methods Enzymol.* 330: 201-15.
- Muskhelishvili, G., Palm, P., Zillig, W. (1993) SSV1-encoded site-specific recombination system in *Sulfolobus shibatae*. *Mol Gen Genet.* 237: 334-342
- Napoli, A., van der Oost, J., Sensen, C.W., Charlebois, R.L., Rossi, M., Ciaramella, M. (1999) An Lrp-like protein of the hyperthermophilic *archaeon Sulfolobus solfataricus* which binds to its own promotor. *Journal of Bacteriology* 181: 1474-1480
- Orphan, V.C., Hinrichs, K.U., Ussler, W. 3rd, Paull, C.K., Taylor, L.T., Sylva, S.P., Hayes, J.M., Delong, E.F. (2001) Comparative analysis of methane-oxidizing *archaea* and sulfate-reducing *bacteria* in anoxic marine sediments. *Environ Microbiol* 67(4): 1922-34
- Ouhammouch M., Geiduschek, E.P. (2005) An expanding family of *archaeal* transcriptional activators.. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(43):15423-8
- Ouhammouch, M., Dewhurst, R.E., Hausner, W., Thomm, M., and Geiduschek, E.P. (2003) Activation of *archaeal* transcription by recruitment of the TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5097-5102
- Palm, P., Schleper, C., Grampp, B., Yeats, S., McWilliam, P., Reiter, W.D., Zillig, W. (1991) Complete nucleotide sequence of the virus SSV1 of the *archaeobacterium Sulfolobus shibatae*. *Virology* 185: 242-250
- Peeters, E., Thia-Tonog, T.L., Gigot, D., Maes, D., and Charlier, D. (2004) Ss-LrpB, a novel Lrp-like regulator of *Sulfolobus solfataricus* P2, binds cooperatively to three conserved targets in its own control region. *Mol Microbiol* 54: 321-336
- Peeter, E., Albers, S.V., Vassart, A., Driessen, A.J.M., Charlier, D. (2009) Ss-LrpB, a transcriptional regulator from *Sulfolobus solfataricus*, regulates a gene cluster with a pyruvate ferredoxin oxidoreductase-encoding operon and permease genes. *Mol Microbiol* 71(4):972-88
- Peng, N., Xia, Q., Chen, Z., Liang, Y.-X. and She, Q. (2009) An upstream activation element exerting differential transcriptional activation on an *archaeal* promotor.. *Mol. Biol.* 74(4): 928-936
- Qureshi, S.A., Bell, S.D. and Jackson, S.P. (1997) Factor requirements for transcription in the *archaeon Sulfolobus shibatae*. *EMBO J* 16, 2927-36
- Reiter, W.-D., Hüdepohl, U. and Zillig, W. (1990), Mutational analysis of an *archaeobacterial* promotor: essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9509-9513
- Reiter, W.-D. Palm, P. und Zillig, W. (1988a) Analysis of transcription in the *archaeobacterium Sulfolobus* indicates that *archaeobacterial* promoters are homologous to *eucaryotic* Pol. II promoters. *Nucl. Acids. Res.* 16: 1-19
- Reiter, W.-D., Palm, P., Yeast, S. & Zillig, W. (1987b) Gene expression in *archaeobacteria*: Physical mapping of constitutive and UV-inducible transcripts from the *Sulfolobus* virus-like particle SSV1. *Mol. Gen. Genet.* 209: 270-275

- Reysenbach, A.L., Ehringer, M., Hershberger, K. (2000) Microbial analysis of an *archaeobacterial* promotor: essential role of a TATA-Box for transcriptional efficiency and start-site selection *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9509-9513.
- She, Q., Singh, R.K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M.J., Chan-Weiher, C.C., Clausen, I.G., Curtis, B.A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P.M., Heidkamp-de Jong, I., Jeffries, A.C., Kozera, C.J., Medina, N., Peng, X., Thingox, H.P., Redder, P., Schenk, M.E., Therriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R.A., Ragan, M.A. Sensen, C.W., Van der Oost, J. (2001) The complete genome of the *crenarchaeon Sulfolobus solfataricus* P2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98(14): 7835-7840
- Schleper C., Kubo, K., and Zillig, W. (1992) The particle SSV1 from the extremely thermophilic *archaeon Sulfolobus* is a virus: demonstration of infectivity and of transfection with viral DNA.. Proc Natl Acad Sci USA 89: 7645-7649
- Schleper, C., Röder, R., Singer, T. & Zillig, W. (1994) An insertion element of the extremely thermophilic *archaeon Sulfolobus solfataricus* transposes into the endogenous beta-galactosidase gene. Mol. Gen. Gene. 234:91-96
- Schleper, C., Holz, I., Janekovic, D., Murphy, J., and Zillig, W. (1995) A multicopy plasmid of the extremely thermophilic *archaeon Sulfolobus* effects its transfer to recipients by mating. J Bakteriol 177: 4417-4426
- Stetter, KO. History of discovery of the first hyperthermophiles (2006). Extremophiles 10(5):357-62
- Teufel, K., Pfeiffer, F. (2010) Interaction of transcription activator *GvpE* with TATA-box-binding proteins of *Halobacterium salinarum*.. Arch Microbiol. 192: 143-9
- Thomm, M., (1996), *Archaeal* transcription factors and their role in transcription initiation. FEMS Microbiol Rev 18, 159-71
- Torarinsson, E., Klenk, H.-P. and Garrett, R. A. (2005) Divergent transcriptional and translational signals in *Archaea*. Environ Microbiol 7, 47-54
- Woese, C.R. und Fox GE. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5088-5090
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*.. Proc Natl Acad Sci USA 87: 4576-4579
- Wurtzel, O., Sapra, R., Chen, F. (2009) A single-base resolution map of an *archaeal* transcriptome. Genome Research 1: 131-141
- Zillig, W., Prangishvilli, D., Schleper, C., Elferink, M., Holz, I, Alberts, S., Janekovic, D., Gotz, D. (1996) Viruses, plasmids and other genetic elements of thermophilic and hyperthermophilic *archaea*. FEMS Microbiol.Rev. 18:225-236.
- Zillig, W., Stetter, K.O., Wunderl, S., Schulz, W., Priess, H., Scholz, I. (1980) The *Sulfolobus*-*Caldariella*" group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. Arch. Microbiol. 125: 259-269.
- Zillig, W., Stetter, K.O., Janekovic, D. (1979), DNA-dependent RNA-Polymerase from the *archaeobacterium S. acidocaldarius*. Eur. J. Biochem. 96: 597-604

### 8.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Studien zur UV-abhängigen Transkriptionsregulation bei dem hyperthermophilen *Archaeon Sulfolobus solfataricus* durchgeführt. Ausgehend von einer zuvor durchgeführten Microarray-Studie und einer Promotoranalyse sollten die Promotorregionen von zwei stark UV-induzierbaren Genen, SSO0691a und dem ersten Transkript  $T_{ind}$  des *S. shibatae* Virus SSV1 untersucht werden. Durch Deletionen von Sequenzbereichen und anschließenden Tests im Reportergensystem sollten potenzielle *cis*-regulatorische Elemente für die UV-abhängige Transkription *in vivo* gefunden werden. Drei verschiedene Deletionen wurden mittels SLIM-PCR (Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis) durchgeführt und die verkürzten Promotoren wurden stromauf des Reportergens *lacS* in den Transformationsvektor pMJ0305 kloniert. Nach der Transformation von *S. solfataricus* M16 konnte die UV-abhängige Expression der  $\beta$ -Galaktosidase im Zellextrakt vermessen werden. Für  $T_{ind}$  wurde der Promotor von 70 bp auf 52 bp verkürzt, und das ATG des Reportergens *lacS* auf den Transkriptionsstart gelegt. Das Ergebnis für die Transformante M16-pKLTind-Delp1 war eine 19fache-Induktion 6 Stunden nach der UV-Bestrahlung im Gegensatz zur Transformante mit dem Ausgangspromotor M16-pDTTind-Delp mit einer 17fachen Induktion. Somit wurde offenbar keine wichtige regulatorische Region deletiert. In der Promotorregion von SSO0691a wurden zwei Verkürzungen durchgeführt. Bei der ersten wurde die Region entfernt die möglicherweise das BRE-Element des basalen Transkriptionspromotors enthält. Hier konnte im Vergleich zur Transformante mit dem Ausgangspromotor M16-pDT0691a-Delp keine signifikante Transkription des Reportergens mehr gemessen werden. In der zweiten Deletion wurde der 5'UTR Bereich in der keine Shine-Dalgarno-Sequenz gefunden wurde, deletiert. Die Aktivitätsmessungen dieser zweiten Transformante zeigten im Vergleich maximal eine 1,5fache UV-abhängige Induktion. Daraus kann man schlussfolgern, dass durch die Deletion ein regulatorischer Faktor nicht mehr an die DNA binden kann, und es nicht mehr zur UV-abhängigen Induktion der Transkription kommt. Durch vergleichende Sequenzstudien des Promotors SSO0691a mit anderen UV-induzierbaren Transkripten konnte ein potenzielles konserviertes *cis*-regulatorisches Element (TAAG, TAAAG usw.) im 5'UTR-Bereich von SSO0691a und anderen Genen entdeckt werden. Mittels einer Northern-Analyse wurde das *lacS*-Transkript in den

Transformanten ohne und mit UV-Behandlung nachgewiesen. Da die Stärke der Expression der *lacS*-mRNA gleich war, lässt sich in der deletierten Region eine potenzielle Bindestelle für einen Aktivator vermuten. Mit der Identifizierung einer *cis*-regulatorischen Region wurde in dieser Arbeit die Vorarbeit geleistet, um einen Regulator für die UV-abhängige Transkription in *Archaea* zu identifizieren.

**pSVA11 B49 Deletion 18 Nukleotide-Klon 4:**

```

AvrII                               „BRE“ „TATA“
IX_D08_008_2009-09-25.ab1  5' CCTAGGTACACAAACAGAGTTAGTCGACTCTGTGTATCTTATGTATCTTA 150
pSVA11_B49De1P_6985nt    5' -CTAGGTACACAAACAGAGTTAGTCGACTCTGTGTATCTTATGTATCTTA 49
      *****
      +1                               NcoI
IX_D08_008_2009-09-25.ab1  TACAAAAAATATG-----GACTCATTTCCAAATAGCT 182
pSVA11_B49De1P_6985nt    TACAAAAAATATGGGATGTGCAAAATCCATGGACTCATTTCCAAATAGCT 99
      ***** Deletion 18bp *****

IX_D08_008_2009-09-25.ab1  TTAGGTTTGGTTGGTCCCAGGCCGGATTTCAATCAGAAATGGGAACACCA 232
pSVA11_B49De1P_6985nt    TTAGGTTTGGTTGGTCCCAGGCCGGATTTCAATCAGAAATGGGAACACCA 149
      *****

```

**pSVA11 B49 Deletion 18 Nukleotide-Klon 8:**

```

8_C08_006_2009-09-25.ab1  5' ATTCAACTGTATTGTRTGAGARTAAGTTTGATGGGGCAGCATTATTCCTT 100
pSVA11_B49De1P_6985nt    5' -----CT 2
      **

AvrII                               „BRE“ „TATA“
8_C08_006_2009-09-25.ab1  AGGTACACAAACAGAGTTAGTCGACTCTGTGTATCTTATGTATCTTATAC 150
pSVA11_B49De1P_6985nt    AGGTACACAAACAGAGTTAGTCGACTCTGTGTATCTTATGTATCTTATAC 52
      *****

      +1                               NcoI
8_C08_006_2009-09-25.ab1  AAAAAAATATGGGATGTGCAAAATCCATGGACTCATTTCCAAATAGCTTTA 200
pSVA11_B49De1P_6985nt    AAAAAAATATGGGATGTGCAAAATCCATGGACTCATTTCCAAATAGCTTTA 102
      *****

8_C08_006_2009-09-25.ab1  GGTTTGGTTGGTCCCAGGCCGGATTTCAATCAGAAATGGGAACACCAGGG 250
pSVA11_B49De1P_6985nt    GGTTTGGTTGGTCCCAGGCCGGATTTCAATCAGAAATGGGAACACCAGGG 152
      *****

```

**pSVA11 B49 Deletion 18 Nukleotide-Klon 1:**

```

1_E08_010_2009-09-25.ab1  5' CATTCAACGATTGAATGAGARTAAGTTTGAKGGGCAGCATTATTCCTA 150
pSVA11_B49De1P_6985nt    5' -----CTA 3
      ***

AvrII                               „BRE“ „TATA“
1_E08_010_2009-09-25.ab1  GGTACACAAACMSAGTTAGTCGACTCTGTGTATCTTATGTATCTTATACR 200
pSVA11_B49De1P_6985nt    GGTACACAAACAGAGTTAGTCGACTCTGTGTATCTTATGTATCTTATACA 53
      *****

      +1                               NcoI
1_E08_010_2009-09-25.ab1  AAAAAAATATG-----GACTCATTTCCAAATAGCTTTAG 232
pSVA11_B49De1P_6985nt    AAAAAAATATGGGATGTGCAAAATCCATGGACTCATTTCCAAATAGCTTTAG 103
      ***** Deletion 18bp *****

1_E08_010_2009-09-25.ab1  GTTTGGTTGGTCCCAGGCCGGATTTCAATCAGAAATGGGAACACCAGGGT 282
pSVA11_B49De1P_6985nt    GTTTGGTTGGTCCCAGGCCGGATTTCAATCAGAAATGGGAACACCAGGGT 153
      *****

```

pSVA11 0691 Deletionspromotor 1, Klone 1, 2 und 3

```

AvrII          „BRE“ „TATA“
pSVA11_0691_DelP_      CTAGGCTATCTATCATCAGTTTCACATAACTCTCAGCCATTAAGAAAA 50
pSVA11_0691_DelP1_Klon1_ CTAGG-----ACATAACTCTCAGCCATTAAGAAAA 33
***** Deletion 18bp *****

+1              Met              NcoI
pSVA11_0691_DelP_      AAATATCAACGATAAGTGATGGCTAATATAGTTCATGGACTCATTTCC 100
pSVA11_0691_DelP1_Klon1_ AAATATCAACGATAAAGTGATGGCTAATATAGTTCATGGACTCATTTCC 83
***** ***** *****

pSVA11_0691_DelP_      AAATAGCTTTAGGTTTGGTTGGTCCAGGCCGATTTCATCAGAAATGG 150
pSVA11_0691_DelP1_Klon1_ AAATAGCTTTAGGTTTGGTTGGTCCAGGCCGATTTCATCAGAAATGG 133
***** ***** *****

```

pSVA11 0691 Deletionspromotor 1, 18 Nukleotide-Klon 2:

```

pSVA11_0691_DelP_      AAACGTATTGTAATGCCGACATAAGTTTGTATGGGGCAGCATTATTCCT 85
pSVA11_0691_DelP1_Klon2_ AA-CTGTATTGTAATGA-GACATAAGTTTGGKGGGGCAGCATTATTCCT 97
** ***** *****

AvrII          „BRE“ „TATA“
pSVA11_0691_DelP_      AGGCTATCTATCATCAGTTTCACATAACTCTCAGCCATTAAGAAAAAA 135
pSVA11_0691_DelP1_Klon2_ AGG-----ACATAACTCTCAGCCATTAAGAAAAAA 129
*** Deletion 18bp *****

+1              Met              NcoI
pSVA11_0691_DelP_      ATATCAACGATAAGTGATGGCTAATATAGTTCATGGACTCATTTCCAA 185
pSVA11_0691_DelP1_Klon2_ ATATCAACGATAAAGTGATGGCTAATATAGTTCATGGACTCATTTCCAA 179
***** ***** *****

pSVA11_0691_DelP_      ATAGCTTTAGGTTTGGTTGGTCCAGGCCGATTTCATCAGAAATGGGA 235
pSVA11_0691_DelP1_Klon2_ ATAGCTTTAGGTTTGGTTGGTCCAGGCCGATTTCATCAGAAATGGGA 229
***** ***** *****

```

pSVA11 0691 Deletionspromotor 1, 18 Nukleotide-Klon 3:

```

pSVA11_0691_DelP_      ACTATTCAAACTGTATTGTAATGCCGACATAAGTTTGTATGGGGCAGCATT 78
pSVA11_0691_DelP1_Klon3_ ACTATTCAAACTGTATTGTAATGA-GACATAAGTTTGGGGGGCAGCATT 98
***** ***** *****

AvrII          „BRE“ „TATA“
pSVA11_0691_DelP_      ATTCCTAGGCTATCTATCATCAGTTTCACATAACTCTCAGCCATTAATA 128
pSVA11_0691_DelP1_Klon3_ ATTCCTAGG-----ACATAACTCTCAGCCATTAATA 130
***** Deletion 18bp *****

+1              Met              NcoI
pSVA11_0691_DelP_      GAAAAAATATCAACGATAAGTGATGGCTAATATAGTTCATGGACTCA 178
pSVA11_0691_DelP1_Klon3_ GAAAAAATATCAACGATAAAGTGATGGCTAATATAGTTCATGGACTCA 180
***** ***** *****

```

## 8.2 Anhang

### pSVA11 0691 Deletionspromotor 2, Klone 1, 4 und 5

```

                                                    AvrII
pSVa11_0691_DelP_                ACTGTATTGTAATGCCGACATAAGTTTGATGGGGCAGCATTATTCCTCTAG 87
pSVA11_0691_DelP2_Klon1_        ACTGTATTGTAATGA-GACATMMGTTTGATGGGGCAGCATTATTCCTCTAG 99
*****                          *****

                „BRE“ „TATA“
pSVa11_0691_DelP_                GCTATCTATCATCAGTTTCACATAACTCTCAGCCATTAAAAGAAAAAAT 137
pSVA11_0691_DelP2_Klon1_        GCTATCTATCATCAGTTTCACATAACTCTCAGCCATTAAAAGAAAAAAT 149
*****

+1                                NcoI
pSVa11_0691_DelP_                ATCAACGATAAGTGATGGCTAATATAGTTCCTCATGGACTCATTTCCTCAAT 187
pSVA11_0691_DelP2_Klon1_        ATC-----ATGGACTCATTTCCTCAAT 170
***                               Deletion 29bp

```

### pSVA11 0691aDelp2 29 Nukleotide-Klon 4:

```

pSVa11_0691_DelP_                AACTGTATTGTAATGCCGACATAAGTTTGATGGGGCAGCATTATTCCTCT 85
pSVA11_0691_DelP2_Klon4_        AACTGTATTGTAATGA-GACATAAGTTTWTATGGGGCAGCATTATTCCTCT 99
*****

AvrII                „BRE“ „TATA“
pSVa11_0691_DelP_        AGGCTATCTATCATCAGTTTCACATAACTCTCAGCCATTAAAAGAAAAA 135
pSVA11_0691_DelP2_Klon4_ AGGCTATCTATCATCAGTTTCACATAACTCTCAGCCATTAAAAGAAAAA 149
*****

+1                                NcoI
pSVa11_0691_DelP_        ATATCAACGATAAGTGATGGCTAATATAGTTCCTCATGGACTCATTTCCTCA 185
pSVA11_0691_DelP2_Klon4_ ATATC-----ATGGACTCATTTCCTCA 170
****                               Deletion 29bp

```

### pSVA11 0691aDelp2 Deletion 29 Nukleotide-Klon 5:

```

                                                    AvrII
pSVa11_0691_DelP_                AACTGTATTGTAATGCCGACATAAGTTTGATGGGGCAGCATTATTCCTCTA 86
pSVA11_0691_DelP2_Klon5_        AACTGTATTGTAATGA-GACATMAGTTAGARGGGGCAGCATTATTCCTCTA 99
*****

                „BRE“ „TATA“
pSVa11_0691_DelP_                GGCTATCTATCATCAGTTTCACATAACTCTCAGCCATTAAAAGAAAAA 136
pSVA11_0691_DelP2_Klon5_        GGCTATCTATCATCMGTTTCACATAACTCTCAGCCATTAAAAGAAAAA 149
*****

+1                                NcoI
pSVa11_0691_DelP_                TATCAACGATAAGTGATGGCTAATATAGTTCCTCATGGACTCATTTCCTCAA 186
pSVA11_0691_DelP2_Klon5_        TATC-----ATGGACTCATTTCCTCAA 170
***                               Deletion 29bp

```

Abb. 30) Darstellung der Sequenzier-Reaktion verschiedener Klone des Vorvektors pSVA11 mit den klonierten UV-induzierbaren Promotoren TindDelp1 (18 bp), 0691aDelp1 (18 bp) und 0691aDelp2 (29 bp) nach den durchgeführten Deletionen

```

                                NcoI  „TATA“
0691Delp1_MT  CAGCATTATTCCTAGGACATAACTCTCAGCCATTAAAAGAAAAAATAT
148
0691Delp1_SC_2010-07-28  CAGCATTATTCCTAGGACATAACTCTCAGCCATTAAAAGAAAAAATAT
149
*****

+1 5'UTR Met                               AvrII
0691Delp1_MT  CAACGATAAGTGATGGCTAATATAGTTCCCATGGACTCATTTCCAAATAG
198
0691Delp1_SC_2010-07-28  CAACGATAAGTGATGGCTAATATAGTTCCCATGGACTCATTTCCAAATAG
199
*****

0691Delp1_MT  CTTTAGGTTTGGTTGGTCCCAGGCCGATTTCAATCAGAAATGGGAACAC
248
0691Delp1_SC_2010-07-28  CTTTAGGTTTGGTTGGTCCCAGGCCGATTTCAATCAGAAATGGGAACAC
249
*****

0691Delp1_MT  CAGGGTCAGAAGATCCAAATACTGACTGGTATAAATGGGTTCATGATCCA
298
0691Delp1_SC_2010-07-28  CAGGGTCAGAAGATCCAAATACTGACTGGTATAAATGGGTTCATGATCCA
299
*****

```

Abb. 31) Sequenzierreaktion zur Kontrolle der Einzelkolonien M16-pKLTind-Delp1 auf die Promotorregion, da sie eine etwas unterschiedliche UV-abhängige Aktivität zeigten.



## Lebenslauf

Name: Lettner  
Vorname: Kathrin  
Adresse: Kaiserstraße 107/33  
1070 Wien  
Geburtsdatum: 08.06.1983  
Staatsangehörigkeit: Österreich  
Telefon: (0650) 38 46 534  
E-Mail [kathi.lettner@gmx.net](mailto:kathi.lettner@gmx.net)

## Schul- und Berufsbildung

---

1989 – 1993: Volksschule Baumgartenberg  
1994 – 1998: Hauptschule Baumgartenberg  
1999 – 2002: HBLA Perg  
2002 – 2003: Studium Kunstgeschichte  
2003 – 2010: 2003 Diplomstudium Biologie,  
2007 Diplomstudium Ökologie  
Universität Wien

## Erfahrungsbereich

---

Juni 2010 Workshop, Sampling of Hyperthermophilic  
Microorganisms from Terrestrial Hot Springs,  
Island (Prof. Schleper)

---