

# Polyploidie in Prokaryoten

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
**Anna Katharina Ludt**  
aus Herrenberg

Frankfurt am Main 2018

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

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel  
Gutachter: Prof. Dr. Jörg Soppa  
Prof. Dr. Eckhard Boles

Datum der Disputation:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1 Die dritte Domäne des Lebens: Archaea .....	3
2.1.1 <i>Haloferax volcanii</i> als Modellorganismus.....	5
2.2 DNA-Replikation in Archaea .....	6
2.2.1 Die Replikationsursprünge ori1 und ori2 in <i>Haloferax volcanii</i> .....	11
2.3 Polyploidie: Quantifizierung, Vorkommen, Regulation und Vorteile .....	13
2.4 Genkonversion als Vorteil von Polyploidie .....	17
2.5 Zielsetzung der Arbeit .....	22
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
3.1 Material .....	24
3.1.1 Laborgeräte .....	24
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	26
3.1.3 Chemikalien.....	27
3.1.4 Kit-Systeme .....	31
3.1.5 Enzyme .....	31
3.1.6 Antikörper .....	31
3.1.7 Größenstandards .....	32
3.1.8 Oligonukleotide.....	32
3.1.9 Plasmide.....	32
3.1.10 Mikroorganismen.....	34
3.1.11 Software & Datenbanken .....	36
3.2 Mikrobiologische Methoden .....	36
3.2.1 Medien und Anzuchtbedingungen .....	36
Medien und Anzuchtbedingungen für <i>E. coli</i> .....	36
3.2.2 Herstellung von Dauerkulturen .....	41
3.2.3 Wachstum in Mikrotiterplatten .....	41
3.2.4 Zelldichtebestimmung.....	41
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	42
3.3.1 Isolierung und Reinigung von DNA .....	42
3.3.2 Pop-In/Pop-Out-Methode zur Generierung von Deletionsmutanten .....	43

3.3.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	45
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	45
3.3.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	50
3.3.6	Slot-Lyse von <i>E. coli</i> -Kolonien.....	51
3.3.7	Klonierung .....	52
3.3.7.1	Spaltung von DNA mithilfe von Restriktionsenzymen .....	52
3.3.7.2	Ligation von DNA-Fragmenten .....	53
3.3.7.3	Gibson-Assembly.....	54
3.3.7.4	Gap Repair Cloning mit <i>S. cerevisiae</i> .....	56
3.3.8	Sequenzierung .....	58
3.3.9	Transformation von Mikroorganismen .....	58
3.3.9.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> für die Hitzeschock-Transformation .....	58
3.3.9.2	Transformation von <i>E. coli</i> .....	59
3.3.9.3	Transformation von <i>H. volcanii</i> .....	59
3.3.10	Southern-Blot-Analyse .....	60
3.3.11	Protoplastenfusion.....	64
3.3.12	Quantitative Bestimmung der Genomkopienzahl mittels quantitativer Real- Time PCR (qPCR).....	65
3.3.13	Isolierung der Gesamt-RNA .....	68
3.3.14	Northern-Blot Analyse .....	69
3.3.15	Überexpression von Proteinen .....	70
3.3.15.1	Induktion mit Tryptophan .....	70
3.3.15.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	70
3.3.15.3	Western-Blot.....	72
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>74</b>
4.1	Untersuchung der 16 <i>orc</i> -Gene und eines <i>cdc</i> -Gens in <i>Haloferax volcanii</i> .....	74
4.1.1	Herstellung der Deletionsmutanten .....	74
4.1.2	Wachstum der Deletionsmutanten .....	80
4.1.3	Genomkopienzahl der Deletionsmutanten.....	84
4.1.4	Überexpression ausgewählter <i>orc</i> -Gene .....	88
4.2	Untersuchung der <i>ori1</i> - und <i>ori2</i> -nahen Gene.....	89
4.2.1	Verifizierung der Expression des <i>oap</i> -Operons .....	90
4.2.2	Überexpression der <i>ori1</i> - und <i>ori2</i> -nahen Gene in H26 .....	91
4.2.2.1	Wachstum der Überexpressionsmutanten.....	92

4.2.2.2 Detektion der überexprimierten Proteine im Western-Blot.....	95
4.2.3 Genomkopienzahl der Deletionsmutanten ausgewählter Gene.....	96
4.2.4 Bestimmung der Genomkopienzahl bei Überexpression der Helikasen ....	97
4.3 Untersuchung der Genkonversion in <i>Haloferax volcanii</i> .....	100
4.3.1 Auswahl und Generierung der auxotrophen Deletionsmutanten .....	100
4.3.2 Wachstum von $\Delta 2528 \Delta 2918$ .....	101
4.3.3 Generierung der Mutanten für die Untersuchung der Genkonversion .....	103
4.3.4 Experimenteller Aufbau zur Untersuchung der Genkonversion.....	104
4.3.5 Optimierung der Protoplastenfusion .....	107
4.3.6 Ergebnisse der Protoplastenfusion.....	110
4.3.6.1 Optimierung der PCR für die Einzelklonanalyse.....	112
4.3.6.2 Ergebnisse der Einzelklonanalyse .....	114
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>119</b>
5.1 Einfluss der Deletion der origin-assoziierten und „verwaisten“ <i>orc</i> -Gene auf Wachstum und Genomkopienzahl .....	119
5.2 Einfluss der <i>ori1</i> - und <i>ori2</i> -nahen Gene auf Wachstum und Genomkopienzahl	126
5.3 Genkonversion als Vorteil von Polyploidie .....	131
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>140</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>155</b>
<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>157</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>160</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Phylogenie der Archaea (modifiziert nach Eme und Doolittle (2015)) .....	3
Abb. 2: Schematische Darstellung des archaealen Replisoms (Lindås und Bernander 2013).....	9
Abb. 3: Schematische Darstellung der ori1- und ori2-Region (modifiziert nach Maurer <i>et al.</i> (2018)) .....	11
Abb. 4: Molekulare Mechanismen von SDSA und DSBR (Hastings 2010) .....	19
Abb. 5: Schematische Darstellung der Ausgangsplasmide. ....	32
Abb. 6: Schematische Darstellung der Pop-In/Pop-Out-Methode (modifiziert nach Allers <i>et al.</i> (2004)).....	44
Abb. 7: Schematische Darstellung des Gibson-Assemblys (aus Gibson <i>et al.</i> (2009)) .....	55
Abb. 8: Bestimmung der Genomkopienzahl mittel qPCR (aus Hildenbrand <i>et al.</i> (2011)) .....	66
Abb. 9: Generierung der F1- & F2-Fragmente und Kolonie-PCR transformierter <i>E. coli</i> -Klone .....	75
Abb. 10: Kolonie-PCR der Pop-In und Pop-Out Klone von <i>HVO_A0257</i> .....	75
Abb. 11: Planung des Southern-Blots von <i>HVO_A0257</i> .....	77
Abb. 12: Sonden-PCR und Southern-Blot von <i>HVO_A0257</i> .....	78
Abb. 13: Wachstum der <i>orc</i> - und <i>cdc</i> -Deletionsmutanten nach Inokulation mit exponentiellen und stationären Kulturen.....	81
Abb. 14: Wachstum der <i>orc</i> - und <i>cdc</i> -Deletionsmutanten unter normalen und osmotischen Stressbedingungen.....	83
Abb. 15: Wachstum der <i>orc</i> - und <i>cdc</i> -Deletionsmutanten unter Phosphatmangel....	84
Abb. 16: Ploidielevel der <i>orc</i> -Deletionsmutanten .....	86
Abb. 17: Wachstumskurve von $\Delta 2380$ in Komplexmedium .....	87
Abb. 18: Ploidielevel der <i>cdc</i> -Deletionsmutante $\Delta 2380$ .....	88
Abb. 19: Western-Blot der überexprimierten <i>orc</i> -Gene.....	89
Abb. 20: Northern-Blot des <i>oap</i> -Operons .....	91
Abb. 21: Wachstum der Überexpressionsmutanten der upstream-liegenden Gene .	93
Abb. 22: Wachstum der Überexpressionsmutanten der Helikasen.....	94
Abb. 23: Western-Blot der upstream von ori1- und ori2-kodierten Proteine.....	96
Abb. 24: Ploidielevel der Deletionsmutanten von ori1- und ori2-nahen Genen.....	97

---

Abb. 25: Optimierung der Überexpression der ori1- und ori2-nahen Helikasen.....	98
Abb. 26: Western-Blot der Überexpression der ori1- und ori2-nahen Helikasen .....	99
Abb. 27: Veränderung des Ploidielevels bei Übererexpression der Helikasen .....	99
Abb. 28: Southern-Blot von <i>HVO_2918 (thyA)</i> .....	101
Abb. 29: Wachstum von $\Delta 2528 \Delta 2918$ .....	103
Abb. 30: Genomische Besonderheiten der Genkonversionsstämme .....	104
Abb. 31: Experimenteller Versuchsaufbau des Genkonversionsexperiments .....	105
Abb. 32: Optimierung des Zentrifugationsschritts nach Mischen der Elternstämme	108
Abb. 33: Optimierung der PEG-600-Konzentration bei der Protoplastenfusion .....	109
Abb. 34: Rote Klone durch Genkonversion.....	111
Abb. 35: Weiße Klone nach der Protoplastenfusion .....	112
Abb. 36: Optimierung der PCRs für die Einzelklonanalyse.....	114
Abb. 37: Ergebnisse der Einzelklonanalyse der roten Klone .....	116
Abb. 38: Sequenzanalyse des MRM der Orc1/Cdc6-Proteine.....	123

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: verwendete Plasmide .....	33
Tab. 2: Medien für <i>E. coli</i> .....	36
Tab. 3: Komplexmedium für <i>H. volcanii</i> .....	37
Tab. 4: Synthetisches Medium für <i>H. volcanii</i> .....	38
Tab. 5: Hv-Cab Medium für <i>H. volcanii</i> .....	39
Tab. 6: Komplexmedium für <i>S.cerevisiae</i> .....	40
Tab. 7: Synthetisches Medium für <i>S.cerevisiae</i> .....	40
Tab. 8: Lösungen für die Isolation genomischer DNA .....	42
Tab. 9: PCR-Ansatz der Phusion-Polymerase.....	45
Tab. 10: Step-Down-PCR-Programm .....	46
Tab. 11: Fusions-PCR-Programm .....	47
Tab. 12: PCR-Ansatz für die Site-Directed-Mutagenesis-PCR .....	47
Tab. 13: PCR-Programm für die Site-Directed-Mutagenesis-PCR .....	47
Tab. 14: <i>DpnI</i> -Verdau der Site-Directed-Mutagenesis-PCR .....	48
Tab. 15: Lösungen für die laboreigene <i>Taq</i> -PCR .....	48
Tab. 16: PCR-Ansatz für die laboreigene <i>Taq</i> -DNA-Polymerase .....	49
Tab. 17: PCR-Programm für die laboreigene <i>Taq</i> -DNA-Polymerase .....	49
Tab. 18: PCR-Ansatz für die Biozym <i>Taq</i> -DNA-Polymerase .....	49
Tab. 19: PCR-Programm für die Biozym <i>Taq</i> -DNA-Polymerase .....	50
Tab. 20: Lösungen für die Generierung einer Digoxigenin-markierten Sonde.....	50
Tab. 21: Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese.....	51
Tab. 22: Lösungen für die Slot-Lyse.....	52
Tab. 23: Spaltung der DNA für den Southern-Blot.....	52
Tab. 24: blunt-End-Ligation .....	53
Tab. 25: sticky-End-Ligation .....	54
Tab. 26: Lösungen für das Gibson-Assembly.....	55
Tab. 27: Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen von <i>S.cerevisiae</i> .....	56
Tab. 28: Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	58
Tab. 29: Lösungen für die Transformation von <i>H. volcanii</i> .....	59
Tab. 30: Lösungen für den Southern-Blot.....	61
Tab. 31: Lösungen für die Hybridisierung der Sonde .....	62
Tab. 32: Lösungen für den Chemolumineszenznachweis .....	63

---

Tab. 33: Lösungen für die Protoplastenfusion .....	65
Tab. 34: qPCR-Ansatz.....	67
Tab. 35: qPCR-Programm .....	68
Tab. 36: Lösungen für die Isolierung der Gesamt-RNA.....	69
Tab. 37: Lösungen für RNA-Gele .....	69
Tab. 38: Lösungen für die SDS-PAGE .....	71
Tab. 39: Zusammensetzung des Trenn- und der Sammelgele für Polyacrylamidgele .....	71
Tab. 40: Lösungen für den Western-Blot.....	72
Tab. 41: Übersicht der <i>orc</i> -Deletionsmutanten .....	79
Tab. 42: Mögliche Transkriptgrößen des <i>oap</i> -Operons .....	91
Tab. 43: Erwartete Fragmentgrößen für den Southern-Blot von <i>HVO_2918</i> ( <i>thyA</i> )	101
Tab. 44: Ergebnisse der Untersuchung der nicht-selektierten Loci der weißen Klone .....	117
Tab. 45: Ergebnisse der Untersuchung der selektierten Loci der weißen Klone ....	117

## Abkürzungen

bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung
HTS	High Troughput Sequencing
kb	Kilobasenpaare
mb	Megabasenpaare
nt	Nukleotide
NTP	Nucleotidtriphosphat
ORF	Open Reading Frame (offenes Leseraster)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	Quantitative Real-Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
tRNA	Transfer-RNA
$T_m$	Schmelztemperatur

## 1 Zusammenfassung

Diese Arbeit teilt sich in drei Teile auf, die sich mit der Regulation der Polyploidie sowie mit der Genkonversion als evolutionären Vorteil von Polyploidie in *Haloferax volcanii* beschäftigen.

Im ersten Teil dieser Arbeit, wurde der Einfluss der DNA-Replikationsinitiatorproteine Orc1/Cdc6 auf das Ploidielevel untersucht. Hierbei konnte anhand von Deletionsmutanten zunächst gezeigt werden, dass lediglich drei der 16 Orc1/Cdc6-Proteine in *H. volcanii* essentiell sind. Bestimmung des Ploidielevels mittels qPCR-Analyse ergab, dass jedes der 12 untersuchten Orc1/Cdc6-Proteine das Ploidielevel mindestens eines Replikons beeinflusst und dementsprechend sowohl die mit einem Replikationsursprung assoziierten als auch die „verwaisten“ Orc1/Cdc6-Proteine eine Funktion haben. Die mit einem Replikationsursprung assoziierten Orc1/Cdc6-Proteine hatten hierbei keinen größeren Einfluss auf das Ploidielevel als die „verwaisten“. Zusätzlich konnte durch Wachstumsanalysen in Mikrotiterplatten gezeigt werden, dass die meisten Deletionsmutanten unter allen getesteten Bedingungen ein mit dem Wildtyp vergleichbares oder besseres Wachstum zeigen. Eine Deletionsmutante eines Orc1/Cdc6-Proteins hingegen zeigte nur verbessertes Wachstum bei Glukose als Kohlenstoffquelle, was ein Hinweis auf die Verwendung verschiedener Orc1/Cdc6-Proteine unter verschiedenen Bedingungen sein könnte. Zusätzlich wurden zwei mit dem Replikationsursprung assoziierte Orc1/Cdc6-Proteine überexprimiert und via ihres N-terminalen His-Tag im Western-Blot nachgewiesen, sodass diese nun für Co-Affinitätsaufreinigungen zur weiteren Charakterisierung des komplexen Zusammenspiels der Orc1/Cdc6-Proteine zur Verfügung stehen.

Im Rahme des zweiten Teils der Arbeit wurde der Einfluss der in der 5'-Region der der Replikationsursprünge ori1 und ori2 kodierten Proteine auf Wachstum und die Kopienzahl des Hauptchromosoms bestimmt. Zunächst wurde die Expression der drei in Haloarchaea hoch-konservierten *oap*-Gene upstream von ori1 mittels Northern-Blot untersucht und es konnte gezeigt werden, dass das *oap*-Operon tatsächlich als Operon abgelesen wird. Um alle Gene in den 5'-Regionen von ori1 und ori2 genauer zu charakterisieren, wurden induzierbare Überexpressionsmutanten im Wildtyp-Hintergrund angefertigt. Es konnte mittels Wachstumsversuchen in Mikrotiterplatten gezeigt werden, dass bei Induktion von Beginn an die Überexpression der Hef-Helikase und des *oapB*-Proteins zu einem starken Wachstumsdefekt führen, die von

oapC und HVO\_1724 zu einem moderaten Wachstumsdefekt, wohingegen für die Überexpressionsmutante von oapA vergleichbares Wachstum zum Wildtyp und für die Überexpression der Rad25d-Helikase verbessertes Wachstum beobachtet werden konnte. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sowohl die Deletion als auch die Überexpression der Helikasen keinen Einfluss auf das Ploidielevel hat; die Deletion von oapC führt jedoch zu einer Reduktion der Genomkopienzahl in exponentieller und stationärer Phase, was ein erster Hinweis darauf ist, dass das *oap*-Operon eine Rolle bei der Regulation des Ploidielevels spielen könnte.

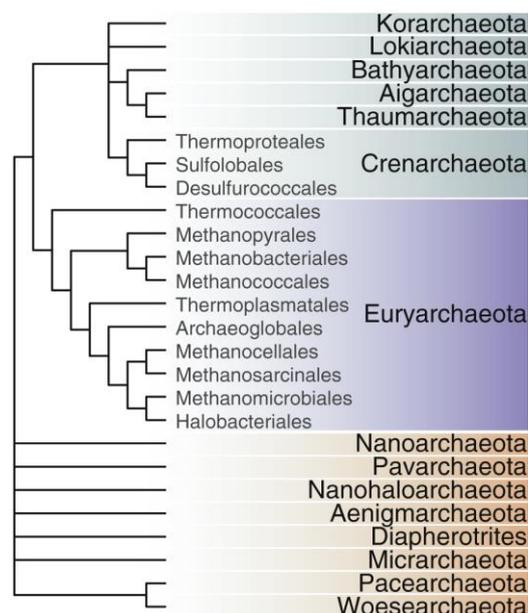
Im dritten Teil der Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um Genkonversion farblich sichtbar zu machen. Hierbei wurde sich *H. volcaniis* Carotinoidbiosynthese zu Nutze gemacht. Es wurden zwei verschiedene, auxotrophe Elternstämme mittels Protoplastenfusion verschmolzen, um eine heterozygote Tochterzelle zu erzeugen. Ein Genkonversionsereignis wurde durch einen roten Keil angezeigt, der aus einer weißen Kolonie wuchs und durch die erfolgreiche Reparatur des Carotinoidbiosynthesegens entstand. Es wurden insgesamt 8525 Klone ausgestrichen und 0,14 % der Kolonien zeigten eine entsprechende rote Färbung. Das Proof-of-Principle dieser Methode ist in damit in dieser Arbeit gelungen. Um die Genkonversion in den weißen Kolonien auf genetischer Ebene genauer zu untersuchen, wurde PCR verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass in den Zellen aller 135 untersuchten Kolonien Genkonversion stattgefunden hatte und zwar so effizient, dass nur in seltenen Fällen Heterozygotie vorlag. Unter Selektionsdruck stehende Loci hatten in beiden untersuchten Fällen eine starke Präferenz in Richtung Homozygotie und Erhalt der Prototrophie. Für nicht unter Selektionsdruck stehende Loci konnte gezeigt werden, dass die Hälfte der untersuchten Kolonien dem Elternstamm 1 glich, während die andere Hälfte dem Elternstamm 2 glich. Auch hier waren die Zellen nur in seltenen Fällen homozygot.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die dritte Domäne des Lebens: Archaea

Lange Zeit wurden die Archaea phylogenetisch den Bakterien zugeordnet. Erst 1977 wurde die Domäne der Archaea beschrieben, als bei der Untersuchung der 16S rDNA methanogener Bakterien eine Gruppe „Bakterien“ entdeckt wurde, die sich hinsichtlich gefundener Coenzyme, des Zellwandaufbaus, der rRNA und der tRNA grundlegend von den typischen Bakterien unterschieden (Fox *et al.* 1977). Zwar wurde die Domäne der „Archaeobacteria“ bereits damals eingeführt, allerdings dauerte es weitere 13 Jahre bis Woese und Kollegen 1990 schließlich den heutigen Stammbaum des Lebens mit den drei Domänen Eukarya, Bacteria und Archaea postulierten.

Die Archaea selbst werden in die „TACK“-, die Euryarchaeota (Woese *et al.* 1990) und die „DAPNN“-Supergruppen unterteilt (siehe Abb. 1) (Eme und Doolittle 2015). Der „TACK“-Gruppe werden die Kor- (Barns *et al.* 1996), Loki- (Spang *et al.* 2015), Bathy- (Meng *et al.* 2014), Aig- (Nunoura *et al.* 2011), Thaum- (Brochier-Armanet *et al.* 2008) und Crenarchaeota (Woese *et al.* 1990) zugeordnet. Die „DAPNN“-Supergruppe enthält sehr diverse Phyla, so zum Beispiel die der zwei der kleinsten Mikroorganismen der Welt – Micrarchaeota (Baker *et al.* 2010) und Parvarchaeota (Rinke *et al.* 2013) – oder auch das Phylum des symbiotisch lebenden Archaeons *Nanoarchaeum equitans* (Huber *et al.* 2003).



**Abb. 1: Phylogenie der Archaea (modifiziert nach Eme und Doolittle (2015))**

Die „TACK“-Supergruppe ist in petrol dargestellt, die Euryarchaeota in lila und die „DAPNN“-Supergruppe in orange.

Archaea gelten allgemein als die Domäne der Extremophilen und in der Tat wurden die meisten Archaea aus Umwelten mit extremen Lebensbedingungen isoliert, wie z.B. Mooren, arktischen Meeren, Meerestiefen, Salzlaken und heißen sauren Quellen (Alberts *et al.* 2002; Madigan und Martinko 2009), die sich durch sehr hohe oder niedrige Temperaturen oder pH-Werte, hohe Salzkonzentration oder anoxische Bedingungen auszeichnen (Willey *et al.* 2008). Aber auch unter wesentlich lebensfreundlicheren Bedingungen konnten Archaea gefunden werden, wie z.B. in Böden, Seen, Wiederkäuermägen, Faeces und auch in und auf dem Menschen (Alberts *et al.* 2002; Conway de Macario und Macario 2009; Madigan und Martinko 2009; Frey *et al.* 2010; Chroňáková *et al.* 2013). So verschieden wie ihre ökologischen Nischen, sind auch ihre bevorzugten Wachstumsbedingungen: Archaea können aerob, fakultativ aerob oder strikt anaerob wachsen (Willey *et al.* 2008). Manche Archaea sind hyperthermophil und bevorzugen 120 °C, andere sind mesophil und wieder andere psychrophil und zeigen auch bei -20 °C noch Wachstum (Egorova und Antranikian 2007; Willey *et al.* 2008). Ihre Morphologie ist ähnlich divers, so können Archaea stäbchenförmig, kugelförmig, spiralförmig, geklappt, kubisch, dreieckig, tellerförmig, unregelmäßig geformt oder pleomorph sein (Willey *et al.* 2008).

Obwohl sie phylogenetisch näher an den Eukaryoten stehen (Forterre 2013; Caetano-Anolles *et al.* 2014), teilen Archaea Eigenschaften mit beiden Domänen. Viele ihrer Proteine sind homolog zu denen der Eukaryoten, wie z.B. die der Replikation, Transkription, Translation, homologen Rekombination und des Cytoskeletts (Alberts *et al.* 2002; Klenk 2007; Madigan und Martinko 2009; White 2011; Lindås und Bernander 2013). Mit Bakterien haben sie das zirkuläre Chromosom sowie die Organisation ihrer Gene in Operons gemeinsam (Lindås und Bernander 2013). Darüber hinaus teilen sie verschiedene Stoffwechselwege mit den Bakterien (Alberts *et al.* 2002; Willey *et al.* 2008; Madigan und Martinko 2009). Es gibt auch Fälle, wo ein Teil der Archaea den Eukaryoten ähnelt, ein anderer Teil den Bakterien, wie z.B. bei der Zellteilung, wo die Euryarchaeota den Bakterien gleichen, die Crenarchaeota den Eukaryoten (Lindås und Bernander 2013). Trotz dieser Gemeinsamkeiten, besitzen die Archaea Strukturen, die spezifisch für ihre Domäne sind. So besitzen sie zur Fortbewegung ein Archaellum, das trotz gewisser bakterieller Homologie, einzigartig in seiner Struktur und Funktion ist (Albers und Jarrell 2015). Ihre Zellmembran besteht aus Kohlenwasserstoffen, die durch eine

Etherbindung anstatt einer Esterbindung mit Glycerin verbunden sind (Willey *et al.* 2008). Der Aufbau ihrer Zellwand ist sehr divers und kommt ohne Peptidoglykanschicht aus. Stattdessen besteht sie in manchen Fällen aus Pseudomurein, einem Peptidoglykan-ähnliches Polymer, das mit L-Aminosäuren quervernetzt ist, in anderen Fällen aus komplexen Kohlenhydraten, die dem tierischen Bindegewebe ähneln (Willey *et al.* 2008). Typisch ein kristalliner Überzug aus Proteinen auf der Zelloberfläche, dem sogenannten S-Layer (Albers und Meyer 2011). Außerdem findet die Methanogenese ausschließlich in methanogenen Archaea statt (Offre *et al.* 2013).

Obwohl Archaea ubiquitär vorkommen und Bestandteil der meisten, wenn nicht aller, Mikrobiota von Tieren und Menschen sind, sind derzeit keine pathogenen Vertreter bekannt (Cavicchioli *et al.* 2003). Allerdings scheinen sie gelegentlich, wie im Fall von Parodontitis, den tatsächlichen Erregern ein günstiges Milieu zu bereiten (Lepp *et al.* 2004) und konnten bei Papilloma dermatitis digitalis bei Rindern isoliert werden – allerdings ist hier nach wie vor unklar, ob sie tatsächliche Erreger sind oder nur zur Begleitflora gehören (Santos *et al.* 2012).

### 2.1.1 *Haloferax volcanii* als Modellorganismus

*Haloferax volcanii* wurde 1975 erstmals aus dem Toten Meer isoliert und nach dem Entdecker halophiler Archaea, Benjamin Elazari Volcani, benannt (Mullakhanbhai und Larsen 1975). *H. volcanii* gehört zum Phylum der Euryarchaeota, der Klasse der Halobacteria, der Ordnung der Halobacteriales und der Familie der Halobacteriaceae. Die Zellen sind pleomorph und durch Carotinoid-Einlagerungen in der Zellwand charakteristisch rot gefärbt (Ronnekleiv 1995). *H. volcanii* ist chemoorganotroph und kann sowohl aerob als auch anaerob mit einer Vielzahl von Kohlenstoffquellen und Elektronenakzeptoren wachsen (Soppa 2011a). Als halophiles Archaeon kann *H. volcanii* bei einer Salzkonzentration von 0,7 – 5 M NaCl wachsen, bevorzugt jedoch eine Konzentration von 2,1 M NaCl (Jantzer *et al.* 2011). *H. volcanii* ist mesophil – seine optimale Wachstumstemperatur beträgt 42 °C. Unter optimalen Bedingungen verdoppeln sich die Zellen alle 3 h (Zhou *et al.* 2008). *H. volcanii*s Genom ist seit 2010 sequenziert und ist mit 65 % relativ GC-reich (Hartman *et al.* 2010). Es besteht aus einem 2,8 mb großen Hauptchromosom und drei kleineren Chromosomen, pHV1 mit 85 kb, pHV3 mit 438 kb und pHV4 mit 636 kb sowie dem Plasmid pHV2 mit 6,4 kb. In dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm

H26, fehlt das Plasmid pHV2 und das kleine Chromosom pHV4 wurde in das Hauptchromosom integriert (Lam und Doolittle 1989; Hawkins *et al.* 2013). *H. volcanii* H26 repliziert sein Genom über sechs Replikationsursprünge, vier davon befinden sich auf dem Hauptchromosom (ori1, ori2, ori3 und ori-pHV4) und je einer auf den kleinen Chromosomen pHV1 (ori-pHV1) und pHV3 (ori-pHV3) (Norais *et al.* 2007; Hawkins *et al.* 2013). Die Deletion aller Replikationsursprünge auf dem Hauptchromosom ist möglich und führt sogar zu einem verbesserten Wachstum (Hawkins *et al.* 2013). Alle Replikationsursprünge sind kolokalisiert mit Genen, die für Replikationsinitiatorproteine kodieren: *orc1/cdc6*. Neben diesen sechs, besitzt *H. volcanii* 10 weitere, die „verwaist“ sind (Norais *et al.* 2007; Ausiannikava und Allers 2017). *H. volcanii* ist polyploid mit 17 Genomkopien in der exponentiellen und 10 in der stationären Phase (Breuert *et al.* 2006). Neben der wachstumsphasenabhängigen Regulation beeinflusst ebenso die Kohlenstoffquelle das Ploidielevel (Zerulla 2014). Seine Polyploidie ermöglicht es *H. volcanii* die Vorteile von Heterozygotie auszunutzen, Genkonversion zu betreiben, sowie seine Genomkopien als Phosphatspeicher zu nutzen (Lange *et al.* 2011; Zerulla *et al.* 2014b). Wie genau die *H. volcanii* seine Polyploidie reguliert, ist unbekannt. Lediglich ein Einfluss der Replikationsursprünge ori1 und ori2 und ihrer umliegenden Regionen konnte gezeigt werden (Maurer 2015). Da für Modellorganismen nicht nur die einfache Kultivierbarkeit von Bedeutung ist, sondern auch die einfache genetische Zugänglichkeit, wurden mittlerweile eine Reihe von Methoden etabliert. *H. volcanii* kann mit einer Effizienz von  $10^6/\mu\text{g}$  transformiert werden (Soppa 2006), mithilfe einer Pop-In/Pop-Out-Methode können Deletionsmutanten generiert werden (Bitan-Banin *et al.* 2003; Allers *et al.* 2004; Hammelmann und Soppa 2008), es besteht die Möglichkeit zur konditionellen Überexpression (Allers *et al.* 2010) und zur Hoch-Durchsatz-Charakterisierung von Wachstum in Mikrotiterplatten (Jantzer *et al.* 2011). Darüber hinaus können zwei verschiedene Elternstämme als Protoplasten zu einer neuen Zelle fusioniert und dadurch heterozygote Tochterzellen erzeugt werden (Mevarech und Werczberger 1985).

## 2.2 DNA-Replikation in Archaea

Die DNA-Replikation in Archaea ist größtenteils homolog zu der der Eukaryoten, jedoch nicht so umfassend erforscht (Lindås und Bernander 2013). Das liegt vor allem daran, dass die benötigten Methoden für die Erforschung nur in *Sulfolobales*,

*Halobacteriales* und *Thermococcales* zur Verfügung stehen (Ausiannikava und Allers 2017). Aus diesem Grund liegen nur Ergebnisse für die Eury- und die Crenarchaeota vor (Bell 2012). Das ist insofern problematisch, da die Zusammensetzung des Replikationsapparats in Archaea im Gegensatz zu Eukaryoten und Bakterien nicht über die gesamte Domäne hinweg identisch ist (Makarova und Koonin 2013; Raymann *et al.* 2014; Ausiannikava und Allers 2017).

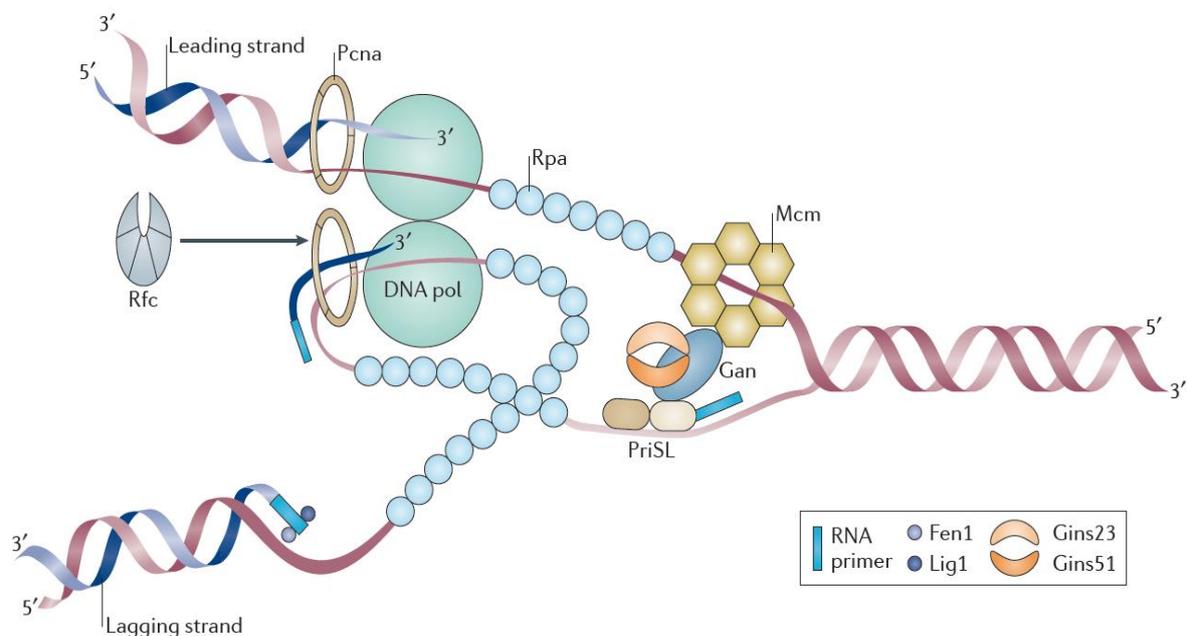
Im Gegensatz zu Bakterien können bei Archaea mehrere Replikationsursprünge in ihrem zirkulären Genom vorkommen. Während das Hauptchromosom von *Halobacterium salinarum* sp. NRC-1 und *Pyrococcus* spp. lediglich einen Replikationsursprung besitzt (Myllykallio *et al.* 2000; Berquist *et al.* 2007), kommen im Genom von *Sulfolobus islandicus* drei Replikationsursprünge vor (Lundgren *et al.* 2004) und in dem von *Pyrobaculum calidifontis* vier (Pelve *et al.* 2013).

Obwohl Archaea mehrere Replikationsursprünge in ihrem Genom haben können, besitzen diese wie bei Bakterien eine definierte Struktur. Sie bestehen aus AT-reichen Sequenzen (AT-rich DNA unwinding Element (DUE)), die von mehreren konservierten Sequenzwiederholungen flankiert sind (Origin Recognition Boxes (ORBs)) (Norais *et al.* 2007; Ausiannikava und Allers 2017). Diese ORBs unterscheiden sich je nach Spezies in ihrer Sequenz, Anzahl, der Orientierung und dem Abstand, den sie zueinander haben (Wu *et al.* 2014b; Ausiannikava und Allers 2017). Auch innerhalb einer Spezies kann die Anzahl der ORBs der verschiedenen Replikationsursprünge unterschiedlich sein (Norais *et al.* 2007; Wu *et al.* 2014a).

Wie bei Bakterien, ist das Replikationsinitiatorprotein meistens direkt neben dem Replikationsursprung lokalisiert, allerdings ist das archaeale Initiatorprotein homolog zu den eukaryotischen Proteinen Orc1 und Cdc6 – aus diesem Grund werden sie meistens als Orc1/Cdc6-Proteine bezeichnet (Barry und Bell 2006). Da es in der Archaea-Forschergemeinschaft in der Vergangenheit jedoch keinen Konsensus bei der Benennung dieser Proteine gab, sind sie in manchen Spezies auch als Orc1- (z.B. *S. islandicus*), Orc (z.B. *Haloferax volcanii*) oder Cdc6 (z.B. *S. acidocaldarius*) annotiert (Bell 2012; Ausiannikava und Allers 2017). Während manche Archaea nur so viele *orc1/cdc6*-Gene wie Replikationsursprünge besitzen, gibt es insbesondere bei den *Halobacteriales* Spezies, die neben den mit einem Replikationsursprung lokalisierten *orc1/cdc6*-Genen noch weitere „verwaiste“ Gene besitzen. So hat *Natronomonas pharaonis* fünf *orc1/cdc6*-Gene, von denen vier „verwaist“ sind, während *Haloarcula marismortui* zum Beispiel 17 *orc1/cdc6*-Gene besitzt, von denen

immerhin zehn „verwaist“ sind (Baliga *et al.* 2004; Falb *et al.* 2005; Berquist *et al.* 2007). Strukturell gesehen, weisen Orc1/Cdc6-Proteine am N-terminalen Ende eine AAA+ ATPase-Domäne (ATPases associated with various cellular activities) auf, hinter der sich eine zusätzliche  $\alpha$ -Helix befindet, die Initiator Specific Motif (ISM) genannt wird – hierdurch fallen die Orc1/Cdc6-Proteine wie auch ihre Verwandten in den beiden anderen Domänen in die „Initiator“-Gruppe der AAA+ Proteine. Am C-terminalen Ende befindet sich eine winged-helix-Domäne (wH) (Bell 2012). Im aktiven Zentrum der Orc1/Cdc6-Proteine ist ADP oder ATP gebunden, wobei die Konformation bei Bindung von ADP relativ flexibel ist und durch ATP stabilisiert wird (Bell 2012). In *S. islandicus* konnte gezeigt werden, dass die ATP-Bindung von Orc1-1 essentiell für die Aktivierung des Replikationsursprungs ist und eine „Walker B“-Mutante, die zwar ATP binden, aber nicht zu ADP hydrolysieren kann, zu einer vermehrten Replikationsinitiation führt (Samson *et al.* 2016). Die Bindung an den Replikationsursprung erfolgt bei *Aeropyrum pernix* als Monomer (Gaudier *et al.* 2007) oder wie in *S. solfataricus* als Heterodimer (Dueber *et al.* 2007). Hierbei binden die Orc1/Cdc6-Proteine sowohl über die C-terminale wH-Domäne als auch über das N-terminale ISM an nur vier bzw. fünf Nukleotide des Replikationsursprungs (Bell 2012; Ausiannikava und Allers 2017). Ob Orc1/Cdc6 wie sein bakterielles Homolog DnaA in der Lage ist, die Duplexhelix aufzuschmelzen, ist noch unklar. Matsunaga und Kollegen (2010) konnten *in vitro* zwar zeigen, dass Orc1/Cdc6 DNA aufschmelzen kann, allerdings gibt es in Eukaryoten deutliche Hinweise darauf, dass Cdc6 die MCM-Helikase an die Doppelhelix und nicht aufgeschmolzene DNA rekrutiert (Evrin *et al.* 2009; Remus *et al.* 2009; Bell 2012). In der Tat konnten Samson und Kollegen (2016) *in vitro* für *S. islandicus* zeigen, dass Orc1/Cdc6 nicht nur wie ORC den Replikationsursprung erkennen und binden kann, sondern auch wie Cdc6 in der Lage ist, die archaeale replikative Helikase MCM zu rekrutieren. Sie identifizierten ein MCM-Recruitment Motif (MRM): eine konservierte, exponierte  $\alpha$ -Helix in der AAA+ ATPase-Domäne des N-Terminus von Orc1-1, die sich nur vier Aminosäuren entfernt vom Sensor 2-Aminosäurerest befindet, der für die Koordination des  $\gamma$ -Phosphats von ATP verantwortlich ist. Sie stellten die Theorie auf, dass durch ATP-Bindung an den Sensor 2-Rest, die Konformation von Orc1-1 so verändert wird, dass die geöffnete homohexamere MCM-Helikase über ihre C-terminale wH-Domäne eine Interaktion mit dem MRM eingehen kann und dadurch rekrutiert wird. Die nachfolgende Hydrolyse von ATP zu ADP führt erneut zu einer

Konformationsänderung, wodurch keine Interaktion mehr möglich ist und Orc1-1 inaktiv wird. Die MCM-Helikase kann nun die Doppelhelix in ihre Einzelstränge auftrennen. Die Einzelstränge werden durch Bindung mehrerer Heterotrimerer Replication Protein As (RPA) stabilisiert und vor endonukleolytischem Abbau geschützt (Kelman und Kelman 2003; Li *et al.* 2010; Lindås und Bernander 2013). Im Folgenden ist eine schematische Darstellung eines archaealen Replisoms zum besseren Verständnis gezeigt.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des archaealen Replisoms (Lindås und Bernander 2013)**

GAN = GINS assoziierte Nuklease, FEN1 = Flap Endonuklease 1, Lagging Strand = Folgestrang, Leading strand = Leitstrang, LIG1 = DNA-Ligase 1, MCM = MCM-Helikase, PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen, RFC = Replikationsfaktor C, RPA = Replication Protein A

Für die Elongation der DNA verwenden alle bisher untersuchten Archaea die archaea-spezifischen DNA-Polymerasen PolB und PolD als replikative DNA-Polymerasen (Ishino *et al.* 2013). Die Ausnahme hierbei sind die Crenarchaeota, die nur mehrere DNA-Polymerasen der Familie B verwenden (Barry und Bell 2006). Es wurde vermutet, dass die PolB-Polymerase den Leitstrang und PolD den Folgestrang amplifiziert, allerdings ist PolB in manchen Spezies nicht essentiell und PolD scheint dort die alleinige replikative DNA-Polymerase zu sein (Cubonova *et al.* 2013; Ishino *et al.* 2013; Sarmiento *et al.* 2013).

Der pentamere Replikationsfaktor C (RFC) Komplex, bestehend aus vier kleinen Untereinheiten (RFCS) und einer großen (RFCL), rekrutiert das homotrimere Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ATP-abhängig an die DNA. Das PCNA

formt einen Ring um den DNA-Einzelstrang, erhöht die Prozessivität der DNA-Polymerase und bindet über das PCNA-Interacting Protein (PIP) Motif eine ganze Reihe DNA-Replikationsproteine an die DNA, wie zum Beispiel die DNA-Polymerase, die Flap Endonuklease 1 (FEN1) oder die DNA Ligase 1 (Barry und Bell 2006; Lindås und Bernander 2013).

Für die Synthese des Folgestrangs, synthetisiert die heterodimere DNA-Primase PriSL RNA-Oligonukleotide (Lindås und Bernander 2013). Sie besteht aus einer kleinen katalytischen Untereinheit (PriS) und einer großen nicht-katalytischen Untereinheit (PriL) und kann *in vitro* sowohl RNA- als auch DNA-Oligonukleotide synthetisieren (Barry und Bell 2006; Ishino *et al.* 2013). Die RNA-Oligonukleotide werden nach der Amplifikation der DNA durch die Flap Endonuklease 1 (FEN1) entfernt, die Lücken von der DNA-Polymerase aufgefüllt und die Okazakifragmente, die wie bei Eukaryoten etwa 100 bp lang sind, durch die ATP-abhängige DNA-Ligase 1 (LIG1) ligiert.

Die MCM-Helikase des Leitstranges wird durch GINS mit der Primase des Folgestranges verbunden, wodurch das Replisom stabilisiert wird (Barry und Bell 2006). Möglicherweise trägt GINS auch zur Aufwindung der DNA bei (Ishino und Ishino 2012). GINS (jap.: go-ichi-ni-san – 5-1-2-3) ist in Eukaryoten ein heterotetramerer Komplex, der aus den Proteinen SDL5, PSF1, PSF2 und PSF3 besteht. Archaea besitzen nur zwei GINS-Proteine, einmal GINS23, das homolog zu PSF2 und PSF3 ist und einmal GINS15, das homolog zu PSF1 und SDL5 ist (Barry und Bell 2006). Die Interaktion des GINS-Komplexes mit der MCM-Helikase und der Primase erfolgt über die GINS-assoziierte Nuklease (GAN, RecJ in manchen archaealen Spezies) (Lindås und Bernander 2013).

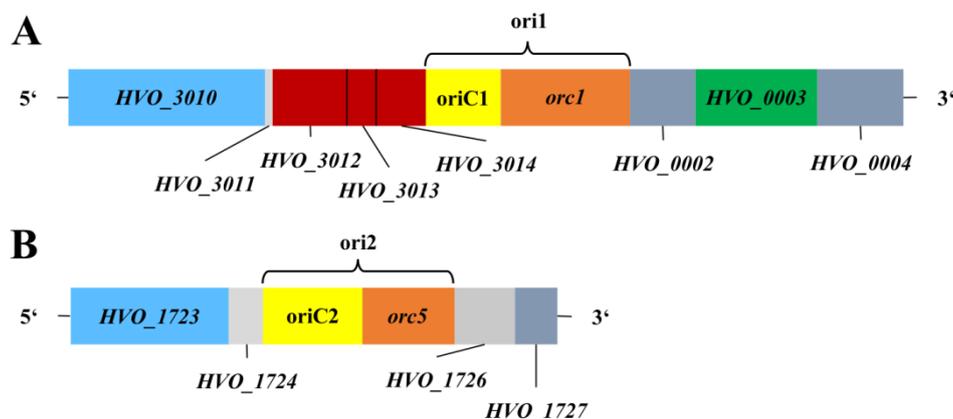
Die Termination bei einem einzigen Replikationsursprung erfolgt gegenüber dem Replikationsursprung am Terminus. Archaea mit mehreren Replikationsursprüngen, wie zum Beispiel *Haloferax volcanii* (Hawkins *et al.* 2013) oder *Sulfolobus solfataricus* (Duggin *et al.* 2011) besitzen mehrere breite Terminationszonen, ähnlich wie sie in Eukaryoten vorkommen.

Die DNA-Replikation läuft in allen untersuchten Archaea bidirektional ab und die Geschwindigkeit variiert je nach Spezies zwischen 15 – 340 bp pro Sekunde (Lindås und Bernander 2013).

### 2.2.1 Die Replikationsursprünge *ori1* und *ori2* in *Haloferax volcanii*

*Haloferax volcanii* besitzt drei bis vier Replikationsursprünge in seinem Hauptchromosom, abhängig davon, ob das kleine Chromosom pHV4 in das Hauptchromosom integriert wurde oder nicht (Hawkins *et al.* 2013). In vorangegangenen Arbeiten wurden zwei dieser Replikationsursprünge genauer untersucht (Hawkins *et al.* 2013; Maurer 2015): *ori1*, der in Haloarchaea inklusive seiner umliegenden Gene konserviert ist, und *ori2*, der so nur in *Haloferax* vorkommt (Capes *et al.* 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Replikationsursprünge nicht äquivalent in ihrer Aktivität sind, sondern *ori1* in seinem Einfluss auf das Ploidielevel wesentlich stärker als *ori2* ist (Maurer 2015). Darüber hinaus konnte Sandy Maurer in ihrer Masterarbeit zeigen, dass die umliegenden Regionen der Replikationsursprünge einen Einfluss auf das Ploidielevel haben, sowohl in *cis* als auch *trans*, wenn sie sich auf einem HAC (Haloarchaea Artificial Chromosome) befinden und im Chromosom deletiert worden sind.

Im Folgenden ist der Aufbau der *ori1*- und *ori2*-Region dargestellt (siehe Abb. 3).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der *ori1*- und *ori2*-Region (modifiziert nach Maurer *et al.* (2018))**

Gezeigt ist der Aufbau der *ori1*- (A) und *ori2*-Region (B). Blau steht für Helikase, grau für konserviertes hypothetisches Protein, rot für Origin-assoziiertes Protein, gelb für die Repeats der Replikationsursprünge, orange für das Orc1/Cdc6-Protein, blaugrau für Proteine, mit anderen Funktionen und grün für DNA-Polymerase. **(A)** Die Region des konservierten Replikationsursprungs *ori1* besteht aus: *HVO\_3010* (*hef*) = Hef-Helikase, *HVO\_3011* = konserviertes hypothetisches Protein, *HVO\_3012* – *HVO\_3014* (*oapC* – *oapA*) = Origin-assoziierte Proteine C – A, *oriC1* = Repeats des Replikationsursprungs, *orc1* (*HVO\_0001*) = Orc1/Cdc6-Protein des *ori1*, *HVO\_0002* (*sec11b*) = Signalpeptidase, *HVO\_0003* (*polD1*) = Untereinheit DP1 der DNA-Polymerase PolD, *HVO\_0004* = Oxidoreduktase. **(B)** Die Region des Replikationsursprungs *ori2* besteht aus: *HVO\_1723* (*rad25d*) = Rad25d-Helikase, *HVO\_1724* = konserviertes hypothetisches Protein, *oriC2* = Repeats des Replikationsursprungs *ori2*, *orc5* (*HVO\_1725*) = Orc1/Cdc6-Protein des *ori2*, *HVO\_1726* = konserviertes hypothetisches Protein, *HVO\_1727* = HTH-Domäne Protein

In der 5'-Region von ori1 befindet sich das Gen *HVO\_3010*, das für die Hef-Helikase kodiert. Die Hef-Helikase gehört zur Familie der Xpf/Mus81/FANCM Endonukleasen und besteht aus einer N-terminalen Helikase und einer C-terminalen Endonuklease (Lestini *et al.* 2013). Die Hef-Helikase wird als Homodimer an festgefahrene Replikationsgabeln rekrutiert und löst diese unabhängig von homologer Rekombination auf (Lestini *et al.* 2010; Lestini *et al.* 2013). In Abwesenheit der Holiday-Junction-Resolvase (Hjc) kann die Hef-Helikase deren Funktion bei der Auflösung der bei der Rekombination entstehenden Holiday-Junctions übernehmen (Lestini *et al.* 2010; Lestini *et al.* 2013). *hef* ist nicht essentiell und kann deletiert werden – eine Deletion führt zu verminderter homologer Rekombination, insbesondere von Genkonversion (Lestini *et al.* 2010). Ein weiteres Gen in der 5'-Region von ori1 ist *HVO\_3011*. Hierbei handelt es sich um ein konserviertes hypothetisches Protein, dessen Funktion unbekannt ist. Weitere Gene sind *HVO\_3012* – *HVO\_3014*, die für Origin-assoziierte Proteine kodieren. Diese Gene sind in ihrer Lokalisation direkt upstream von ori1 in Haloarchaea konserviert. *HVO\_3014* ist allgemein als GTP-bindendes Protein annotiert, aber die genaue Funktion der Proteine ist unbekannt. Aufgrund ihrer Nähe zu ori1 liegt die Vermutung nahe, dass sie etwas mit der Replikation oder ihrer Regulation zu tun haben. Bei den Genen in der 3'-Region von ori1 handelt es sich um *HVO\_0002*, das für eine Signalpeptidase kodiert, *HVO\_0003*, das für die DP1-Untereinheit der replikativen DNA-Polymerase PolD kodiert und um *HVO\_0004*, das als Oxidoreduktase annotiert ist.

In der 5'-Region von ori2 befindet sich *HVO\_1723*, das eine von vier Rad25-Helikasen kodiert: Rad25d. Die Rad25d-Helikase ist homolog zum menschlichen XPB, das Teil der DNA-Helikase-Untereinheiten von TFIIH ist. TFIIH ist an der Nukleotid-Exzisionsreparatur sowie an der Transkriptionsinitiation beteiligt (Capes *et al.* 2011). In *Sulfolobus solfataricus* konnte gezeigt werden, dass XPB bei der Nukleotid-Exzisionsreparatur die DNA-Blase erweitert (Rouillon und White 2010). Das zweite Gen in der 5'-Region von ori2 ist *HVO\_1724*, das für ein konserviertes hypothetisches Protein kodiert. Da seine Funktion unbekannt ist, es aber in direkter Nähe zu einem Replikationsursprung lokalisiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass es eventuell eine Rolle bei der Regulation oder der DNA-Replikation selbst spielt. In der 3'-Region von ori2 befindet sich ein weiteres konserviertes hypothetisches Protein,

*HVO\_1726*, und *HVO\_1727*, das für ein Protein mit HTH-Domäne kodiert, bei dem es sich höchstwahrscheinlich um einen Transkriptionsfaktor handelt.

### 2.3 Polyploidie: Quantifizierung, Vorkommen, Regulation und Vorteile

Polyploidie ist definiert als das Vorhandensein von mehreren Kopien eines Chromosoms innerhalb einer Zelle (Breuert *et al.* 2006). Im Allgemeinen spricht man bei einer Kopienzahl von zwei bis zehn von Oligoploidie und bei mehr als zehn Kopien von Polyploidie (Soppa 2013); Zellen mit einer Genomkopie werden als monoploid und nicht als haploid bezeichnet (Soppa 2014).

Polyploidie kann mithilfe von verschiedenen Methoden quantifiziert werden. Zum einen kann die Genomkopienzahl einzelner Zellen bestimmt werden, wie es bei fluoreszenzbasierten Methoden, wie z.B. der FACS-Analyse (Fluorescence-Activated Cell Sorting), der Fall ist (Soppa 2011b). Zum anderen kann die durchschnittliche Genomkopienzahl aller Zellen einer Kultur quantifiziert werden, wie z.B. der Agarose-Block-Methode (Breuert *et al.* 2006), der spektroskopischen Bestimmung der Genomkopienzahl (Hildenbrand *et al.* 2011) und der Quantifizierung des Ploidielevels mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) (Breuert *et al.* 2006). Letztere wird in dieser Arbeit verwendet. Hierbei wurde sowohl ein PCR-Fragment als Standard sowie Zellysate der zu untersuchenden Spezies in einen qPCR-Lauf eingesetzt, bei dem ein kurzes Analysefragment vom Standard sowie dem Genom amplifiziert wurde. Mithilfe des Standards kann eine Eichgerade erstellt werden, anhand der man den in der qPCR ermittelten  $C_T$ -Werten eine Molekülanzahl zuordnen kann. Um das Ploidielevel der Zellen zu bestimmen, muss die ermittelte Molekülanzahl noch durch die Zahl der in die qPCR eingesetzten Zellen geteilt werden.

Polyploidie galt lange als Eigenschaft der Eukaryoten, da Fische, Amphibien und insbesondere Pflanzen häufig polyploid sind (Breuert *et al.* 2006). Auch im menschlichen Körper kommen polyploide Zellen vor, wie zum Beispiel in der Leber (Lizier *et al.* 2018). Prokaryoten galten lange Zeit als monoploid, mit wenigen Ausnahmen wie z.B. *Deinococcus radiodurans* (Hansen 1978). Das lag vor allem daran, dass ihre bekanntesten Modellorganismen, *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*, zumindest bei langsamem Wachstum tatsächlich monoploid sind (Skarstad *et al.* 1983; Webb *et al.* 1998). Allerdings werden sie bei optimalen Wachstumsbedingungen mero-oligoploid (Pecoraro *et al.* 2011; Böttinger *et al.* 2018), da die Generationszeit hier kürzer ist als die Zeit, die zur Replikation benötigt

wird, weshalb eine erneute Replikationsrunde gestartet wird, bevor die vorherige beendet wurde - hierdurch ist die Kopienzahl des Replikationsursprungs größer als die des Terminus. Mittlerweile konnten so viele polyploide Spezies identifiziert werden, dass es sich bei Polyploidie eher um die Regel als die Ausnahme zu handeln scheint (Soppa 2011b). Polyploide prokaryotische Spezies konnten bei den halophilen Archaea (Breuert *et al.* 2006; Zerulla 2014), methanogenen Archaea (Hildenbrand *et al.* 2011), Thermococcales (Spaans *et al.* 2015),  $\gamma$ -Proteobakterien (Pecoraro *et al.* 2011), Cyanobakterien (Griese *et al.* 2011; Zerulla *et al.* 2016) und Firmicutes (Böttinger *et al.* 2018) gefunden werden. Dass es sich hierbei nicht um ein Laborartefakt handelt, konnte durch die Isolation polyploider Zellen aus der Umwelt gezeigt werden (Jaakkola *et al.* 2014; Böttinger *et al.* 2018).

Auch das Argument, dass Prokaryoten nicht polyploid sein können, da die Konstruktion von Deletionsmutanten ohne weiteres möglich ist, konnte durch den Nachweis der Genkonversion entkräftigt werden (Santoyo und Romero 2005; Hildenbrand *et al.* 2011; Lange *et al.* 2011).

Interessanterweise scheint es bei Bakterien so zu sein, dass Polyploidie zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Evolution unabhängig voneinander entstanden ist (Soppa 2011b). So sind innerhalb einer Gattung manche Arten monoploid und andere polyploid, wie zum Beispiel im Fall der  $\gamma$ -Proteobakterien, wo *Buchnera* sp. 120 Genomkopien haben, *E. coli* hingegen mono- oder diploid ist (Pecoraro *et al.* 2011). Bei Archaea hingegen ist eine klare phylogenetische Trennung der Polyploidie zu sehen: Euryarchaeota sind polyploid, Crenarchaeota hingegen monoploid (Soppa 2011b).

Wie Polyploidie in Prokaryoten entsteht oder wie sie reguliert wird, ist noch nicht geklärt. Beim Menschen wird Polyploidie häufig durch Zellfusion erzeugt, wie beispielweise in der Leber (Lizier *et al.* 2018). Bei Pflanzen hingegen kommt es relativ häufig zur Erzeugung nicht reduzierter Gameten, sodass es so in den Nachkommen zu Polyploidie kommt (Tate *et al.* 2005; Moghe und Shiu 2014). Da Prokaryoten allerdings unabhängig von Fusion oder sexueller Fortpflanzung sind, muss ihre Polyploidie auf andere Weise zustande kommen. Ein möglicher Regulationspunkt könnte die DNA-Replikation sein, die durch die DNA-Initiation reguliert wird (Ausiannikava und Allers 2017). In menschlichen Krebszellen konnte gezeigt werden, dass die Histonmodifikation, die einen Einfluss auf die Initiation der DNA-Replikation hat, auch einen Einfluss auf das Ploidielevel hat (Lu *et al.* 2016).

Archaea besitzen Histon-basiertes Chromatin (Mattioli *et al.* 2017) und Magnan und Kollegen postulierten, dass das bakterielle Nucleoid ebenfalls an der Regulation der DNA-Replikation beteiligt ist (Magnan und Bates 2015). In *H. volcanii* H26 konnte gezeigt werden, dass zwei der vier Replikationsursprünge auf dem Hauptchromosom – ori1 und ori2 – einen sehr unterschiedlichen Einfluss auf das Ploidielevel haben (Maurer 2015). Die Deletion von ori1 führt zu einer Reduktion der Kopienzahl des Hauptchromosoms und als alleiniger Replikationsursprung eines HACs (Haloarchaea Artificial Chromosome) zu einer sehr hohen Kopienzahl, während es sich für ori2 gegenläufig verhält.

Welchen evolutionären Nutzen die Polyploidie hat, ist derzeit noch unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Mehrheit der heutigen blühenden Pflanzen und Wirbeltiere von polyploiden Vorfahren abstammen (Otto 2007). Möglicherweise hat die Polyploidie zur Entstehung von Mitose und Meiose beigetragen (Markov und Kaznacheev 2016). Polyploidie hat in jedem Fall viele theoretische Vorteile, wovon manche bereits experimentell bestätigt werden konnten (Comai 2005; Soppa 2013). Ein offensichtlicher Vorteil von Polyploidie bei Eukaryoten ist der Heterosis-Effekt, der zu einer Leistungssteigerung der hybriden, allopolyploiden Nachkommen führt (Comai 2005). Gezeigt werden konnte auch, dass Polyploidie zu einer schnelleren Gewebsregeneration bei eingeschlechtlichen Salamandern (Saccucci *et al.* 2016) und zu einer erhöhten Salztoleranz bei *Arabidopsis thaliana* führt (Chao *et al.* 2013). Bei Prokaryoten konnten ebenfalls eine Reihe von Vorteilen identifiziert werden. So führt Polyploidie zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Doppelstrangbrüchen, die durch Austrocknung und radioaktive Strahlung erzeugt werden, wie für *Deinococcus radiodurans* (Mattimore und Battista 1996), *Halobacterium salinarum* (Kottemann *et al.* 2005) und *Haloferax volcanii* (Zerulla *et al.* 2014b) gezeigt werden konnte. Die Fähigkeit, das komplette Genom aus vielen überlappenden Bruchstücken wieder zusammensetzen zu können, wurde für *Deinococcus radiodurans* bereits gezeigt (Zahradka *et al.* 2006), und ist möglicherweise einer der Gründe, warum halophilen Archaea für hunderte von tausenden Jahren oder sogar Jahrmillionen eingeschlossen in Salzkristallen überleben können (Grant *et al.* 1998; Vreeland *et al.* 2007). Ein relativ offensichtlicher Vorteil ist die durch die Polyploidie erzeugte Genredundanz, die es ermöglicht, mutierte Gene anhand des intakten Templates mithilfe von Genkonversion zu reparieren (Santoyo und Romero 2005; Hildenbrand *et al.* 2011; Lange *et al.* 2011). Darüber hinaus wäre es möglich, dass polyploide

Organismen unter schwierigen Wachstumsbedingungen gezielt ein Allel mutieren und sich so besser anpassen können (Soppa 2013). Außerdem könnte Polyploidie in Organismen mit mehreren Replikons die Möglichkeit der globalen Genregulation eröffnen, da Gene auf Replikons mit höhere Kopienzahl möglicherweise stärker exprimiert sind, als die auf Replikons mit geringer Kopienzahl. Für *Haloferax volcanii* konnte auch bereits gezeigt werden, dass die verschiedenen Replikons sich in ihrer Kopienzahl unterscheiden (Zerulla *et al.* 2014b). Polyploidie ermöglicht darüber hinaus eine entspanntere DNA-Replikationskontrolle, da die DNA-Replikation nicht genau nach Verdopplung des Genoms gestoppt werden muss, wie es bei monoploiden Spezies der Fall ist (Soppa 2013). In der Tat konnte für *Halobacterium salinarum* gezeigt werden, dass es keine S-Phase gibt, sondern die DNA-Replikation während des gesamten Zellzyklus stattfindet (Zerulla *et al.* 2014a). Ein weiterer Vorteil von Polyploidie ist, dass die Bildung des Septums bei der Zellteilung weniger Kontrolle erfordert, da es aufgrund der höheren Genomkopienzahl statistisch wahrscheinlich ist, dass beide Tochterzellen zumindest eine Genomkopie erhalten (Soppa 2013). Dies konnte auch für *Methanococcus jannaschii* (Malandrin *et al.* 1999) und für *Synechocystis* PCC6803 (Schneider *et al.* 2007), jedoch nicht für *Halobacterium salinarum* experimentell gezeigt werden (Zerulla *et al.* 2014a). Polyploide Spezies sind darüber hinaus in der Lage, sich auch unter Phosphatmangel weiter zu teilen (Zerulla *et al.* 2016) und sogar ihre DNA als Phosphatspeicher zu verwenden, wie für *Haloferax volcanii* beschrieben wurde (Zerulla *et al.* 2014b). Darüber hinaus konnte für *Bacillus subtilis* (Böttinger *et al.* 2018) und Cyanobakterien (Watanabe *et al.* 2015) gezeigt werden, dass die Zellen mit der DNA-Replikation bereits in der lag-Phase beginnen und so Chromosmenkopien anhäufen, um ihnen beim Wachstumsstart ein paar rasche Zellteilungen zu ermöglichen. Polyploidie ermöglicht das Bestehen von Riesenbakterien, wie z.B. *Epulopiscium fishelsoni* (Fishelson *et al.* 1985; Montgomery und Pollak 1988) oder *Achromatium oxaliferum* (Head *et al.* 2000), da bei den gigantischen Ausmaßen von 30 – 500 µm in Länge und 5 – 45 µm in Breite wie im Fall von *Epulopiscium*, Diffusion bei monoploiden Zellen nicht ausreichen würde, um Transkripte und Proteine durch das Cytoplasma zu transportieren (Soppa 2014). Im Allgemeinen scheinen alle Riesenbakterien polyploid zu sein (Angert 2012). *Epulopiscium* hat bis zu 200.000 Genomkopien pro Zelle und es konnte gezeigt werden, dass die Kopienzahl mit dem Volumen korreliert (Mendell *et al.*

2008). Während *Epulopiscium* vermutlich über Genkonversion seine Genome homogenisiert, sodass alle 200.000 Kopien identisch sind (Mendell *et al.* 2008), ist das Genom von *A. oxaliferum* sehr divers (Ionescu *et al.* 2017). Sein Genom enthält nur wenige identische Kopien und wird als so komplex beschrieben, als wäre die Diversität einer kompletten Zellgemeinschaft in einer einzigen Zelle. Welche Vorteile *A. oxaliferum* daraus zieht, ist noch unklar.

Neben vielen Vorteilen, birgt Polyploidie auch gewisse Nachteile. So kann sie in Eukaryoten zu Aneuploidie und damit zur Sterilität führen (Comai 2005). In *Haloferax volcanii* korreliert eine höhere Genomkopienzahl mit einem langsameren Wachstum, allerdings ist unklar, ob das Ploidielevel wirklich die Ursache dafür ist (Maurer 2015).

Bei Untersuchungen der mikrobiellen Zusammensetzung einer Gemeinschaft, sorgt die Polyploidie darüber hinaus für eine weitere Herausforderung (Soppa 2017). Mikrobielle Gemeinschaften z.B. im Darm werden häufig mittels Markerfrequenzanalysen untersucht, die auf die 16S rRNA- oder andere Gene abzielen. Normalerweise wird davon ausgegangen, dass ein Read aus einer Zelle stammt und deshalb die Markerfrequenz dem Anteil, den die jeweilige Spezies an der Gemeinschaft hat, entspricht. Bei polyploiden Spezies ist dies jedoch nicht der Fall, da mehrere Reads aus einer Zelle stammen. Wenn mikrobiologische Gemeinschaften also ohne Berücksichtigung des Ploidielevels der einzelnen Spezies untersucht werden, dann sind polyploide Spezies über- und monoploide Spezies unterrepräsentiert.

## 2.4 Genkonversion als Vorteil von Polyploidie

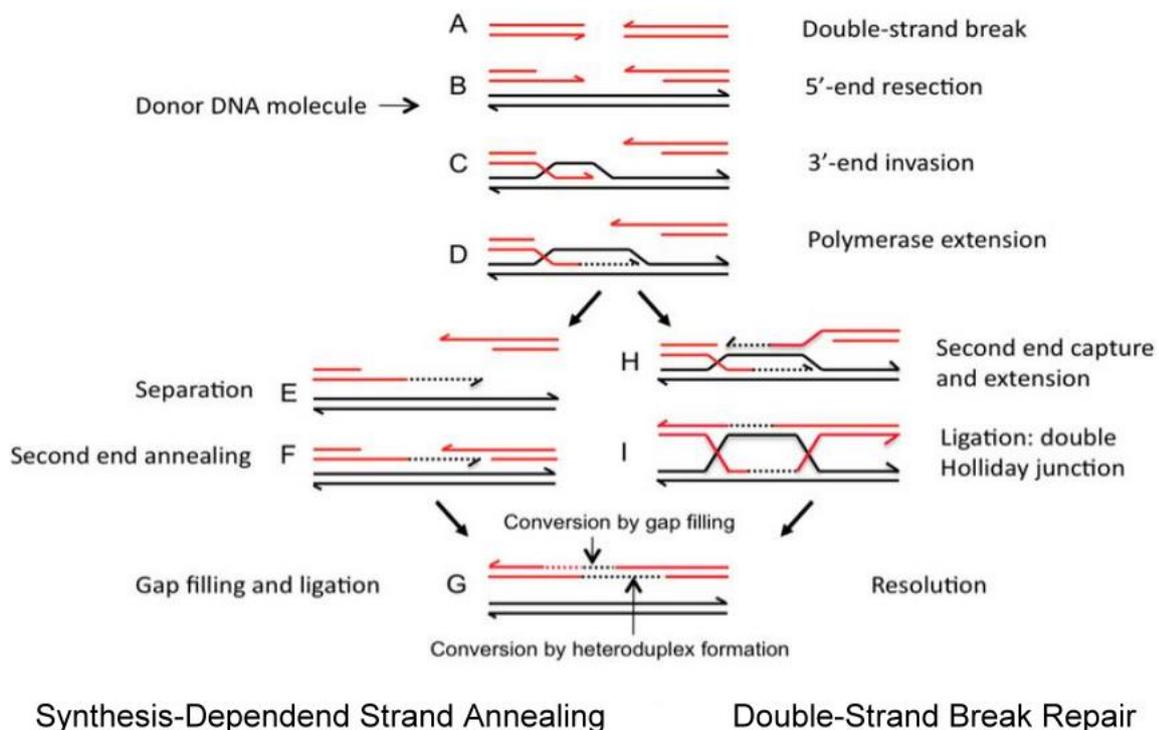
Die Genkonversion ist eine Form der homologen Rekombination, bei der es zur nicht-reziproken Übertragung von genetischer Information zwischen homologen DNA-Sequenzen kommt (Hastings 2010). Es wird dementsprechend die DNA-Sequenz von einem Donormolekül auf ein Empfängermolekül übertragen – die DNA-Sequenz des Donors bleibt dabei unverändert (Hastings 2010). Genkonversion kommt sowohl intragenomisch (z.B. zwischen zwei homologen Genen, wie den rRNA-Genen) oder intergenomisch (z.B. zwischen zwei Schwesterchromatiden bei Eukaryoten oder den verschiedenen Genomkopien bei *Haloferax volcanii*) vor (Santoyo und Romero 2005).

Genkonversion spielt unter anderem eine große Rolle beim Wechsel des Mating-Typs knospender Hefen, der Antigenvariation von Oberflächenproteinen pathogener

Bakterien, bei der Aneignung von Antibiotikaresistenzen, sowie bei der gemeinsamen Evolution von Genfamilien (z.B. rRNA-Genen) (Santoyo und Romero 2005; Paulsson *et al.* 2017). Genkonversion ist allerdings auch mit Krankheiten assoziiert (Chen *et al.* 2007). Eine nicht normal ablaufende Genkonversion, wie zum Beispiel im Falle von Polymorphismen in BRCA1 und BRCA2, die im Menschen mit an der Genkonversion beteiligt sind, führt zu Brustkrebs. Darüber hinaus kann Genkonversion während der Meiose im schlimmsten Fall zu einer Reihe von Erbkrankheiten führen.

Das erste Modell für homologe Rekombination, das auch Genkonversion erklärte, wurde 1964 von Holliday entworfen und nach ihm benannt (Holliday 1964). Holliday ging seinerzeit noch von Einzelstrangbrüchen aus, die dazu führen, dass die homologen DNA-Stränge aufgewunden und die Einzelstränge ausgetauscht werden. Dadurch entsteht eine Struktur aus vier DNA-Strängen, die sogenannte Holiday-Junction, die wieder aufgelöst wird. Hierbei kommt es entweder zum reziproken Austausch von DNA-Sequenzen (Crossover) oder zum nicht-reziproken Austausch (Genkonversion) (Santoyo und Romero 2005). Da es allerdings immer mehr Hinweise darauf gab, dass es sich eher um Doppelstrang- als um Einzelstrangbrüche handelt, wurde 1983 das Double-Strand Break Repair-Modell (DSBR) entwickelt, das bis heute gilt (Szostak *et al.* 1983) (siehe Abb. 4). Hierbei werden nach einem Doppelstrangbruch im Empfängeremolekül (siehe Abb. 4 [A] in rot) die Einzelstränge in 5'-3'-Richtung abgebaut (siehe Abb. 4 [B]), wodurch eine Lücke mit 3'-Überhängen generiert wird. Einer dieser 3'-Überhänge kann nun das homologe Donormolekül infiltrieren (siehe Abb. 4 [C] in schwarz), welches der DNA-Polymerase als Template für die Neusynthese des Stranges dient (siehe Abb. 4 [D]). Der durch die Invasion entstandene D-Loop im Donormolekül, kann nun an den verbleibenden 3'-Überhang des Akzeptormoleküls binden und dort ebenfalls als Template dienen (siehe Abb. 4 [H]). Nach der Ligation entstehen die oben erwähnten Holiday-Junctions (siehe Abb. 4 [I]). Nach der Auflösung der Holiday-Junctions werden die noch vorhandenen Lücken aufgefüllt (siehe Abb. 4 [G] – Conversion by gap filling) oder es entsteht ein Heteroduplex (siehe Abb. 4 [G] – Conversion by heteroduplex formation), der in einem nachfolgenden Prozess durch das Methyl-Directed Mismatch Repair System (MMR) oder während der Replikation aufgelöst wird (Hastings 2010). Hierdurch kommt es zur Genkonversion. Da die Holiday-Junctions allerdings innerhalb der homologen Sequenzen beweglich sind, kommt es bei der Auflösung neben der

Genkonversion auch in 50 % der Fälle zu Crossover. Bei vielen Arbeiten in Hefe jedoch, wurden Genkonversionsereignisse gehäuft ohne Crossover beobachtet, weshalb das DSBR-Modell modifiziert wurde und das Synthesis-Dependent Strand Annealing-Modell (SDSA) entstand (Santoyo und Romero 2005) (siehe Abb. 4). Hierbei verlaufen die ersten Schritte ähnlich wie beim DSBR-Modell (siehe siehe Abb. 4 [A] - [D]), jedoch kommt es nicht dazu, dass der D-Loop des Donormoleküls an das übrige 3'-Ende des Akzeptormoleküls bindet, stattdessen lösen sich die beiden Moleküle wieder voneinander (siehe siehe Abb. 4 [E]). Der reparierte Einzelstrang wird ligiert und dient dem anderen dann als Template (siehe siehe Abb. 4 [F]). Im Gegensatz zur DSBR kommt es beim SDSA nur zur Genkonversion und nicht zum Crossover.



**Abb. 4: Molekulare Mechanismen von SDSA und DSBR (Hastings 2010)**

Gezeigt sind die akzeptierten molekularen Mechanismen, die zu Genkonversion führen können: Synthesis-Dependent Strand Annealing (SDSA) und Double-Strand Break Repair (DSBR). Gepunktete Linien zeigen DNA-Synthese an. Für eine genauere Beschreibung, siehe obigen Text.

In Eukaryoten werden während der Meiose Doppelstrangbrüche durch spezielle Topoisomerase-ähnliche Enzyme induziert (SPO11), während Doppelstrangbrüche in der Mitose durch radioaktive Strahlung, festgefahrene Replikationsgabeln oder spezielle Endonukleasen verursacht werden (Chen *et al.* 2007). Es gibt vier Mechanismen, wie Doppelstrangbrüche repariert werden können (Amunugama und Fishel 2012). Im Folgenden wird aber nur auf die homologe Rekombination

eingegangen, die in Genkonversion resultieren kann. In Hefe als Beispiel für Eukaryoten werden Doppelstrangbrüche durch den Mre11-Rad50-Xrs2-Komplex (MRX) erkannt. Die im Komplex enthaltene Sae2-Endonuklease beginnt die Einzelstränge in 5'-3'-Richtung abzubauen, für den umfangreicheren Abbau werden jedoch die Exo1- und Dna2-Nuklease sowie der Sg1-Top3-Rmi1-Komplex (STR) hinzugezogen. Rad52 rekrutiert Rad51, das die Suche nach homologen Bereichen, sowie die Invasion des Donorstranges und die homologe Rekombination katalysiert. Rad51 ist zentraler Bestandteil der homologen Rekombination und ist homolog zu RecA in Bakterien und RadA in Archaea (Capes *et al.* 2011). Rad52 sorgt dafür, dass der D-Loop des Donorstrangs an dem verbleibenden 3'-Überhang der Akzeptor-DNA binden kann (Amunugama und Fishel 2012). Ein weiterer Faktor, der an der homologen Rekombination in Hefe beteiligt ist, ist Rad54, das gleich mehrere Funktionen erfüllt: Es interagiert mit Rad51, um die Einzelstrang-DNA zu stabilisieren und die Suche nach homologen DNA-Sequenzen zu stimulieren, bei der es auch den Umbau von Chromatin katalysiert. Es hilft bei der Wanderung der Holiday-Junction, interagiert mit spezifischen Endonukleasen, um die Auflösung der Holiday-Junction voranzutreiben und entfernt Rad51 am Ende der Doppelstrangreparatur von der DNA. Die Auflösung der Holiday-Junction erfolgt durch Ydc2, die analog zum bakteriellen RuvC funktioniert.

In Wildtyp-*E. coli* Zellen gibt es zwei Mechanismen für homologe Rekombination: RecBCD und RecF, wobei ersterer der bevorzugte Mechanismus ist (Santoyo und Romero 2005). Im Folgenden wird zuerst der RecBCD-Mechanismus beschrieben (Spies und Kowalczykowski 2004). Nach der Bindung der RecBCD-Helikase/Nuklease an das blunt- oder fast blunt-Ende der Doppelstrang-DNA, wandert sie ATP-abhängig die DNA entlang, windet sie auf und baut die DNA ab, bis sie auf den Rekombinations-Hot-Spot  $\chi$  trifft. Hier wird der Abbau in 3'-Richtung runter- und in 5'-Richtung hochreguliert, sodass 3'-Überhänge generiert werden. Darüber hinaus ist RecBCD nun in der Lage RecA an den neugenerierten Einzelstrang zu rekrutieren. RecA kann nun nach homologen Sequenzen suchen und diese infiltrieren, wodurch es zur homologen Rekombination kommt. Beim RecF-Mechanismus bindet in den meisten Fällen die RecQ-Helikase (alternativ UvrD oder HelD) an die DNA und beginnt diese in 3'-5'-Richtung aufzuwinden, während die RecJ-Exonuklease zeitgleich die DNA in 5'-3'-Richtung abbaut, wodurch ein 3'-Überhang entsteht. Nun dissoziieren RecQ und RecJ von der DNA ab und der

RecFOR-Komplex assembliert sich an der ssDNA-dsDNA-Kreuzung. RecFOR rekrutiert RecA, wodurch es zur homologen Rekombination kommt. Bei beiden Mechanismen wird die Holiday-Junction durch die Proteine RuvA, RuvB und RuvC aufgelöst. RuvA erkennt und bindet dabei die Holiday-Junction, RuvB bindet in je einem hexameren Ring zwei gegenüberliegende Stränge, wodurch es zur Translokation der Holiday-Junction kommt und RuvC die gegenüberliegenden Stränge schneidet.

Bei der homologen Rekombination im RecBCD-Mechanismus kann es sowohl zum Crossover als auch zur Genkonversion kommen, wobei es häufiger zum reziproken Austausch kommt (Santoyo und Romero 2005). Interessanterweise kommt es beim RecF-Mechanismus fast immer zur Genkonversion und nur sehr selten zu einem Crossover (Santoyo und Romero 2005).

Bei Archaea ist indes noch nicht so viel über die Mechanismen der homologen Rekombination oder auch Genkonversion bekannt. Eine Suche bei „Pubmed“ mit den Stichwörtern „gene conversion“ und „archaea“ im Titel oder Abstract ergab 19 Treffer. Bis auf zwei handelt es sich hierbei um falsch-positive Treffer, Reviews oder bioinformatische Analysen. Tatsache ist, dass auch Archaea Genkonversion betreiben können (Hildenbrand *et al.* 2011; Lange *et al.* 2011) und dass ihre homologe Rekombination im Allgemeinen der der Eukaryoten ähnelt (Allers und Ngo 2003; White 2011). Darüber hinaus sind sowohl in *Halobacterium salinarum* NRC-1 als auch in *Haloferax volcanii* Mre11 und Rad50 annotiert, die in Eukaryoten Doppelstrangbrüche erkennen. In *Halobacterium salinarum* NRC-1 ist Mre11 essentiell für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen und eine Deletion führt zu weniger homologen Rekombination, während das bei Rad50 nicht der Fall ist (Kish und DiRuggiero 2008). In *Haloferax volcanii* dagegen kommt es in einer Doppelmutante zu mehr homologer Rekombination (Delmas *et al.* 2009). In *P. furiosus* stimulieren Mre11 und Rad50 den archaea-spezifischen HerA-NurA-Komplex, der mit dem Abbau der DNA in 5'-Richtung beginnt (Hopkins und Paull 2008). In allen bisher sequenzierten Archaea konnte RadA, das homolog zu RecA in Bakterien und Rad51 in Hefe ist, identifiziert werden und es ist essentiell für homologe Rekombination (Woods und Dyll-Smith 1997). Darüber hinaus konnten RecJ-ähnliche Exonukleasen identifiziert werden, genannt Arj, sowie Nukleasen der RecB-Familie wie sie im RecBCD-Komplex in Bakterien vorkommen (Capes *et al.* 2011). Archaelle Homologe der Holiday Junction Resolvase in Eukaryoten bzw. UvrC

in Bakterien konnten darüber hinaus ebenfalls identifiziert werden und scheinen die gleiche Funktion zu besitzen (Komori *et al.* 1999; Komori *et al.* 2000; Lestini *et al.* 2010; Capes *et al.* 2011). Lediglich ein Enzym ist bis jetzt bekannt, das großen Einfluss auf die Genkonversion im Speziellen hat: die Hef-Helikase. Die Hef-Helikase ist vermutlich daran beteiligt eine festgefahrene Replikationsgabel aufzulösen und kann die Auflösung von Holiday-Junctions bei Fehlen der Holiday Junction Resolvase übernehmen (Lestini *et al.* 2010; Lestini *et al.* 2013). Eine Deletion vermindert die Rekombinationsrate auf 45 % des Wildtyps, wobei davon eher die Genkonversion als das Crossover betroffen ist (Lestini *et al.* 2010). Da eine Doppeldeletion mit RadA möglich ist, besteht die Vermutung, dass die Hef-Helikase auf eine RadA unabhängige Weise homologe Rekombination ermöglicht.

Genkonversion hat einen GC-bias, d.h. es wird bevorzugt die GC-reichere Sequenz als Template verwendet (Galtier und Duret 2007; Lassalle *et al.* 2015). Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Gegenreaktion zu Mutationen, die bevorzugt in AT-Richtung ablaufen (Hershberg und Petrov 2010). Darüber hinaus konnte in *Rhizobium etli* gezeigt werden, dass bevorzugt die DNA-Sequenz als Akzeptor dient, die einen Doppelstrangbruch aufweist (Yanez-Cuna *et al.* 2016). Die Genkonversionraten variieren zwischen verschiedenen archaelen und bakteriellen Spezies (Vos und Didelot 2009). Es besteht eine Korrelation zwischen Genkonversionsrate und GC-Anteil des Genoms (Lassalle *et al.* 2015).

## 2.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziele dieser Arbeit waren die Untersuchung der Regulation der Polyploidie und der Charakterisierung der Genkonversion als Vorteil von Polyploidie.

Da die DNA-Replikation ein entscheidender Schritt bei der Regulation der Polyploidie zu sein scheint, sollten zunächst Einzeldelentionsmutanten aller 16 *orc1/cdc6*-Replikationsinitiationsgene generiert werden. Diese sollten dann mithilfe von Mikrotiterwachstumstest unter verschiedenen Wachstumsbedingungen mit dem Wildtyp verglichen werden und die Kopienzahl aller drei Replikons – Hauptchromosom, pHV1 und pHV3 – mittels qPCR bestimmt werden.

Im Weiteren sollten die 5'-Regionen der Replikationsursprünge *ori1* und *ori2* auf dem Hauptchromosom genauer untersucht werden, da sich in einer vorangegangenen Arbeit herausstellte, dass sie einen Einfluss auf das Ploidielevel haben (Maurer 2015). Hierfür sollte zunächst per Northern-Blot die Expression des hoch-

konservierten in der upstream-Region von ori1 annotierten *oap*-Operons untersucht werden. Als nächstes sollten Tryptophan-induzierbare Hexahistidin-getaggte Überexpressionsvektoren der in der 5'-Region beider Replikationsursprünge liegenden Gene generiert werden. Nach Transformation in den Wildtyp, sollten diese Mutanten dann mittels Mikrotiterwachstumstest zu verschiedenen Induktionszeitpunkten untersucht und die überexprimierten Proteine im Western-Blot detektiert werden. Zusätzlich sollten Deletionsmutanten der beiden Helikasen (*HVO\_3010* und *HVO\_1723*) und einem Gen des *oap*-Operons (*HVO\_3014*) angefertigt und die Genomkopienzahl mittels qPCR bestimmt werden. Darüber hinaus sollten die Deletionsmutanten der Helikasen komplementiert, die Helikasen überexprimiert und ihr Einfluss auf das Ploidielevel mittels qPCR untersucht werden. Hierfür sollte zunächst die optimale Induktionsdauer zur Bestimmung der Genomkopienzahl per Western-Blot ermittelt werden.

Um die Genkonversion als Vorteil der Polyploidie untersuchen zu können, sollte eine Methode entwickelt werden, um die Genkonversion mittels farblicher Veränderung einer Kolonie sichtbar zu machen. Hierfür sollte sich *H. volcaniis* Carotinoidbiosynthese zu Nutze gemacht werden. Mittels Protoplastenfusion sollten zwei verschiedene, auxotrophe Elternstämme verschmolzen werden, um eine heterozygote Tochterzelle zu generieren. Nach Reparatur des Carotinoidbiosynthesegens durch Genkonversion sollte ein roter Keil aus einer weißen Kolonie herauswachsen. Hierzu sollten zunächst die zwei benötigten auxotrophen Stämme konstruiert und dann die beiden verschiedenen, komplementären Konstrukte für die Reparatur des Carotinoidbiosynthesegens in je einen Stamm eingebracht werden. Zur Ermittlung der Genkonversionsrate sollten mehrere tausend Klone ausgestrichen und auf rote Keile untersucht werden. Zusätzlich sollten hundert weiß-gebliebene Kolonien mittels PCR auf Genkonversion untersucht werden – hierfür sollten sowohl unter Selektionsdruck als auch nicht unter Selektionsdruck stehende Loci berücksichtigt werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Analysewaage	TE124S	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav	FVS/2	Fedegari Autoclavi S.p.A., Albuzzano (ITA)
	SANOclav LaM-201	Maschinenbau Wolf GmbH, Bad Überkingen
Elektroblotting-Apparatur	Fastblot B43	Biometra GmbH, Göttingen
Einkanalpipette	Eppendorf Research 0,01-2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg
	Discovery Comfort 2-20 µl	HTL Lab Solution, Warschau (POL)
	Discovery Comfort 20-200 µl	HTL Lab Solution, Warschau (POL)
	Discovery Comfort 100-100 µl	HTL Lab Solution, Warschau (POL)
Glaspipette	5 ml	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
	10 ml	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
	20 ml	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Heizblock	EPT-130-36-1,5	Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG, Bielefeld
	HB-1302	HLC
	BT3	Grant Instruments Ltd, Royston (GBR)
Heizrührer	COMBIMAG RCT	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
	IKAMAG® RCT	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
	RET basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
	MAG HS 7	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Horizontalschüttler	REAX 3	Heidolph Instruments, Schwabach
	KS10	Edmund Bühler, Tübingen
	G10 Gyration®	New Brunswick Scientific, New York (USA)
Hybridisierungsöfen	HB-1000 Hybridizer	UVP LLC, Upland (USA)
	Mini Oven MK II	Hybaid Ltd., Ashford (GBR)
	OV 1000	Analytic Jena AG, Jena
Inkubator	kelvitron® t	Heraeus Instruments, Hanau

Kühlbrüter	T 257	Rubarth Apparate GmbH, Laatzen
	T 165	Rubarth Apparate GmbH, Laatzen
Microwelle	R-7180	Sharp, Osaka (JPN)
Mikroskop	Axiostar Plus	Carl Zeiss, Göttingen
Mikrotiterplattenphotometer	SPECTRAmax® 340PC	Molecular Devices, Sunnyvale (USA)
Mikrotiterplattenschüttler	Titramax 1.000	Heidolph Instruments, Schwabach
Mehrkanalpipette	Discovery Comfort 5-50 µl	HTL Lab Solution, Warschau (Polen)
	Discovery Comfort 20-200 µl	HTL Lab Solution, Warschau (Polen)
Minitischzentrifuge	NG002R	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren
	SD 220 VAC	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Neubauer-Zählkammer	0,02 mm Tiefe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
PAGE-Gelsystem	Minigel Twin (010_130)	Biometra GmbH, Göttingen
Pipettierhilfe	Accurpette	VWR International, Radnor (USA)
	pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
pH-Meter	CG 825	Schott, Mainz
qPCR-Thermocycler	Rotor Gene RG-3000	Corbett Research, Melbourne (AUS)
Rollinkubator	RSM 7-12V	Patek
Schüttelinkubator	innova 4300	New Brunswick Scientific, New York (USA)
	SI 20 (K30-300)	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern
Spannungsquelle	Power PAC 300	Bio-Rad Life Science, Hercules (USA)
	E835	Consort Instruments, Turnhout (BEL)
Thermocycler	GeneAmp® PCR System 2400	Applied Biosystems, Foster City (USA)
	GeneAmp® PCR System 2720	Applied Biosystems, Foster City (USA)
	GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City (USA)
	Mastercycler gradient Veriti™ 96-Well Thermal Cycler	Eppendorf AG, Hamburg Applied Biosystems, Foster City (USA)
Tischwaage	PM4800 DeltaRange®	Mettler-Toledo, Columbus (USA)
	PB300	Mettler-Toledo, Columbus (USA)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg
	Biofuge 13	Heraeus Instruments, Hanau

Röntgenkassette	Rotilabo <sup>®</sup> -Röntgenkassette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
UV-Stratalinker <sup>™</sup>	1800	Stratagene, La Jolla (USA)
UV-Tisch	UVT-28 ME	Herolab GmbH, Wiesloch
	Darkroom Hood RH-5.1	Herolab GmbH, Wiesloch
UV-Vis Spektralphotometer	Specord S 600	Analytik Jena, Jena
	Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)
Vortexer	VF2	IKA@-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Wasserbad	EM/3	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zellaufschlussgerät	FastPrep <sup>®</sup> -24	MP Biomedicals, Santa Ana (USA)
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
5 ml Spritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen	4606051V
8-well PCR Tube Strips 0.2 ml with single flat caps	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren	FG-088WF
10 ml Spritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen	4606108V
50 ml Luer-Lok <sup>™</sup> -Spritze	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)	300865
96 Well Multiply <sup>®</sup> -PCR Plate, half skirt	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	72.1979.202
96 Well Multiply <sup>®</sup> -PCR Plate, skirted	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	72.1980.202
Adhesive PCR Sealing Foil Sheets	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)	AB-0626
Amersham Hyperfilm <sup>™</sup> MP	GE Healthcare, Little Chalfont (GBR)	28906850
Deckel für Mikrottestplatte	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	82.1584
Deckgläser	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs- GmbH, Braunschweig	1
Dialyseplättchen ø 13 mm	Merck KGaA, Darmstadt	VSWP01300
Eppendorf Tubes <sup>®</sup> 5.0 mL	Eppendorf AG, Hamburg	0030 119.460
Faltenfilter ø 240 mm	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren	531 024
Filtropur BT25 0.2, 250 ml Bottle Top Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	83.1822.101
Filtropur S 0.45	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	2014-10
Gel-Blotting-Papiere, Whatman <sup>®</sup> 3MM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	4928.1
Glasperlen ø 0,10-0,11 mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen	854140/0
Glasperlen ø 0,25-0,5 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	A553.1
Glasperlen ø 4mm	Paul Marienfeld GmbH, Lauda- Königshofen	4901004
Handschuhe NITRILE, Größe M	VWR International, Radnor (USA)	112-2372
Handschuhe NITRILE light, Größe M	VWR International, Radnor (USA)	112-2755

Immobilon-P Membran, PVDF, 0,45 µm (Western-Blot)	Millipore Cooperation, Bedford (USA)	IVPH00010
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	67.742
MEMBRA-CEL® Dialyseschlauch, 3,5 kDa	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg	44310.02
Mikro-Schraubenröhre 2 ml, PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	72.694.006
Mikro-Zentrifugenröhrchen für hohe G-Kräfte	VWR International, Radnor (USA)	20170-036
Mikrotestplatte 96 Well, R	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	82.1582
Objektträger	DIAGONAL GmbH & Co. KG, Münster	K0015d
Parafilm	Bemis Flexible Packaging, Neenah (USA)	PM-996
Pasteurpipette 230 mm lang	neoLab Mitte Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg	E-1097
Pasteurpipette 150 mm lang	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt	9250101
Petrischale 92x16 mm mit Nocken	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	82.1473
Pipettenspitze 20 µl, farblos	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	70.1116
Pipettenspitze 200 µl, gelb	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	70.760.012
Pipettenspitze 1000 µl, blau	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	70.762.010
Positiv geladene Nylontransfermembran (Northern-Blot)	GE Healthcare, Little Chalfont (GBR)	RPN203B
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	72.690.001
Rotilabo®-Blottingpapiere, Dicke 1,0 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	CL74.1
Roti®-Nylon plus, 0,45 µm (Southern-Blot)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	K058.1
Röhre 15 ml, 120x17 mm, PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	62.554.502
Röhre 50 ml, 114x28 mm, PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	62.547.254
Röhre 50 ml, 115x28 mm, PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	62.559.001
Safelock Cap Reaktionsgefäß 2,0 ml	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe	04-232-1200
Sterifilter 0,2 µm	GE Healthcare, Little Chalfont (GBR)	10 462 200
Steristopfen®	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg	21.5
Strip Tubes and Caps, 0,1 ml (qPCR)	Qiagen, Venlo (NLD)	981103

### 3.1.3 Chemikalien

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	9105.4
2'-Deoxythymidin	AppliChem GmbH, Darmstadt	A2265
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP)	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)	R0142
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP)	Bioline Reagents, London (GBR)	DC-416102
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP)	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)	R0162
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat (dTTP)	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)	R0172

2-Propanol (Isopropanol)	VWR International, Radnor (USA)	20842.330
3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	M3183
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-gal)	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1007
5-Fluororotsäure (5-FOA)	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)	R0812
Acrylamid/Bis-acrylamid (30 %)	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	A3699
Agarose	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm	M3044
Agarose (hochauflösend)	Lonza, Basel (CHE)	50180
Adenin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	3025.2
Ammoniumchlorid	VWR International, Radnor (USA)	21236.267
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	9592.2
Ampicillin Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt	A0839
L-Arginin	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	A-5006
Bacto™-Agar	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)	214010
Bacto™-Casaminosäuren	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)	223050
Bacto™-Trypton	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)	211705
Bacto™-Hefeextrakt	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)	212750
Betain	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	61962
Blocking-Reagenz	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz (CHE)	11 096 176 001
BME Vitamins 100x solution	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	B6891
<i>ortho</i> -Borsäure	VWR International, Radnor (USA)	20185.297
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	A512.1
CDP- <i>Star</i>	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz (CHE)	11685627001
Desoxyribnukleinsäure-Natriumsalz aus Lachshoden	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	D1626
Calciumchlorid	VWR International, Radnor (USA)	22317.297
Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	X985.2
Cobalt(II)-chlorid	Merck KGaA, Darmstadt	2539
Coomassie® Brilliantblau Blue R-250	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1092
Dextransulfat	VWR International, Radnor (USA)	0198
Diethyldicarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	K028.2
Diethylether	VWR International, Radnor (USA)	23811.292
Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)	233520

Digoxigenin Desoxyuridintriphosphat (Dig-UTP)	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz (CHE)	11573179910
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	4720.1
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	6908.2
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	P742.1
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	P015.1
Eisessigsäure	VWR International, Radnor (USA)	20104.334
Entwickler	Carestream dental Ltd., Atlanta (USA)	190 0943
Ethanol absolut	VWR International, Radnor (USA)	20821.321
Ethidiumbromidlösung 0,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	HP46.1
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (Na <sub>2</sub> EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	8043.2
Ethylenglykol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	6881.1
Ficoll 400	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	F-4375
Fixierer	Eastman Kodak Company, Rochester (USA)	190 1875
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	4979.1
Formamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	6749.2
Glycerin 87 %	VWR International, Radnor (USA)	24385.295
Glycin	AMRESCO Inc., Solon (USA)	0167
D(+)-Glukose Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt	1.08342
Guanidinthiocyanat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	0017.2
Harnstoff	VWR International, Radnor (USA)	28877.260
L-Isoleucin	AppliChem GmbH, Darmstadt	A3642
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1008
Kaliumacetat	VWR International, Radnor (USA)	26764.298
Kaliumchlorid	VWR International, Radnor (USA)	26667.236
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt	1.04873
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat Trihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	6878.2
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt	1.05033
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	CN82.2
<i>N</i> -Lauroylsarcosin (30 %)	AppliChem GmbH, Darmstadt	A3457
L-Leucin	Merck KGaA, Darmstadt	1.05360
Lithiumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	5547.1
L-Lysin-Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	4207.2
Maleinsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	K304.2
Magermilchpulver	VWR International, Radnor (USA)	84615
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	VWR International, Radnor (USA)	25108.295
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	VWR International, Radnor (USA)	25165.292
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	Merck KGaA, Darmstadt	5927
Methanol	VWR International, Radnor (USA)	20847.320
Methionin	Merck KGaA, Darmstadt	1.05707
Methylenblau	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	MB-1
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	4227.1

Molybdänsäure	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	M-0878
Natriumacetat	VWR International, Radnor (USA)	27653.260
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	3957.5
<i>tri</i> -Natriumcitat Dihydrat	VWR International, Radnor (USA)	27833.363
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt	6576
Natriumhydroxid	VWR International, Radnor (USA)	28244.295
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	CN30.3
Natriummolybdat-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	0274.3
Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt	6742
Nicotinamidenindinukleotid (NAD <sup>+</sup> )	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1124
Novobiocin Natriumsalz	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	N1628
Pepton	Oxoid Ltd., Basingstoke (GBR)	L37
L-Phenylalanin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	4491.1
Polyethylenglykol 600	AppliChem GmbH, Darmstadt	A5336
Polyethylenglykol 3350	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	0156.1
Polyethylenglykol 8000	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	P-2139
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	M79603
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	T844.2
Saccharose	AMRESCO Inc., Solon (USA)	0335
Salzsäure (25 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	6331.4
TE-gesättigtes Phenol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	0038.3
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	2367.3
L-Threonin	Merck KGaA, Darmstadt	1.08411
Tinte	Pelikan	-
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem GmbH, Darmstadt	A1086
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	3051.2
tRNA aus Hefe	AppliChem GmbH, Darmstadt	A3931
L-Tryptophan	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	4858.2
Tween <sup>®</sup> 20	AppliChem GmbH, Darmstadt	A4974
L-Tyrosin	Merck KGaA, Darmstadt	8371
Uracil	AppliChem GmbH, Darmstadt	A0667
D/L-Valin	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	V-0375
Xylencyanol FF	AppliChem GmbH, Darmstadt	A4976
Zinksulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	Z-4750

### 3.1.4 Kit-Systeme

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	VWR International, Radnor (USA)	D2500-01
GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	NA0200-1KT
GenUP™ PCR Cleanup Kit	biotechrabbit GmbH, Berlin	BR0700303
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)	K0223
NucleoSpin® Plasmid	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren	740588.250
Roti®-Lumin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe	P078.1

### 3.1.5 Enzyme

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)	F530
KOD Hot Start DNA Polymerase	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	71086
Lysozym	AppliChem GmbH, Darmstadt	A497
RNase (DNase frei)	AppliChem GmbH, Darmstadt	A3832
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)	EL0011
T5 Exonuklease	New England Biolabs, Ipswich (USA)	M0363
Taq-DNA-Polymerase	Eigenisolat	-
Taq-DNA-Polymerase	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	331610
Taq-Ligase	New England Biolabs, Ipswich (USA)	M0208

### 3.1.6 Antikörper

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz (CHE)	11 093 274 910
Anti-Mouse IgG-Peroxidase antibody	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis (USA)	A9044-2ML
Penta-His™ Antibody	Qiagen, Venlo (NLD)	34660

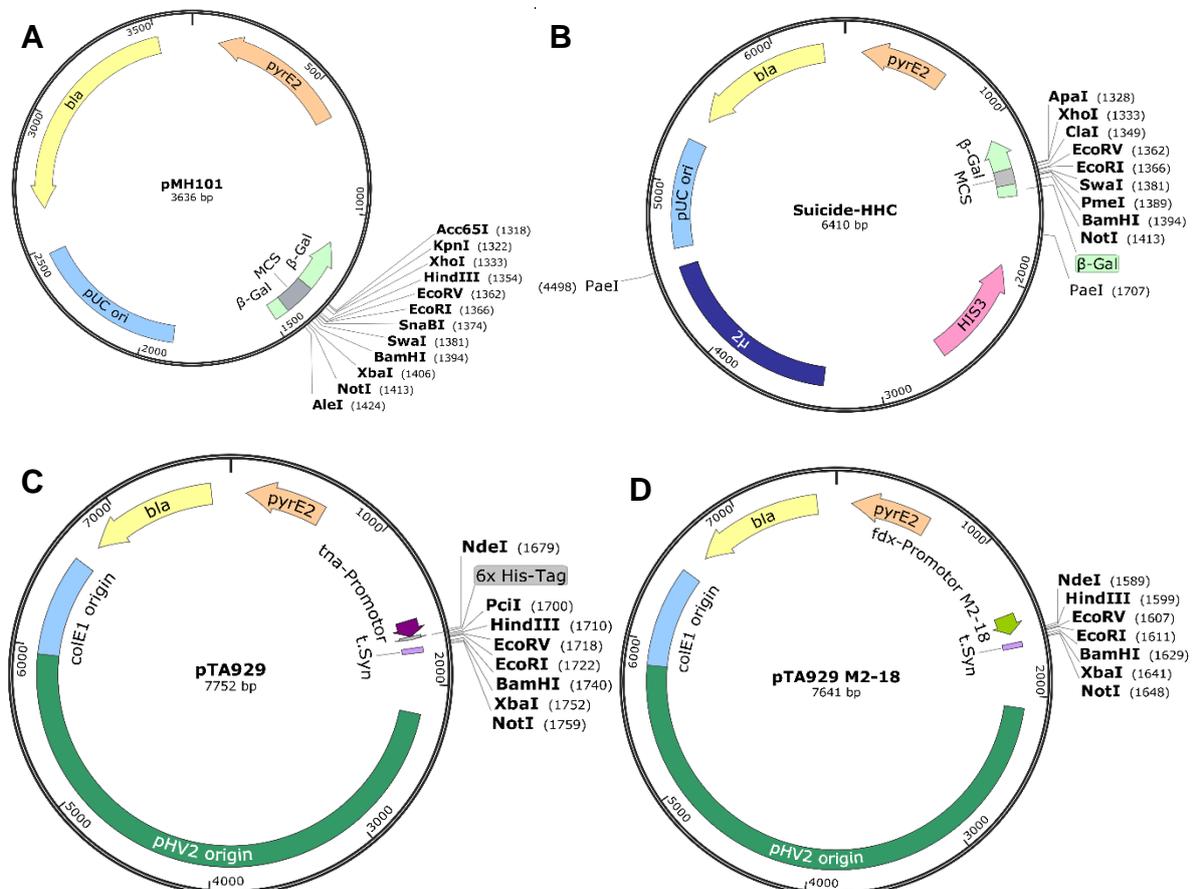
### 3.1.7 Größenstandards

Produkt	Hersteller	Artikelnummer
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)	SM0312
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)	SM0321
GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)	SM1213
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)	26616
RiboRuler High Range RNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington (USA)	SM1821

### 3.1.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Aldrich bezogen und mit TE-Puffer zu einer Konzentration von 50 µM gelöst. Eine Liste mit den verwendeten Oligonukleotiden befindet sich im Anhang.

### 3.1.9 Plasmide



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Ausgangsplasmide.**  
A) pMH101, B) Suicide-HHC, C) pTA929 und D) pTA929 M2-18

**Tab. 1: verwendete Plasmide**

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Quelle</b>
pMH101	<i>Haloferax</i> -Suicide-Vektor mit <i>pyrE2</i> -Gen, Amp-Resistenz ( <i>bla</i> ) und pUC-Origin	(Hammelman und Soppa 2008)
Suicide-Halo-Hefe-E.coli-Plasmid (S-HHC)	<i>Haloferax</i> -Suicide-Vektor mit <i>pyrE2</i> -Gen, <i>HIS3</i> -Gen, Hefe-Origin 2 $\mu$ , Amp-Resistenz ( <i>bla</i> ) und pUC-Oirigin	diese Arbeit
pTA929	Expressionsvektor mit Tryptophan-induzierbarem Promotor ( $P_{trn}$ ), <i>pyrE2</i> -Gen, pHV2-Origin, Amp Resistenz ( <i>bla</i> ) und pUC-Origin	(Allers <i>et al.</i> 2010)
pTA929_M2-18	Expressionsvektor mit mittelstarkem, konstitutivem Promtor ( $P_{fdxM2-18}$ ), <i>pyrE2</i> -Gen, pHV2-Origin, Amp-Resistenz ( <i>bla</i> ) und pUC-Origin	diese Arbeit
pMH101_Δ0001	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_0001</i> ( <i>orc1</i> )	diese Arbeit
pMH101_Δ0194	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_0194</i> ( <i>orc9</i> )	diese Arbeit
pMH101_Δ0634	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_0634</i> ( <i>orc2</i> )	diese Arbeit
pMH101_Δ1537	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_1537</i> ( <i>orc15</i> )	Julia Graf
pMH101_Δ1725	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_1725</i> ( <i>orc5</i> )	Michelle Kuntz
pMH101_Δ2042	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_2042</i> ( <i>orc4</i> )	diese Arbeit
pMH101_Δ2133	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_2133</i> ( <i>orc16</i> )	diese Arbeit
pMH101_Δ2292	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_2292</i> ( <i>orc14</i> )	Florian Röttgerding
pMH101_Δ2293	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_2293</i> ( <i>orc11</i> )	Marie Heß
pMH101_ΔA0001	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_A0001</i> ( <i>orc3</i> )	diese Arbeit
pMH101_ΔA0064	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_A0064</i> ( <i>orc13</i> )	Florian Röttgerding
pMH101_ΔA0072	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_A0072</i> ( <i>orc12</i> )	Malte Bamberg
pMH101_ΔA0257	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_A0257</i> ( <i>orc7</i> )	diese Arbeit
pMH101_ΔB0001	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_B0001</i> ( <i>orc6</i> )	Alexander Bissell
pMH101_ΔC0001	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_C0001</i> ( <i>orc10</i> )	Laura Henke
pMH101_ΔC0057	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_C0057</i> ( <i>orc8</i> )	Ines Mhedhbi
pMH101_Δ2380	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_2380</i> ( <i>cdc48a</i> )	diese Arbeit
pMH101_Δ1723	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_1723</i> ( <i>rad25d</i> )	diese Arbeit
pMH101_Δ3010	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_2380</i> ( <i>hef</i> )	diese Arbeit
pMH101_Δ3012	Plasmid zur Deletion von <i>HVO_3012</i> ( <i>oapC</i> )	diese Arbeit
pTA929_M2-18_0001	Plasmid mit mittelstarkem, konstitutivem Promotor zur Expression von <i>HVO_0001</i> ( <i>orc1</i> ), N-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pTA929_M2-18_1725	Plasmid zur mit mittelstarkem, konstitutivem Promotor zur Expression von <i>HVO_1725</i> ( <i>orc5</i> ), N-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pTA929_M2-18_2133	Plasmid zur mit mittelstarkem, konstitutivem Promotor zur Expression von <i>HVO_2133</i> ( <i>orc16</i> ), N-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pTA929_M2-18_A0257	Plasmid zur mit mittelstarkem, konstitutivem Promotor zur Expression von <i>HVO_A0257</i> ( <i>orc7</i> ), N-terminaler His-Tag	diese Arbeit

pTA929_1723 (pSM14)	Plasmid zur induzierbaren Expression von <i>HVO_1723 (rad25d)</i> , N-terminaler His-Tag	Sandy Maurer
pTA929_1724	Plasmid zur induzierbaren Expression von <i>HVO_1724</i> , C-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pTA929_3010 (pSM13)	Plasmid zur induzierbaren Expression von <i>HVO_3010 (hef)</i> , N-terminaler His-Tag	Sandy Maurer
pTA929_3012	Plasmid zur induzierbaren Expression von <i>HVO_3012 (oapC)</i> , C-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pTA929_3013	Plasmid zur induzierbaren Expression von <i>HVO_3013 (oapB)</i> , C-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pTA929_3014	Plasmid zur induzierbaren Expression von <i>HVO_3014 (oapA)</i> , C-terminaler His-Tag	diese Arbeit
pMH101_Δ1752::2528 (pKS13)	Plasmid zum Austausch von <i>HVO_1752 (Irp)</i> mit <i>HVO_2528</i> , kurze homologe Bereiche zu <i>HVO_1752</i> (150 bp)	Karolin Zerulla
pMH101_Δ1752::2528	Plasmid zum Austausch von <i>HVO_1752 (Irp)</i> mit <i>HVO_2528</i> , lange homologe Bereiche zu <i>HVO_1752</i> (500 bp)	diese Arbeit
pMH101_Δ2958:P <sub>fdx</sub> -2528 (pKS12)	Plasmid zum Austausch von <i>HVO_2958 (oadhA1)</i> mit P <sub>fdx M2-18</sub> vor <i>HVO_2528</i>	Karolin Zerulla
pMH101_Δ2958::P <sub>fdx</sub> -2528mut	Plasmid zum Austausch von <i>HVO_2958 (oadhA1)</i> mit P <sub>fdx M2-18</sub> vor <i>HVO_2528</i> mit 10 nt Deletion	diese Arbeit
pMH101_Δ1752::P <sub>fdx</sub> -2528mut	Plasmid zum Austausch von <i>HVO_1752 (Irp)</i> mit P <sub>fdx M2-18</sub> vor <i>HVO_2528</i> mit 10 nt Deletion	diese Arbeit

### 3.1.10 Mikroorganismen

Name	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> XL <sub>1</sub> blue	Δ( <i>mcrA</i> )183; Δ( <i>mcrCB</i> '- <i>hsdSMR-mrr</i> )173; <i>recA1</i> ; <i>endA1</i> ; <i>gyrA96</i> ; <i>thi-1</i> ; <i>hsdR17</i> ; <i>supE44</i> ; <i>relA1 lac</i> [F' <i>proAB+lacZ</i> ΔM15 Tn10 (TetR)]	Stratagene Europe, Amsterdam (NLD)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK2-1C	MATα; <i>his3D1</i> ; <i>leu2-3_112</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>trp1-289</i> ; MAL2-8c; SUC2	EUROSCARF, Frankfurt
<i>Haloferax volcanii</i> H26	Δ <i>pyrE2</i>	(Allers <i>et al.</i> 2004)
<i>Haloferax volcanii</i> H53	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ0789	(Allers <i>et al.</i> 2004)
<i>H. volcanii</i> H26 Δ0001	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ0001	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 Δ0194	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ0194	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 Δ0634	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ0634	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 Δ1537	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ1537	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 Δ1725	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ1725	Michelle Kuntz
<i>H. volcanii</i> H26 Δ2042	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ2042	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 Δ2133	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ2133	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 Δ2292	Δ <i>pyrE2</i> ; Δ2292	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 ΔA0001	Δ <i>pyrE2</i> ; ΔA0001	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 ΔA0257	Δ <i>pyrE2</i> ; ΔA0257	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 ΔC0001	Δ <i>pyrE2</i> ; ΔC0001	Laura Henke

<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta C0057$	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta C0057$	Ines Mhedhbi
<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta 2380$	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta 2380$	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 pTA929_M2-18	$\Delta pyrE2$ ; Leerplasmid pTA929_M2-18 als Kontrolle	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta 0001$ pTA929_M2-18_0001	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta 0001$ : komplementiert mit pTA929_M2-18_0001 (N-terminaler His-Tag)	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta 1725$ pTA929_M2-18_1725	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta 1725$ : komplementiert mit pTA929_M2-18_1725 (N-terminaler His-Tag)	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta 2133$ pTA929_M2-18_2133	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta 2133$ : komplementiert mit pTA929_M2-18_2133 (N-terminaler His-Tag)	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta A0257$ pTA929_M2-18_A0257	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta A0257$ : komplementiert mit pTA929_M2-18_A0257 (N-terminaler His-Tag)	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 pTA929	$\Delta pyrE2$ ; Leerplasmid pTA929 als Kontrolle	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 pTA929_1723	$\Delta pyrE2$ ; Trp-induzierbare Überexpression von <i>HVO_1723</i> auf pTA929	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 pTA929_1724	$\Delta pyrE2$ ; Trp-induzierbare Überexpression von <i>HVO_1724</i> auf pTA929	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 pTA929_3010	$\Delta pyrE2$ ; Trp-induzierbare Überexpression von <i>HVO_3010</i> auf pTA929	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 pTA929_3012	$\Delta pyrE2$ ; Trp-induzierbare Überexpression von <i>HVO_3012</i> auf pTA929	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 pTA929_3013	$\Delta pyrE2$ ; Trp-induzierbare Überexpression von <i>HVO_3013</i> auf pTA929	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 pTA929_3014	$\Delta pyrE2$ ; Trp-induzierbare Überexpression von <i>HVO_3014</i> auf pTA929	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta 1723$	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta 1723$	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta 3010$	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta 3010$	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta 3012$	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta 3012$	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta 1723$ pTA929_1723	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta 1723$ : komplementiert mit pTA929_1723 (N-terminaler His-Tag)	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta 3010$ pTA929_3010	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta 3010$ : komplementiert mit pTA929_3010 (N-terminaler His-Tag)	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta 2528$ $\Delta 2918$	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta 2528$ ; $\Delta 2918$	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H53 $\Delta 2528$	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta 0789$ ; $\Delta 2528$	Karolin Zerulla
<i>H. volcanii</i> H53 $\Delta 2528$ $\Delta 1752::2528$	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta 0789$ ; $\Delta 2528$ ; <i>HVO_2528</i> anstelle von <i>HVO_1752</i>	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H26 $\Delta 2528$ $\Delta 2918$ $\Delta 1752::P_{tdx}2528mut$	$\Delta pyrE2$ ; $\Delta 2528$ ; $\Delta 2918$ ; $P_{tdx}2528$ (mit 10 nt Deletion) anstelle von <i>HVO_1752</i>	diese Arbeit

### 3.1.11 Software & Datenbanken

Name	Entwickler
BioEdit 7.2.6.1	Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad (USA)
Clone Manager 9 Professional Edition	Scientific & Educational Software, Denver (USA)
Geldoku Software Easy Win 32	Herolab GmbH, Wiesloch
Gimp 2.8	Spencer Kimball, Peter Mattis und das GIMP-Team
HaloLex: <a href="https://www.halolex.mpg.de/public/">https://www.halolex.mpg.de/public/</a>	Max-Planck Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e. V., München
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
NanoDrop 3.5.1	Coleman Technologies Inc., Rockland, USA
Oligocalc: <a href="http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html">http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html</a>	Northwestern University, Evanston (USA)
Photolmpact 10	Ulead Systems Inc., Taipeh (CHN)
Rotor Gene 6.1	Corbett Research, Melbourne (AUS)
SnapGene Viewer	GSL Biotech LLC, Chicago (USA)
Softmax® Pro Software	Molecular Devices LLC, San José (USA)
WinASPECT	Analytik Jena AG, Jena

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Medien und Anzuchtbedingungen

Alle Medien wurden bei 121 °C für 25 min autoklaviert. Hitzeempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 oder 0,4 µm) und nach dem Abkühlen hinzugegeben.

Solange nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen bei Raumtemperatur gelagert. Agarplatten wurden bei 4 °C aufbewahrt.

### Medien und Anzuchtbedingungen für *E. coli*

*E. coli* wurde in 30 - 50 ml Medium (siehe Tab. 2) in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 220 rpm angezogen. Beimpfte Agarplatten wurden bei 37 °C inkubiert.

Tab. 2: Medien für *E. coli*

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
SOB <sup>+</sup>	Trypton	20 g	2 % (w/v)
	Hefeextrakt	5 g	0,5 % (w/v)
	NaCl	0,6 g	10 mM
	KCl	0,187 g	2,5 mM
	1 M MgCl <sub>2</sub> /MgSO <sub>4</sub>	10 ml	10 mM
<b>ad 1 l VE-H<sub>2</sub>O autoklavieren</b>			

Für die Herstellung von Festmedium wurden dem Ansatz 1,2 % Agar zugegeben. Zur Selektion positiver Klone wurden dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Für Blau-Weiß-Selektion wurden dem Medium 10 µl einer 20 mg/ml X-Gal-Lösung (in DMSO) sowie 10 µl einer 100 mM IPTG-Lösung (in H<sub>2</sub>O bidest, sterilfiltriert) pro Milliliter zugegeben.

### Medien und Anzuchtbedingungen für *H. volcanii*

*H. volcanii* wurde in 30 ml Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 42 °C und 275 rpm angezogen. Beimpfte Agarplatten wurden bei 42 °C inkubiert.

Für die Tryptophan-auxotrophe Mutante H53 wurde dem Medium Tryptophan in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Für die Thymin-auxotrophe Mutante Δ2918 wurde dem Medium Thymidin in einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugesetzt.

Im Folgenden sind die verschiedenen, verwendeten *H. volcanii*-Medien dargestellt (siehe Tab. 3 - Tab. 5)

**Tab. 3: Komplexmedium für *H. volcanii***

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Salzlösung	NaCl	125 g	2,1 M
	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	45 g	220 mM
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	10 g	41 mM
	KCl	10 g	13 mM
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,34 g	9 mM
	1 M Tris/HCl pH 7,2	50 ml	50 mM
		<b>ad 900 ml VE-H<sub>2</sub>O</b>	
		<b>autoklavieren</b>	
Nährstofflösung	Hefeextrakt	3 g	0,3 % (w/v)
	Trypton	5 g	0,5 % (w/v)
		<b>ad 100 ml VE-H<sub>2</sub>O</b>	
		<b>autoklavieren</b>	

Spurensalze	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g	3,5 µM
	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,03 g	1,5 µM
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3 g	50 µM
	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,2 g	8,5 µM
	CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g	0,5 µM
	NiCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,02 g	1 µM
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,03 g	1 µM
		<b>ad 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.</b>	
		<b>pH 3-4</b>	
		<b>sterilfiltrieren</b>	
		<b>1 ml/l Medium</b>	
Eisensulfat	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,23 g	8 µM
		<b>ad 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.</b>	
		<b>pH 3-4</b>	
		<b>sterilfiltrieren</b>	
		<b>1 ml/l Medium</b>	
Uracil	Uracil	0,5 g	50 µg/ml
		<b>ad 10 ml DMSO</b>	
		<b>1 ml/l Medium</b>	

Die Salz- und Nährstofflösung wurden nach dem Abkühlen zusammengegossen und mit 1 ml Spurensalzen, 1 ml Eisensulfat und 1 ml Uracil supplementiert.

Im Falle von Pop-Out-Medium wurde dem Medium 5-FOA in einer Endkonzentration von 150 µg/ml zugesetzt.

**Tab. 4: Synthetisches Medium für *H. volcanii***

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Salzlösung		900 ml	
	0,1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 ml	1 mM
	1 M NH <sub>4</sub> Cl	10 ml	10 mM
Spurensalze		1 ml	
Eisensulfat		1 ml	8 µM
BME-Vitaminlösung		1 ml	
C-Quelle (wahlweise)	20 % (w/v) Casaminoäure	12,5 ml	0,25 % (w/v)
	20 % (w/v) Glukose	25 ml	0,5 % (w/v)
	(+ 2 M MOPS pH 7,2)	50 ml	100 mM
		<b>ad 1 l steriles VE-H<sub>2</sub>O</b>	

Zur abgekühlten Salzlösungen wurden nacheinander die oben gelisteten Lösungen steril zugegeben. Als Kohlenstoffquelle wurden in dieser Arbeit entweder

Casaminosäuren oder Glukose verwendet, wobei im Fall von Glukose zusätzlich 50 ml 2 M MOPS pH 7,2 als Puffer hinzugegeben wurde.

**Tab. 5: Hv-Cab Medium für *H. volcanii***

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
30 % gepufferte Salzwasserlösung	NaCl	144 g	2,5 M
	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	18 g	86 mM
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	21 g	85 mM
	KCl	4,2 g	56 mM
	1 M Tris/HCl pH 7,4	12 ml	12 mM
	1 M CaCl <sub>2</sub>	3 ml	3 mM
	<b>ad 600 ml VE-H<sub>2</sub>O</b> <b>autoklavieren</b>		
10x Casaminosäuren	Casaminosäuren	5 g	0,5 % (w/v)
	<b>ad 100 ml VE-H<sub>2</sub>O</b> <b>pH 7,4 mit 2 M KOH</b> <b>sterilfiltrieren</b> <b>bei 4 °C lagern</b>		
100x Spurenelemente	EDTA	5 g	
	FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,324 g	4,9 mM
	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,106 g	370 µM
	CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,018 g	74 µM
	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,018 g	77 µM
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01 g	160 µM
	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	2,513 g	12,7 mM
	NiSO <sub>4</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,017 g	65 µM
	H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,015 g	62 µM
<b>ad 1 l VE-H<sub>2</sub>O</b> <b>pH 7,0 mit NaOH</b> <b>sterilfiltrieren</b> <b>10 ml/l Medium</b>			
BME-Vitaminlösung		1 ml	

Nach dem Abkühlen der 30%-igen gepufferten Salzlösung wurden 100 ml 10x Casaminosäuren, 10 ml 100x Spurenelemente und 1 ml BME-Vitaminlösung hinzugegeben und mit sterilem VE-Wasser auf 1 l aufgefüllt. Das Hv-Cab-Medium wurde für die Überexpression von Proteinen verwendet.

### Medien und Anzucht von *S. cerevisiae*

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte bei 180 rpm und 30 °C.

Zur Herstellung von Festmedien, wurden dem Medium 1,9 % Agar hinzugegeben.

Die verwendeten Medien sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst (siehe Tab. 6 & Tab. 7).

**Tab. 6: Komplexmedium für *S.cerevisiae***

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
YEPD	Pepton	20 g	2 % (w/v)
	Hefeextrakt	10 g	1 % (w/v)
		<b>ad 900 ml mit VE-H<sub>2</sub>O</b>	
		<b>autoklavieren</b>	
		<b>sterile Zugabe von</b>	
	20 % (w/v) Glukose (steril)	100 ml	2 % (w/v)

**Tab. 7: Synthetisches Medium für *S.cerevisiae***

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
SCD	Yeast Nitrogen Base w/o aminoacids and ammonium sulfate	1,7 g	0,17 % (w/v)
	Ammoniumsulfat	5 g	0,5 % (w/v)
	Aminosäuremix-4	50 ml	1x
	1,2 g/l Uracil	16 ml	0,171 mM
	2,4 g/l Tryptophan	8 ml	0,093 mM
	3,6 g/l Leucin	16 ml	0,439 mM
		<b>ad 800 ml mit VE-H<sub>2</sub>O</b>	
	<b>pH 6,3 mit KOH</b>		
	<b>ad 900 ml mit VE-H<sub>2</sub>O</b>		
	<b>autoklavieren</b>		
	<b>sterile Zugabe von</b>		
	20 % (w/v) Glukose (steril)	100 ml	2 % (w/v)

20x Aminosäuremix-4	Adenin	0,224 g	83 $\mu$ M
	Arginin	0,768 g	221 $\mu$ M
	Methionin	0,768 g	258 $\mu$ M
	Tyrosin	0,288 g	80 $\mu$ M
	Isoleucin	1,152 g	439 $\mu$ M
	Lysin	1,152 g	394 $\mu$ M
	Phenylalanin	0,96 g	291 $\mu$ M
	Valin	1,152 g	492 $\mu$ M
	Threonin	1,152 g	484 $\mu$ M
<b>autoklavieren</b>			
<b>bei 4 °C lagern</b>			
<b>50 ml/l Medium</b>			

### 3.2.2 Herstellung von Dauerkulturen

Zur Herstellung von *H. volcanii* Dauerkulturen wurden 25 ml einer spät-exponentiellen Kultur in Szintillationsgefäße überführt und diese fest verschlossen. Die Dauerkulturen wurden bei Raumtemperatur gelagert.

Für Dauerkulturen von *E. coli* wurde eine 76 %-ige Glycerinlösung mit 13 mM MgCl<sub>2</sub> in Kryoröhrchen autoklaviert. Zur Herstellung einer Dauerkultur, wurde 1 ml einer über-Nacht-Kultur hinzugegeben, der Ansatz wurde gemischt und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.3 Wachstum in Mikrotiterplatten

Die Wachstumsversuche in Mikrotiterplatten wurden, wie von Jantzer *et al.* (2011) beschrieben, durchgeführt. Die äußeren Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit 200  $\mu$ l sterilem 1 M NaCl beschickt. In die übrigen Vertiefungen wurden 130  $\mu$ l des entsprechenden Mediums vorgelegt. Die exponentiellen Kulturen wurden auf eine Optische Dichte OD<sub>600</sub> von 0,375 eingestellt, um eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,05 in den Vertiefungen zu erreichen. Hierfür wurde das gewünschte Kulturvolumen bei 13.000 rpm für 5 min abzentrifugiert, einmal mit 500  $\mu$ l sterilem Basalsalz gewaschen und dann in frischen Basalsalz resuspendiert. 20  $\mu$ l der geernteten Zellen wurden zum vorgelegten Medium pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden bei 1.050 rpm und 42 °C inkubiert und die optische Dichte OD<sub>600</sub> in regelmäßigen Abständen bestimmt.

### 3.2.4 Zelldichtebestimmung

Die Zelldichtebestimmung erfolgte zum einen photometrisch, in dem 1 ml der Kultur in Küvetten pipettiert und die Optische Dichte bei OD<sub>600</sub> gemessen wurde oder

mithilfe eines Klettphotometers und zum anderen mit der Neubauer Zählkammer. Hierfür wurden 4 Großquadrate à 64 Kleinquadrate ausgezählt und die Zellzahl pro ml mit der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} * \text{Verdünnungsstufe}}{64} * 2 * 10^7$$

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Isolierung und Reinigung von DNA

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

Für die Isolierung genomischer DNA wurden 10 ml einer exponentiellen Kultur bei 4.000 rpm für 15 min sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 300 µl Basalsalz resuspendiert und durch die Zugabe von 2,5 ml Lyse-Puffer durch Invertieren lysiert. Die Wasserphase wurde vorsichtig mit 5 ml Ethanol überschichtet und die an der Phasengrenze ausfallende DNA mit einer gebogenen Glaskapillare aufgewickelt. Nach einer Inkubation von 5 min, wurde die DNA zweimal in Ethanol und anschließend zweimal in Diethylether gewaschen, ehe sie in 750 µl TE-Puffer überführt und darin gelöst wurde. Genomische DNA wurde bei 4 °C gelagert.

Die Rezepte für die benötigten Lösungen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (siehe Tab. 8).

**Tab. 8: Lösungen für die Isolation genomischer DNA**

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Lyse-Puffer	NaCl	2,9 g	100 mM
	1 M Tris/HCl pH 8,0	50 ml	10 mM
	EDTA	0,146 g	1 mM
	SDS	0,25 g	0,05 %
<b>ad 500 ml mit VE-H<sub>2</sub>O</b>			
TE-Puffer	1 M Tris/HCl pH 8,0	10 ml	10 mM
	1 M EDTA pH 8,0	1 ml	1 mM
<b>ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O</b>			

##### Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* wurde das GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit von Sigma Aldrich nach Herstellerangaben verwendet.

## Reinigung linearer DNA-Moleküle

Für die Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen wurde das GenUP™ PCR Cleanup Kit von biotechrabbit nach Herstellerangaben verwendet.

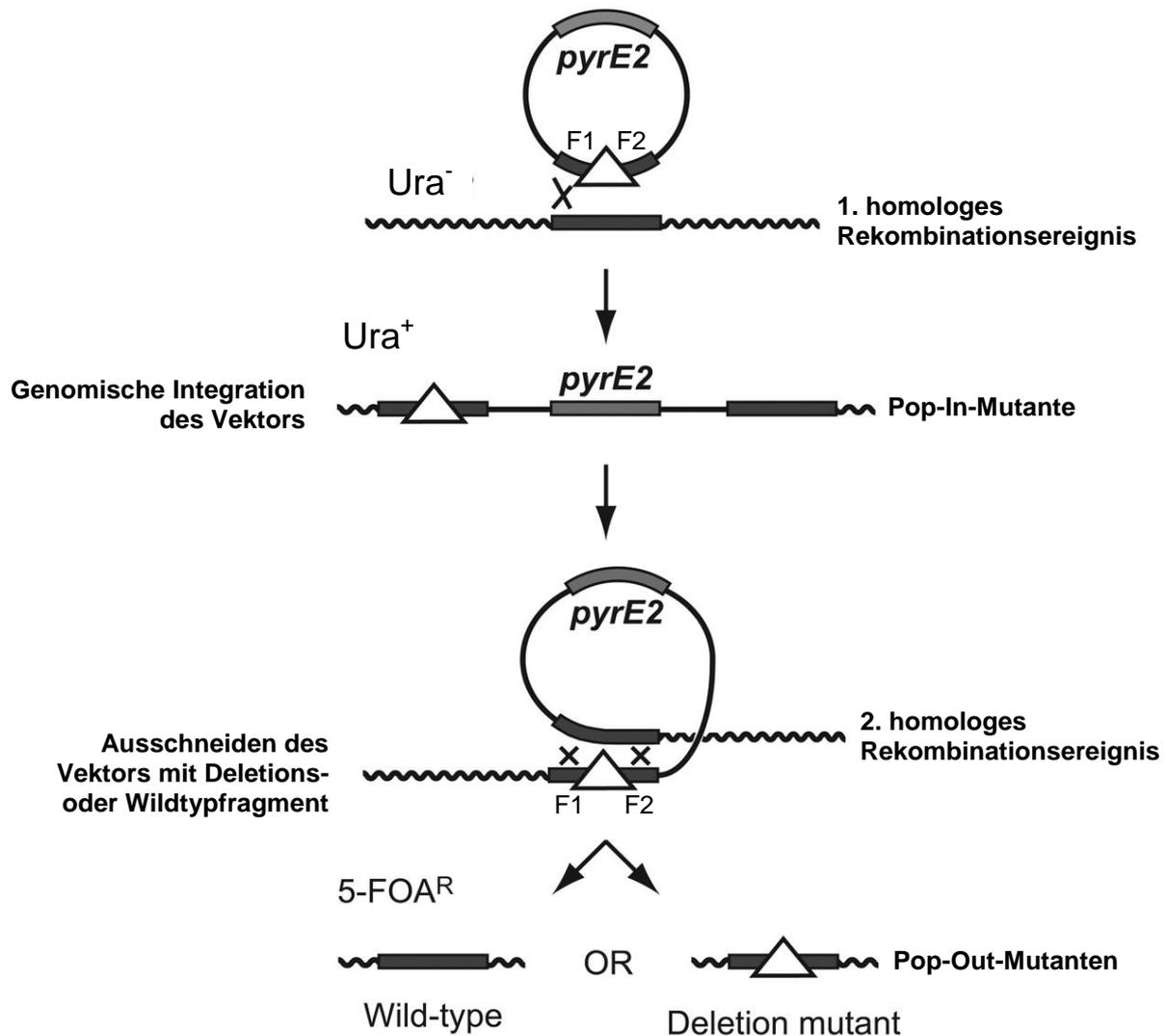
## DNA-Fällung mit Kaliumacetat/Ethanol

Zur Fällung der DNA wurde dem Ansatz 1/10 des Volumens 3 M Kaliumacetat pH 5,5 und 2,5 Volumina 96%-igem Ethanol hinzugegeben und dann für 20 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde für 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen. Danach folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Nachdem kein Ethanolgeruch mehr zu vernehmen war, wurde die DNA in 30 µl TE-Puffer (siehe Tab. 8) aufgenommen.

### 3.3.2 Pop-In/Pop-Out-Methode zur Generierung von Deletionsmutanten

Zur Generierung von Deletionsmutanten wurde die von Allers *et al.* (2004) beschriebene und von Hammelmann und Soppa (2008) weiterentwickelte Pop-In/Pop-Out-Methode angewandt.

Hierfür wurde der Vektor pMH101 verwendet, in den ein Fusionsprodukt aus 500 bp des upstream- (5') sowie 500 bp des downstream (3')-Bereichs des zu deletierenden Gens kloniert wurde. Der Vektor besitzt keinen Replikationsursprung für *H. volcanii* und kodiert für das Gen *pyrE2*, das zur Uracilbiosynthese benötigt wird. Eine Uracil-auxotrophe Mutante ( $\Delta pyrE2$ ) wurde mit dem Vektor transformiert und auf Medium ohne Uracil selektioniert, sodass nur Zellen wachsen konnten, die erfolgreich transformiert wurden und den Vektor in ihre Genom integriert hatten. Im Folgenden ist das Pop-In/Pop-Out schematisch dargestellt (siehe Abb. 6).



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Pop-In/Pop-Out-Methode (modifiziert nach Allers *et al.* (2004))**

Für genaue Beschreibung, siehe Text. *Ura<sup>-</sup>* = Uracil-auxotroph, *Ura<sup>+</sup>* = Uracil-prototroph, *pyrE2* = Uracil-biosynthese Gen, 5-FOA<sup>R</sup> = Selektion über 5-FOA

Durch den fehlenden Replikationsursprung waren die Zellen gezwungen, das Konstrukt zur Vermehrung über eine erste homologe Rekombination in ihr Genom aufzunehmen. Die Rekombination konnte entweder über das upstream- oder das downstream-Fragment erfolgen. Wurde diese Pop-In-Mutante nun 5-Fluororotsäure (5-FOA) ausgesetzt, entstand durch das von *pyrE2* kodierte Enzym das toxische Produkt 5-Fluoruracil. Nur durch Herausschneiden des Konstrukts über ein zweites Rekombinationsereignis konnten die Zellen überleben. Hierbei konnte die Rekombination erneut über das upstream- oder das downstream-Fragment erfolgen, wobei mit gleicher Wahrscheinlichkeit entweder der Wildtyp oder die Deletionsmutante entstand.

Die per PCR als positiv identifizierten Pop-Out-Mutanten wurden 5x in Komplexmedium überimpft, ehe genomische DNA für einen Southern-Blot isoliert wurde.

### 3.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mithilfe des Nanodrop 2000c. Es wurden zunächst 2 µl der entsprechenden Referenz aufgetragen, danach 2 µl der zu messenden Probe.

### 3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### PCR zur Generierung eines Inserts für die Klonierung

Die Generierung von Inserts für die Klonierung erfolgte mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, die eine Proof-Reading-Funktion besitzt.

Es wurde ein spezieller dNTPs-Mix verwendet, der einen höheren Anteil an Guanin und Cytosin besitzt und dadurch besser zur Amplifikation von *H. volcaniis* GC-reichen DNA geeignet ist (siehe Tab. 15).

Der verwendete PCR-Ansatz (siehe Tab. 9) ist im Folgenden dargestellt.

**Tab. 9: PCR-Ansatz der Phusion-Polymerase**

Substanz	Menge	Endkonzentration
5x GC-Puffer	10 µl	1x
1/1,5 mM dNTP66	10 µl	200/300 µM
20 µM Oligonukleotid 1	1,25 µl	0,5 µM
20 µM Oligonukleotid 2	1,25 µl	0,5 µM
Phusion-Polymerase	0,3 µl	0,6 U
Template	variabel	10 ng Plasmid bzw. 50 ng gDNA/50 µl
<b>ad 50 µl H<sub>2</sub>O bidest.</b>		

Für die Generierung von Inserts wurde eine Step-Down-PCR verwendet. Hierfür wurde mit einer Annealing-Temperatur 10 °C über der errechneten Schmelztemperatur der Oligonukleotide begonnen und die Temperatur nach 3 Zyklen um 3 °C abgesenkt, bis die Annealing-Temperatur 5 °C unter der errechneten Schmelztemperatur lag. Im Folgenden ist ein beispielhaftes Step-Down-PCR-Programm bei einer Schmelztemperatur der Oligonukleotide von 60 °C dargestellt (siehe Tab. 10). Zu beachten ist, dass die Phusion-Polymerase bei Plasmid-DNA

lediglich 15 s zur Amplifikation von einem 1 kb benötigt, bei genomischer DNA jedoch 30 s.

**Tab. 10: Step-Down-PCR-Programm**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98	2 min Plasmid, 5 min gDNA	1
Schmelzen	98	15 s Plasmid, 30 s gDNA	
Annealing	70	1 min	3
Elongation	72	variabel	
Schmelzen	98	15 s	
Annealing	67	1 min	3
Elongation	72	variabel	
Schmelzen	98	15 s	
Annealing	64	1 min	3
Elongation	72	variabel	
Schmelzen	98	15 s	
Annealing	61	1 min	3
Elongation	72	variabel	
Schmelzen	98	15 s	
Annealing	58	1 min	3
Elongation	72	variabel	
Schmelzen	98	15 s	
Annealing	55	1 min	20
Elongation	72	variabel	
Aufbewahrung	10	∞	1

### Fusions-PCR

Die Fusions-PCR wurde verwendet, um zwei PCR-Fragmente aneinander zu fusionieren. Hierfür wurden Primer verwendet, die bei den zu fusionierenden Fragmenten einen 12 – 15 bp langen komplementären Überhang erzeugten.

Für die Fusions-PCR wurde die Phusion-Polymerase verwendet. Dem Ansatz wurden zu Beginn keine Oligonukleotide beigefügt, sondern es wurde erst im Laufe der PCR die doppelte Menge an Oligonukleotid zugesetzt (PCR-Ansatz siehe Tab. 9). Es wurden von jedem Fragment je 200 ng eingesetzt. Im Folgenden ist das PCR-Programm der Fusions-PCR dargestellt (siehe Tab. 11).

**Tab. 11: Fusions-PCR-Programm**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	98	5 min	1
Schmelzen	98	30 s	
Annealing	68	1 min	5
Elongation	72	variabel	
Zugabe von je 2,5 µl beider Oligonukleotide	72	5 min	
Schmelzen	98	15 s	
Annealing	68	1 min	25
Elongation	72	variabel	

### Site-Directed-Mutagenesis-PCR

Zur gezielten Einbringung einer Mutation wurde eine Site-Directed-Mutagenesis-PCR mit der KOD-Polymerase verwendet. Die Oligonukleotide wurden nach den Vorgaben des QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (#200518) von Stratagene (San Diego, USA) geplant. Im Folgenden sind der PCR-Ansatz und das PCR-Programm für eine Site-Directed-Mutagenesis dargestellt (siehe Tab. 12 & Tab. 13).

**Tab. 12: PCR-Ansatz für die Site-Directed-Mutagenesis-PCR**

Substanz	Menge	Endkonzentration
10x KOD-PCR-Puffer	5 µl	1 x
2 mM KOD-dNTPs	8 µl	320 µM
25 mM MgSO <sub>4</sub>	3 µl	1,5 mM
20 µM Oligonukleotid 1	1,584 µl	0,634 µM
20 µM Oligonukleotid 2	1,584 µl	0,634 µM
KOD-Polymerase	1 µl	1 U
DMSO	1,5 µl	3 % (v/v)
Plasmid	variabel	50 ng/50 µl
	<b>ad 50 µl H<sub>2</sub>O bidest.</b>	

**Tab. 13: PCR-Programm für die Site-Directed-Mutagenesis-PCR**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	30 s	1
Denaturierung	95	30 s	
Annealing	variabel	1 min	18
Elongation	68	1 kb/min	
Aufbewahrung	4	∞	1

Anschließend wurde das Template mithilfe von *DpnI* verdaut. Der Ansatz des Restriktionsverdau ist im Folgenden dargestellt (siehe Tab. 14).

**Tab. 14: *DpnI*-Verdau der Site-Directed-Mutagenesis-PCR**

Substanz	Menge
PCR-Ansatz	50 µl
<i>DpnI</i>	6 µl
10x Puffer (gelb)	2 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	2 µl
	<b>1 h bei 37 °C</b>
	<b>Inaktivierung für 20 min bei 80 °C</b>

Es folgte eine Transformation von *E. coli* zur Amplifikation des mutierten Plasmids (siehe 3.3.9.2).

### Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR von *E. coli* wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein Klon gepickt, auf der Sicherungsplatte ausgestrichen und dann direkt in den PCR-Ansatz getaucht. Für die Kolonie-PCR von *H. volcanii* wurde ein Klon gepickt, auf der Sicherungsplatte ausgestrichen und dann in 20 – 50 µl H<sub>2</sub>O bidest. lysiert. Hiervon wurden 2 µl in die PCR eingesetzt.

Für die Kolonie-PCR wurden die laboreigene *Taq*-Polymerase (siehe Tab. 15 - Tab. 17) oder die *Taq*-Polymerase von Biozym verwendet (siehe Tab. 18 & Tab. 19).

**Tab. 15: Lösungen für die laboreigene *Taq*-PCR**

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
10x PCR-Puffer	3 M KCl	8,33 ml	500 mM
	1,5 M Tris/HCl pH 9,0	3,33 ml	100 mM
	Triton-X	500 µl	1 % (v/v)
		<b>ad 50 ml H<sub>2</sub>O bidest.</b>	
		<b>aliquotieren à 2 ml</b>	
		<b>bei -20 °C lagern</b>	

dNTP66-Lösung	100 mM dATP	100 µl	1 mM
	100 mM dTTP	100 µl	1 mM
	100 mM dGTP	150 µl	1,5 mM
	100 mM dCTP	150 µl	1,5 mM

**ad 10 ml H<sub>2</sub>O bidest.**  
**aliquotieren à 1 ml**  
**bei -20 °C lagern**

**Tab. 16: PCR-Ansatz für die laboreigene Taq-DNA-Polymerase**

Substanz	Menge	Endkonzentration
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,2	1,5 mM
1/1,5 mM dNTP66	3,2 µl	200/300 µM
10x PCR-Puffer	2 µl	1x
20 µM Oligonukleotid 1	0,5 µl	0,5 µM
20 µM Oligonukleotid 2	0,5 µl	0,5 µM
Taq-DNA-Polymerase	0,5 µl	-

**ad 20 µl H<sub>2</sub>O bidest.**

**Tab. 17: PCR-Programm für die laboreigene Taq-DNA-Polymerase**

Schritt	Temperatur [° C]	Zeit	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	96	5 min	1
Denaturierung	96	30 s	25
Annealing	variabel	30 s	
Elongation	72	1 kb/min	
Aufbewahrung	4	∞	1

**Tab. 18: PCR-Ansatz für die Biozym Taq-DNA-Polymerase**

Substanz	Menge	Endkonzentration
5x PCR-Puffer	2,5 µl	1x
1/1,5 mM dNTP66	6,25 µl	250/375 µM
20 µM Oligonukleotid 1	0,5 µl	0,4 µM
20 µM Oligonukleotid 2	0,5 µl	0,4 µM
Taq-DNA-Polymerase	0,125 µl	0,625 U

**ad 25 µl H<sub>2</sub>O bidest.**

**Tab. 19: PCR-Programm für die Biozym *Taq*-DNA-Polymerase**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	95	15 s	25
Annealing	variabel	15 s	
Elongation	72	4 kb/min	
Aufbewahrung	4	∞	1

### PCR zur Generierung eines qPCR-Standards

Für die Generierung eines qPCR-Standards wurde entweder die laboreigene *Taq*-DNA-Polymerase in einem 100 µl Ansatz (siehe Tab. 16) oder die Biozym *Taq*-DNA-Polymerase in einem 50 µl Ansatz verwendet (siehe Tab. 18).

### PCR zur Generierung einer Digoxygenin-markierten Sonde

Für die Generierung einer Digoxygenin-markierten Sonde zur Verwendung im Southern- oder Northern-Blot wurde ein 100 µl PCR-Ansatz der laboreigenen *Taq*-DNA-Polymerase (siehe Tab. 16) mit lowT-dNTP66 (siehe Tab. 20) anstatt den üblichen dNTP66 verwendet und auf zwei PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Einem Ansatz wurden 0,5 µl Dig-UTP hinzugefügt, der andere diente als Kontrolle, um gelelektrophoretisch den Einbau von Dig-UTP überprüfen zu können, da der Einbau zu einem langsameren Laufverhalten führt. Die Elongationszeit wurde auf 2 min bei einem 500 bp Fragment verlängert, da die *Taq*-DNA-Polymerase zum Einbau von Dig-UTP mehr Zeit benötigt.

**Tab. 20: Lösungen für die Generierung einer Digoxygenin-markierten Sonde**

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
lowT-dNTP66	100 mM dATP	100 µl	1 mM
	100 mM dTTP	20 µl	0,2 mM
	100 mM dGTP	150 µl	1,5 mM
	100 mM dCTP	150 µl	1,5 mM
<b>ad 10 ml H<sub>2</sub>O bidest.</b> <b>aliquotieren à 1 ml</b> <b>bei -20 °C lagern</b>			

### 3.3.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA wurden Agarosegele von einer Konzentration von 0,7 – 5 % verwendet, wobei für die 5 %-Gele eine spezielle,

hoch-auflösende Agarose benutzt wurde. Die Agarosegele wurden mit TBE-Puffer hergestellt und dieser wurde auch als Laufpuffer verwendet.

Es wurde 5 µl Größenstandard eingesetzt. Die Proben wurden mit so viel 6x Ladepuffer versetzt, dass eine Endkonzentration von 1x entstand. Von einer Kolonie-PCR wurden 10 µl, von Inserts oder Testverdauen 5 µl und auf Präp-Gele wurden 120 µl aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte bei kleinen Gelen bei 140 V für 32 min, bei großen Gelen bei 180 V für 50 min und bei Southern-Blot Gelen bei 120 V über mehrere Stunden.

Anschließend wurden die Gele im Ethidiumbromidbad (2 µg/ml) gefärbt und die DNA-Banden unter UV-Licht detektiert.

Im Folgenden sind die benötigten Lösungen dargestellt (siehe Tab. 21).

**Tab. 21: Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese**

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
10x Tris-Borat-ETDA (TBE)	Tris	107,82 g	0,89 M
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	55,03 g	0,89 M
	Na <sub>2</sub> EDTA	7,45 g	0,02 M
<b>ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O</b>			
<b>vor Verwendung 1:10 verdünnen</b>			
6x Ladepuffer	Tris	121 mg	10 mM
	Harnstoff	42 g	7 M
	EDTA	813 mg	28 mM
	87 % Glycerin	40 ml	34,8 % (v/v)
	Bromphenolblau	100 mg	0,1 % (w/v)
<b>ad 100 ml mit VE-H<sub>2</sub>O</b>			

### 3.3.6 Slot-Lyse von *E. coli*-Kolonien

Die Slot-Lyse wurde verwendet, um zu untersuchen, ob Kolonien transformierter *E. coli*-Klone Plasmide der richtigen Größe enthalten.

Hierzu wurden 10 µl Protoplastenpuffer in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurden Zellen von einer Sicherungsplatte abgenommen und im Protoplastenpuffer suspendiert. Anschließend wurde in 0,6 – 0,8 %-ige Agrosegele 4 µl Lyse-Puffer vorgelegt und dann mit den suspendierten Zellen im Protoplastenpuffer unterschichtet. Das Gel wurde für 15 – 20 min bei 20 V laufen gelassen und anschließend die Voltzahl auf das übliche Maß erhöht.

Im Folgenden sind die benötigten Lösungen dargestellt (siehe Tab. 22).

**Tab. 22: Lösungen für die Slot-Lyse**

<b>Name</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Protoplastenpuffer	40 % (w/v) Saccharose	5 ml	20 % (w/v)
	1 M Tris/HCl pH 8,0	300 µl	30 mM
	0,5 M EDTA pH 8,0	100 µl	5 mM
	1 M NaCl	500 µl	50 mM
	10 mg/ml RNase	50 µl	50 µg/ml
	10 mg/ml Lysozym	50 µl	50 µg/ml
		<b>ad 10 ml H<sub>2</sub>O bidest. bei 4 °C lagern</b>	
Lyse-Puffer	40 % (w/v) Saccharose	1,25 ml	5 % (w/v)
	1 M Tris/HCl pH 8,0	890 µl	89 mM
	0,5 M EDTA pH 8,0	50 µl	2,5 mM
	0,5 M H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,78 ml	89 mM
	10 % (w/v) SDS	2 ml	2 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,004 g	0,04 % (w/v)
	Xylencyanol FF	0,004 g	0,04 % (w/v)
			<b>ad 10 ml H<sub>2</sub>O bidest.</b>

### 3.3.7 Klonierung

#### 3.3.7.1 Spaltung von DNA mithilfe von Restriktionsenzymen

Für die Spaltung von DNA wurden sowohl die normalen als auch die FastDigest Enzyme von Thermo Fisher Scientific Inc. (Wilmington, USA) verwendet. Zumeist erfolgte die Spaltung der DNA nach Herstellerangaben. Lediglich die Spaltung von genomischer DNA zur Analyse im Southern-Blot wich ab und ist im Folgenden dargestellt (siehe Tab. 23).

**Tab. 23: Spaltung der DNA für den Southern-Blot**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
10x Puffer	4 µl
Restriktionsenzym	2 µl
Genomische DNA	3 µg
	<b>ad 40 µl H<sub>2</sub>O bidest.</b>
	<b>Inkubation &amp; Inaktivierung nach Herstellerangaben</b>

### 3.3.7.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden 50 ng Plasmid und ein 3-facher Überschuss des Inserts eingesetzt. Die benötigte Menge des Inserts wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Menge Insert (ng)} = \frac{\text{Menge Vektor (ng)} * \text{Insertlänge (bp)}}{\text{Vektorlänge (bp)}} * 3$$

Im Folgenden sind die Ligationsansätze für blunt-End- und sticky-End-Ligation dargestellt (siehe Tab. 24 & Tab. 25).

Zur blunt-End-Ligation wurde das Restriktionsenzym, das zum Vektorverdau verwendet wurde, hinzugegeben, um die Anzahl an falsch-positiven Klonen zu reduzieren.

**Tab. 24: blunt-End-Ligation**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Plasmid (50 ng)	variabel
3-facher Überschuss des Inserts	variabel
T4-DNA-Ligase	1 µl
10x Puffer des Restriktionsenzym	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl
20 mM ATP	1 µl
	<b>ad 20 µl H<sub>2</sub>O bidest.</b>
	<b>Gradienten-Ligation über Nacht</b>

Für die Gradienten-Ligation wurde das Reaktionsgefäß mit dem Ligationsansatz auf Eis gestellt und die Eisbox mit Alufolie abgedeckt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht, sodass das Eis langsam auftauen konnte und dadurch ein Temperatur-Gradient entstand.

**Tab. 25: sticky-End-Ligation**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Plasmid (50 ng)	variabel
3-facher Überschuss des Inserts	variabel
T4-DNA-Ligase	1 µl
10x T4-Ligase-Puffer	2 µl
	<b>ad 20 µl H<sub>2</sub>O bidest.</b>
	<b>10 min bei Raumtemperatur</b>

Die Ligase wurde bei 65 °C für 20 min inaktiviert und mit den Ansätzen dann *E. coli* transformiert (siehe 3.3.9.2).

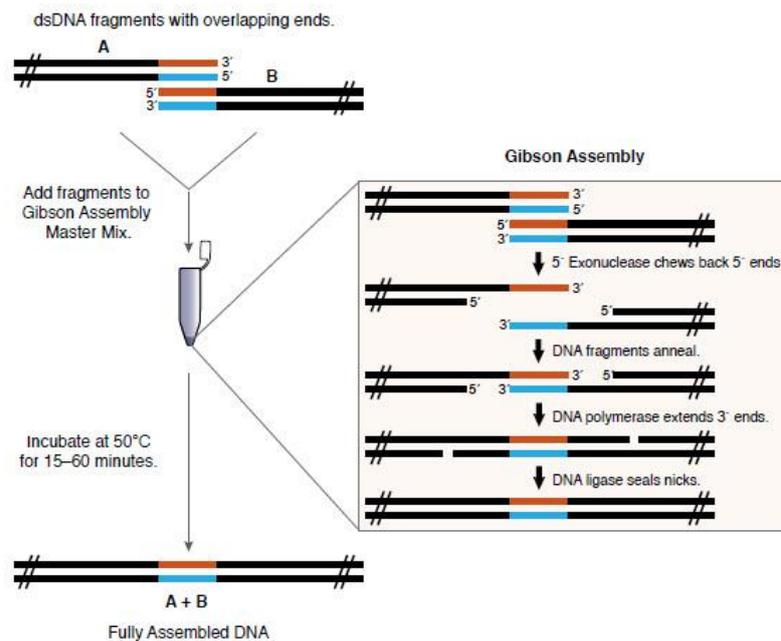
### 3.3.7.3 Gibson-Assembly

Zum Zusammenfügen des Plasmids mit einem oder mehreren Inserts wurde das Gibson-Assembly nach Gibson *et al.* (2009) verwendet.

Zuerst wurde eine Phusion-PCR durchgeführt. Hierbei wurde der Vektor sowie das Insert oder die Inserts amplifiziert. Es wurden Oligonukleotide verwendet, die bei den Fragmenten, die zusammen gefügt werden sollten, 25 nt lange komplementäre Enden erzeugten.

In das Gibson-Assembly wurden 50 ng des Plasmid-PCR-Produkts und ein 3-facher Überschuss des Insert-PCR-Produkts oder -Produkte eingesetzt. Die benötigte DNA wurde hierfür in 10 µl H<sub>2</sub>O bidest. gemischt und dann zu den 10 µl aufgetautem 2x Master Mix gegeben. Es erfolgt eine Inkubation bei 50 °C für 1 h. Anschließend wurde mit dem kompletten Ansatz *E. coli* transformiert (siehe 3.3.9.2).

Im Folgenden ist die Gibson-Assembly-Reaktion schematisch dargestellt (siehe Abb. 7). In Tab. 26 sind die benötigten Lösungen zusammengefasst.



**Abb. 7: Schematische Darstellung des Gibson-Assemblys (aus Gibson et al. (2009))**

Zuerst verdaut die T5-Exonuklease die 5'-Enden und erzeugt dadurch komplementäre Überhänge. Nachdem sich die einzelnen Fragmente aneinander angelagert haben, füllt die Phusion-Polymerase die abgedauten Basen wieder auf und die *Taq*-DNA-Ligase ligiert die Fragmente fest miteinander. Mit dem so erzeugten Plasmid wird *E. coli* transformiert.

**Tab. 26: Lösungen für das Gibson-Assembly**

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
5x Isothermaler	PEG-8000	1,5 g	25 % (w/v)
Reaktionspuffer	1 M Tris/HCl pH 7,5	3 ml	500 mM
	2 M MgCl <sub>2</sub>	150 µl	50 mM
	1 M DTT	300 µl	50 mM
	100 mM dATP	60 µl	1 mM
	100 mM dTTP	60 µl	1 mM
	100 mM dCTP	90 µl	1,5 mM
	100 mM dGTP	90 µl	1,5 mM
	100 mM NAD <sup>+</sup>	300 µl	5 mM
		<b>ad 6 ml H<sub>2</sub>O bidest.</b>	
		<b>aliquotieren à 500 ml</b>	
		<b>bei -20 °C lagern</b>	
2x Master Mix	5x Isothermaler Reaktionspuffer	64 µl	2x
	10 U/µl T5-Exonuklease	0,13 µl	0,008 U
	40 U/µl Taq-DNA-Ligase	32 µl	8 U
	2 U/µl Phusion-Polymerase	4 µl	0,05 U
		<b>ad 160 µl H<sub>2</sub>O bidest.</b>	
		<b>aliquotieren à 10 µl</b>	
		<b>bei -20 °C lagern</b>	

### 3.3.7.4 Gap Repair Cloning mit *S. cerevisiae*

In den Fällen, in denen das Gibson-Assembly nicht erfolgreich war, wurde ein Gap Repair Cloning mit *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. *S. cerevisiae* ist in der Lage, aus linearen Fragmenten mithilfe von homologer Rekombination Plasmide zu generieren. Hierzu müssen lediglich die Enden der Fragmente mindestens über 25 Nukleotide komplementär zueinander sein.

### Herstellung kompetenter Zellen von *S. cerevisiae*

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach Gietz und Schiestl (2007). Hierfür wurde zunächst ein Reinigungsausstrich einer Dauerkultur auf YEPD-Platten angefertigt und für 48 h bei 30 °C inkubiert. Mit einer Kolonie wurden 5 ml YEPD-Medium angeimpft und für 24 h bei 30 °C inkubiert. Mit dieser Kultur wurden 50 ml YEPD-Medium mit einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft und unter Schütteln bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 2 min bei 3.000 rpm geerntet, der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 25 ml sterilem H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen. Anschließend erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 2 min bei 3.000 rpm. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Zellsediment wurde in 500 µl H<sub>2</sub>O bidest. resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurde bei 13.000 rpm für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 500 µl FCC-Lösung resuspendiert. Das Zellsuspensat wurde in 50 µl Aliquots unterteilt und bei -80 °C eingefroren.

Die benötigten Lösungen sind im Folgenden dargestellt (siehe Tab. 27).

**Tab. 27: Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen von *S.cerevisiae***

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
FCC-Lösung (frozen competent cell)	DMSO	1 ml	10 % (v/v)
	H <sub>2</sub> O bidest.	8 ml	
	50 % Glycerin (steril)	1 ml	5 % (v/v)

### Herstellung von single-stranded carrier DNA (ssDNA)

Bei der ssDNA handelt es sich um die Träger-DNA, damit die transformierende DNA besser von den Zellen aufgenommen werden kann.

Hierfür wurden 0,2 g Lachssperma-DNA in 100 ml sterilen TE-Puffer gegeben und auf einem Magnetrührer für 2 – 3 h gerührt, bis die DNA gelöst war. Anschließend wurde die ssDNA aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Vor der Verwendung wurde die ssDNA für 5 min auf 95 °C erhitzt und konnte dann 3 – 4 Mal verwendet werden, ehe sie wieder denaturiert werden musste.

### **Transformation von *S. cerevisiae***

Für die Transformation von *S. cerevisiae* wurden 200 ng Plasmid mit einem 10-fachen Überschuss des oder der Inserts in 54 µl H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Anschließend wurde der Transformationsmix vorbereitet. Hierfür wurden 260 µl PEG 3350 (50 % (w/v)), 36 µl 1 M Lithiumacetat und 10 µl ssDNA (2 mg/ml) gemischt (FFC-Transformationsmix) und auf Eis gehalten. Die kompetenten Zellen wurden aufgetaut und bei 13.000 rpm für 30 s abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die 306 µl des FFC-Transformationsmix' sowie die 54 µl der transformierenden DNA wurden zum Zellsediment gegeben. Das Zellsediment wurde durch vortexen resuspendiert und für 35 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 13.000 rpm für 30 s abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 100 – 200 µl sterilem H<sub>2</sub>O bidest. resuspendiert und auf SCD-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30 °C für 48 h inkubiert.

### **Plasmid isolation aus *S. cerevisiae***

Für die Plasmid isolation aus *S. cerevisiae* wurden 500 µl steriles H<sub>2</sub>O bidest. in 2 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt. Die Hälfte der Kolonien einer 2 – 4 Tage inkubierten Platte wurde mit einer Impföse abgenommen und im vorgelegten Wasser suspendiert. Der Ansatz wurde bei 13.000 rpm für 30 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in 250 µl Puffer A1 des NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kits von MACHERY NAGEL resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß mit einer Mischung aus 0,1 - 0,11 mm und 0,25 – 0,5 mm Glasperlen (Verhältnis 1:1) gegeben. Die Zellen wurden mithilfe des FastPrep<sup>®</sup>-24-Geräts aufgeschlossen. Hierfür wurden die Ansätze drei Mal für 20 s bei 4,5 m/s geschüttelt. Zwischen den einzelnen Aufschlusszyklen wurde je 1 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Ansätze für 30 s bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Mit dem Überstand wurde weiter verfahren, wie in den Herstellerangaben des NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid Kits von MACHERY NAGEL beschrieben. Die Elution erfolgte

in 30 µl sterilem H<sub>2</sub>O bidest.. Das gesamte Volumen wurde für die Hitzeschocktransformation von *E. coli* verwendet, um das durch Gap Repair Cloning generierte Plasmid zu vermehren.

### 3.3.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurde von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Die Vorbereitung der Proben erfolgte nach Firmenangaben.

### 3.3.9 Transformation von Mikroorganismen

#### 3.3.9.1 Herstellung kompetenter *E. coli* für die Hitzeschock-Transformation

Um kompetente *E. coli* für die Hitzeschock-Transformation herzustellen, wurden 250 ml SOB<sup>+</sup>-Medium mit einer über-Nacht-Kultur angeimpft, sodass die Start-OD<sub>600</sub> 0,05 betrug. Die Zellen wurden bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer Optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,6 wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur für 10 min auf Eis gekühlt und dann für 10 min bei 2.500 x g und 4 °C geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in 80 ml eiskalten TB-Puffer gelöst, für 10 min auf Eis inkubiert und dann erneut bei 2.500 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Zellsediment in 20 ml TB-Puffer resuspendiert. Es wurden 1,4 ml DMSO (Endkonzentration: 7 % (v/v)) hinzugegeben und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach einer Inkubation auf Eis für 10 min, wurden 200 µl Aliquots angefertigt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

**Tab. 28: Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli***

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
TB-Puffer	MOPS	0,21 g	10 mM
	CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	0,22 g	15 mM
	KCl	1,86 g	250 mM
		<b>ad 90 ml H<sub>2</sub>O bidest.</b> <b>pH 6,8 mit KOH</b>	
	MnCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,89 g	55 mM
		<b>ad 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.</b> <b>sterilfiltrieren</b> <b>bei 4 °C lagern</b>	

### 3.3.9.2 Transformation von *E. coli*

Für die Hitzeschock-Transformation von *E. coli* wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden 25 ng Plasmid-DNA, 20 µl Ligationsansatz oder 20 µl Gibson-Assembly-Ansatz hinzupipettiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 45 s und eine darauffolgende Inkubation auf Eis für 30 s. Danach wurde der Transformationsansatz auf Selektivmedium ausgestrichen.

### 3.3.9.3 Transformation von *H. volcanii*

Zur Transformation von *H. volcanii* wurden 2 ml einer exponentiellen Kultur bei 8.000 rpm für 2 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 180 µl SBL/EDTA-Lösung hinzugegeben. Das Zellsediment wurde vorsichtig mit der Pipette resuspendiert und 20 µl der DNA-Lösung (2 – 5 µg Plasmid in 0,8 M NaCl = 16 µl Plasmid + 4 µl 4 M NaCl) hinzugefügt. Die Suspension wurde durch 20x Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 230 µl PEG-Lösung in die Deckel der Reaktionsgefäße gegeben und durch rasches Schwenken mit der Zellsuspension vermischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur, die durch Zugabe von 1.500 µl SVL-Lösung beendet wurde. 100 µl der Zellsuspension wurden auf Selektivmedium ausgestrichen und bei 42 °C für 4 – 5 Tage inkubiert. Der übrige Transformationsansatz wurde in 30 ml Selektivmedium gegeben, bei 42 °C unter Schütteln für 2 Tage inkubiert und solange aufbewahrt, bis auf der beimpften Platte Kolonien sichtbar waren.

Die verwendeten Lösungen sind im Folgenden dargestellt (siehe Tab. 29).

**Tab. 29: Lösungen für die Transformation von *H. volcanii***

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Sphäroblastenbildungslösung (SBL)	NaCl	23,37 g	0,8 M
	KCl	1 g	27 mM
	1 M Tris/HCl pH 8,2	25 ml	25 mM
	Saccharose	75 g	15 % (w/v)
<b>ad 500 ml mit VE-H<sub>2</sub>O sterilfiltrieren</b>			

SBL/EDTA-Lösung	EDTA	1,89 g	50 mM
		<b>ad 100 ml mit SBL pH 8,2 sterilfiltrieren</b>	
PEG-Lösung	PEG-600	6 ml	60 % (v/v)
	SBL	4 ml	
Sphäroblastenverdünnungslösung (SVL)	NaCl	100 g	3,4 M
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	21,6 g	175 mM
	KCl	1,25 g	34 mM
	1 M Tris/HCl pH 7,2	25 ml	50 mM
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,36 g	5 mM
	Saccharose	75 g	15 % (w/v)
		<b>ad 500 ml mit VE-H<sub>2</sub>O sterilfiltrieren</b>	

### 3.3.10 Southern-Blot-Analyse

Die Southern-Blot-Analyse wurde verwendet, um zu überprüfen, ob es sich bei den vorliegenden Pop-Out-Mutanten um Deletionsmutanten, heterozygote Zellen oder den Wildtyp handelt.

Hierfür wurde aus exponentiellen Kulturen genomische DNA isoliert. 3 µg der genomischen DNA des Wildtyps, der Pop-In Mutante und von drei Pop-Out-Mutanten wurde über Nacht mit einem Restriktionsenzym gespalten (siehe 3.3.7.1). Nach der Inaktivierung des Enzyms, wurden die Restriktionsansätze sowie 10 µl Marker auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und für mehrere Stunden bei 120 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel im Ethidiumbromidbad (2 µg/ml) gefärbt, die Banden unter UV-Licht detektiert und fotografiert.

Danach wurde die DNA durch Schwenken des Gels in der Lösung Southern-Blot I für 10 min partiell depurinieren, für 20 min in der Lösung Southern-Blot II denaturiert und der pH schließlich für 30 min in der Lösung Southern-Blot III neutralisiert. Nach einer Equilibrierung für 10 min in 20x SSC, konnte der Southern-Blot aufgebaut werden.

Hierfür wurden 15 Blatt eines 1,4 mm dicken Blottingpapiers als Basis verwendet. Darauf wurden 3 Blatt 0,37 mm dickes Blottingpapier gestapelt, die zuvor in 20x SSC-Puffer äquilibriert wurden. Darauf folgte die positiv-geladene Nylonmembran, die für 10 min in H<sub>2</sub>O bidest. vorgequollen und dann in 20x SSC-Puffer äquilibriert wurde. Auf die Membran wurde das Agarosegel gelegt. Hierauf wurden 3 Blatt

0,37 mm dickes Blottingpapier gelegt, die ebenfalls zuvor in 20x SSC-Puffer äquilibriert wurden. Die Luftblasen wurden herausgewalzt und anschließend folgte die Pufferbrücke, die den Stapel mit den beiden 20x SSC-Puffer-Reservoirs verband. Auf die Pufferbrücke wurde ein Gelschlitten gelegt und dieser mit einer gefüllten 250 ml Schottflasche beschwert. Es wurde über Nacht geblottet. Die verwendeten Lösungen sind in Tab. 30 dargestellt.

Am nächsten Tag wurde der Blot bis zum Agarosgel abgebaut und die Taschen mit einem Bleistift angezeichnet. Anschließend wurde die Membran im Stratalinker bei 120 mJ UV-quervernetzt.

**Tab. 30: Lösungen für den Southern-Blot**

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Southern-Blot I	25 % HCl	32,5 ml	0,25 M
		<b>900 ml VE-H<sub>2</sub>O vorlegen HCl hinzugeben ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O</b>	
Southern-Blot II	NaCl	87,6 g	1,5 M
	NaOH	20 g	0,5 M
		<b>ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O</b>	
Southern-Blot III	NaCl	87,6 g	1,5 M
	Tris	60,57	0,5 M
		<b>ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O pH 8 mit HCl</b>	
20x SSC-Puffer	NaCl	175,3 g	3 M
	<i>tri</i> -Natriumcitrat · 2 H <sub>2</sub> O	88,2 g	300 mM
		<b>ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O pH 7 autoklavieren</b>	

### Hybridisierung der Membran mit einer Sonde

Die Membran wurde in ein Hybridisierungsröhrchen überführt und für 1 h mit 10 ml Hybridisierungspuffer bei 50 °C unter langsamem Drehen vorhybridisiert. Währenddessen wurde die Sonde für 5 min bei 95 °C denaturiert. Wurde eine Sonde wiederverwendet, dann erfolgte die Denaturierung bei 95 °C für 10 min.

Der Hybridisierungspuffer wurde verworfen und frische 10 ml Hybridisierungspuffer hinzugegeben sowie 30 – 50 µl der Dig-UTP markieren Sonde.

Falls eine Sonde wiederverwendet wurde, war diese schon in Hybridisierungspuffer gelöst und es wurde kein extra Hybridisierungspuffer hinzugegeben.

Die Hybridisierung erfolgte bei 50 °C und langsamen Drehen über Nacht.

Die verwendeten Lösungen sind in der folgenden Tabelle dargestellt (siehe Tab. 31).

**Tab. 31: Lösungen für die Hybridisierung der Sonde**

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
100x Denhardt-Lösung	Rinderserumalbumin	10 g	2 % (w/v)
	Ficoll 400	10 g	2 % (w/v)
	Polyvinylpyrrolidon	10 g	2 % (w/v)
<b>ad 500 ml VE-H<sub>2</sub>O</b>			
<b>filtrieren durch Faltenfilter</b>			
<b>bei -20 °C lagern</b>			
Hybridisierungspuffer	20x SSC-Puffer	250 ml	5x
	100x Denhardt-Lösung	30 ml	3x
	SDS	5 g	0,5 % (w/v)
	30 % (w/v) <i>N</i> -Laroylsarcosin	6,7 ml	0,2 % (w/v)
	Dextransulfat	50 g	5 % (w/v)
<b>ad 500 ml VE-H<sub>2</sub>O</b>			
<b>autoklavieren</b>			
<b>Zugabe von</b>			
	Formamid	500 ml	50 % (v/v)

### Chemolumineszenznachweis

Nach dem Entfernen der Sonde, wurde die Membran 2x für 5 min in 50 ml 2x SSC-Puffer + 0,5 % (w/v) SDS gewaschen. Hierbei ist zu beachten, dass Waschschrirte immer unter schnellem Drehen, Inkubationsschritte immer unter langsamem Drehen erfolgten. Anschließend erfolgten zwei Waschschrirte für 15 min bei 50 °C in 50 ml 1x SSC-Puffer + 0,5 % (w/v) SDS. Die Membran wurde kurz in Waschpuffer geschwenkt, ehe sie für 30 min und bei Raumtemperatur in 20 ml Blocking-Lösung inkubiert wurde. Danach erfolgte ein Inkubationsschritt in 20 ml Blocking-Lösung mit 1 µl Anti-Dig-UTP-Antikörper für 30 min. Die Membran wurde 2x in 100 ml Waschpuffer gewaschen und dann für 5 min in 20 ml Detektionspuffer äquilibriert. Als letzter Schritt wurde für 5 min mit der CDP-Star-Working-Solution inkubiert (15 ml Detektionspuffer + 10 µl CDP-Star). Die noch feuchte Membran wurde für die Detektion zwischen zwei Folien in eine Röntgenkassette gelegt. Es

wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen der Membran und der oberen Folie befanden.

Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte in der Dunkelkammer unter Rotlicht. Zur Detektion der Lumineszenz wurde zu Beginn ein Röntgenfilm für 1 min aufgelegt und in der Entwicklerlösung solange geschwenkt, bis Banden sichtbar waren. Anschließend wurde der Film kurz in Wasser gewaschen und dann für 30 s im Fixierer fixiert. Anschließend wurde noch ein Film für 15 min aufgelegt, um auszuschließen, dass Wildtypbanden übersehen worden waren. Sollten nach einer Minute noch keine Banden erkennbar gewesen sein, wurde für 5 min aufgelegt und die Kontrolle auf Wildtypbanden erfolgte mit einem Film, der für 30 min aufgelegt wurde.

Die Filme wurden an der Luft getrocknet und dann anhand des Fotos des Ethidiumbromid gefärbten Gels die Markerbanden eingezeichnet.

Die verwendeten Lösungen sind in der folgenden Tabelle dargestellt (siehe Tab. 32).

**Tab. 32: Lösungen für den Chemolumineszenznachweis**

<b>Name</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Maleinsäurepuffer	Maleinsäure	11,6 g	100 mM
	NaCl	8,77 g	150 mM
		<b>ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O</b>	
		<b>pH 7,5 mit NaOH</b>	
		<b>autoklavieren</b>	
Blockingpuffer	Blocking-Reagenz	10 g	1 % (w/v)
		<b>ad 1 l mit Maleinsäurepuffer</b>	
		<b>autoklavieren</b>	
		<b>lagern bei 4 °C</b>	
Waschpuffer	Tween 20	600 µl	0,3 % (v/v)
		<b>ad 200 ml mit Maleinsäurepuffer</b>	
Detektionspuffer	Tris	12,11 g	100 mM
	NaCl	5,84 g	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	4,77 g	50 mM
		<b>ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O</b>	
		<b>pH 9,5</b>	

### 3.3.11 Protoplastenfusion

Bei der Protoplastenfusion wurden Zellen eines Tryptophan-auxotrophen Stammes mit denen eines Thymin-auxotrophen Stammes verschmolzen, sodass die neuentstandene Zelle sowohl Genomkopien des einen als auch des anderen Elternstammes enthielt und nicht mehr auxotroph war. Die Protoplastenfusion in *H. volcanii* wurde erstmals von Tchelet und Mevarech (1993) beschrieben und für diese Arbeit hier angepasst, um Genkonversion genauer zu untersuchen.

Für die Protoplastenfusion wurden Kulturen, die sich 72 h nach dem Animpfen in der stationären Wachstumsphase befanden, überimpft, sodass sie sich nach 24 h in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Die Optische Dichte  $OD_{600}$  wurde bestimmt und der Tryptophan-auxotrophe Stamm auf eine rechnerische Start- $OD_{600}$  von 0,00625, der Thymin-auxotrophe Stamm auf eine rechnerische Start- $OD_{600}$  von 0,0125 in Komplexmedium angeimpft. Beide Kulturen wurden für 19 h wachsen gelassen, wonach sie eine Optische Dichte von  $OD_{600}$  1,0 – 1,3 erreicht hatten. Es wurden je 2 ml Kultur abgenommen und die Zellen für 2 min bei 8.000 rpm geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500  $\mu$ l sterilem 1 M NaCl resuspendiert. Die Zellen wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, wonach sie als Protoplasten vorlagen. Die Elternstämme wurden gemischt und es wurde für 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment wurde in 168  $\mu$ l SMT-Lösung resuspendiert. Es wurden 132  $\mu$ l PEG-600 in den Deckel pipettiert und durch rasches Schwenken mit dem Zellsuspensat vermischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 6.500 rpm. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment wurde in 100  $\mu$ l Basalsalz + 15 % (w/v) Saccharose resuspendiert und auf Synthetischem Medium mit Glukose und Uracil ausgestrichen. Die Platten wurden für 5 – 7 Tage bei 42 °C inkubiert.

Die Rezepte für die verwendeten Lösungen sind in der folgenden Tabelle gelistet (siehe Tab. 33).

**Tab. 33: Lösungen für die Protoplastenfusion**

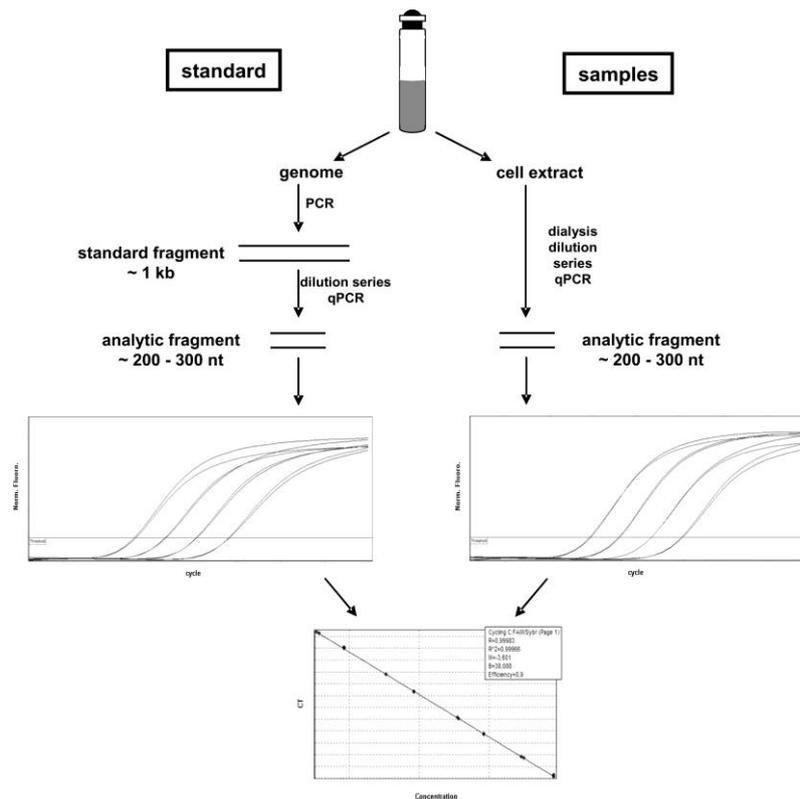
Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
SMT-Lösung	NaCl	20,5	3,5 M
	MgCl <sub>2</sub>	3 g	150 mM
	1 M Tris/HCl pH 7,2	5 ml	50 mM
<b>ad 100 ml mit H<sub>2</sub>O bidest. autoklavieren</b>			

### 3.3.12 Quantitative Bestimmung der Genomkopienzahl mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR)

#### Prinzip

Die Bestimmung der Genomkopienzahl mittels qPCR in *H. volcanii* wurde erstmal von Breuert *et al.* (2006) beschrieben. Hierfür wird ein 1 kb großes Standardfragment benötigt, das nur ein einziges Mal im Genom vorkommt. Die Konzentration des Standardfragments muss bekannt sein, damit anhand der in der qPCR ermittelten C<sub>T</sub>-Werte eine Eichgerade aus den verschiedenen Standard-Verdünnungen und den darin enthaltenen Standardmolekülen generiert werden. Mit dieser Eichgerade kann aus den C<sub>T</sub>-Werten der Proben die Menge an Genomen abgeleitet werden und durch Division durch die eingesetzte Zellzahl wird so die Genomkopienzahl pro Zelle bestimmt. Hierbei handelt es sich um einen Durchschnittswert der untersuchten Population.

Das Vorgehen ist in Abb. 8 dargestellt.



**Abb. 8: Bestimmung der Genomkopienzahl mittel qPCR (aus Hildenbrand et al. (2011))**

Mittels PCR auf genomische DNA wird ein 1 kb großes Standardfragment generiert, dessen Konzentration bekannt ist, und verdünnt. Gleichzeitig werden Proben, mit einer bekannten Zellzahl, lysiert und ebenfalls verdünnt. Die Standard-Verdünnungen und die Proben-Verdünnungen werden in die qPCR eingesetzt, wo ein 200 – 300 nt langes Analysefragment generiert wird. Anhand der  $C_T$ -Werte der Standard-Verdünnungen und der errechneten Molekülmenge in diesen Verdünnungen kann eine Eichgerade generiert werden, anhand der abgelesen werden kann, wie viele Genomkopien sich in den Proben befinden. Da die eingesetzte Zellzahl in den Proben bekannt ist, kann so die Genomkopienzahl pro Zelle bestimmt werden.

### Herstellung des qPCR-Standards

Für die Herstellung des qPCR-Standards wurde das PCR-Produkt (siehe 3.3.4) entweder mit dem GenUP™ PCR Cleanup Kit direkt, oder, wenn weitere Banden sichtbar waren, über Gelextraktion mit dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit aufgereinigt. In beiden Fällen wurde mit  $H_2O$  bidest. eluiert und die DNA mit einer KAc/Ethanol-Fällung (siehe 3.3.1) über Nacht bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gefällt.

Anschließend wurde die DNA-Konzentration bestimmt, die Konzentration des Standards auf  $100 - 200\text{ ng}/\mu\text{l}$  eingestellt und eine Verdünnungsreihe bis  $10^{-8}$  in  $H_2O$  bidest. angefertigt. Die Verdünnungen  $10^{-3} - 10^{-8}$  wurden in die qPCR eingesetzt.

Für die Auswertung wurde die Anzahl der Moleküle pro ng Standard benötigt. Hierfür wurde das Molekulargewicht des Standards mithilfe von Oligocalc berechnet. Anschließend wurde die Avogadro-Konstante  $N_A$  durch das errechnete Molekulargewicht des Standards geteilt, wie die folgende Gleichung darstellt:

$$\frac{6,022 \times 10^{23} \text{ Moleküle/mol}}{\text{Molekulargewicht Standard } \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]} \times 10^{-9} = \frac{\text{Moleküle}}{\text{ng}}$$

### Vorbereitung der Proben von *H. volcanii*

Für die Gewinnung der Proben für die qPCR wurden Kulturen, die sich 72 h nach der Inokulation in der stationären Wachstumsphase befanden, überimpft, sodass sie nach 24 h in der exponentiellen Phase waren. Die Kulturen wurden erneut überimpft, sodass sie zum gewünschten Zeitpunkt die gewünschte Zelldichte hatten. Exponentielle Kulturen wurden bei  $1 - 3 \times 10^8$  Zellen/ml, stationäre Kulturen bei  $1 - 3 \times 10^9$  Zellen/ml geerntet und es wurden  $1 - 3 \times 10^8$  Zellen für die qPCR-Analyse abgenommen. Es wurde pro Stamm drei unterschiedliche Kulturen beprobt. Die Zellen wurden bei 13.000 rpm für 5 min geerntet und entweder für eine spätere Analyse eingefroren oder sofort in 100 µl Basalsalz resuspendiert und mit 900 µl H<sub>2</sub>O bidest. lysiert. Anschließend wurden 40 µl des Ansatzes auf ein Dialyseplättchen gegeben und für 3 h gegen H<sub>2</sub>O bidest. dialysiert. Im Anschluss wurde das Dialysat vom Plättchen genommen, das Volumen mit der Pipette bestimmt und verdunstetes Wasser mit H<sub>2</sub>O bidest. aufgefüllt, sodass das Volumen wieder 40 µl betrug. Dann wurden folgende Verdünnungen des Dialysats in H<sub>2</sub>O bidest. angefertigt: 1:5, 1:10, 1:20 und 1:100.

Für die Auswertung wurde berechnet, wie viele Zellen sich in jeder Verdünnung befanden.

### qPCR-Analyse

Das Ansetzen der qPCR wurde komplett im Kühlblock durchgeführt. Ein qPCR-Ansatz setzt sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen (siehe Tab. 34).

**Tab. 34: qPCR-Ansatz**

Substanz	Menge	Endkonzentration
Probe/Standard	5 µl	-
20 µM Oligonukleotid 1	1 µl	0,8 µM
20 µM Oligonukleotid 2	1 µl	0,8 µM
SYBR Green qPCR Master Mix	12,5 µl	50 % (v/v)
	<b>ad 25 µl H<sub>2</sub>O bidest.</b>	

Für die Negativkontrolle (No Template Control – NTC) wurden 5 µl H<sub>2</sub>O bidest. als „Template“ eingesetzt.

Jeder Standardansatz und jede Probe wurde in Doppelbestimmung untersucht, sodass insgesamt 3 biologische und 24 technische Replikate herangezogen wurden, um die Genomkopienzahl eines Stammes zu bestimmen.

Die qPCR lief unter den folgenden Bedingungen ab (siehe Tab. 35).

**Tab. 35: qPCR-Programm**

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	96	10 min	1
Denaturierung	96	30 s	
Annealing	64	30 s	50
Elongation	72	30 s	
Finale Elongation	72	5 min	1

Anschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse von 62 – 96 °C in 1 °C-Schritten.

### 3.3.13 Isolierung der Gesamt-RNA

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurden 2 ml einer Kultur in der zu untersuchenden Wachstumsphase geerntet, indem sie für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl Aufschlusslösung resuspendiert. Unter dem Abzug wurden 50 µl 2 M Natriumacetat pH 4 (in H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>), 400 µl TE-gesättigtes Phenol und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und nach jeder Zugabe gevortext. Es folgte ein Inkubationsschritt für 30 min bei -20 °C und eine anschließende Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm. 400 µl des wässrigen Überstands wurden vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäßg überführt. Es wurde 1 ml eiskalter 96 %-iger Ethanol dazugegeben, gemischt und für 30 min bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde für 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die RNA wurde mit 500 µl eiskaltem 70 %-igem Ethanol (in H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>) gewaschen und für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das RNA-Pellet unter dem Abzug getrocknet und dann in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> gelöst.

Die verwendeten Lösungen sind in der folgenden Tabelle dargestellt (siehe Tab. 36).

**Tab. 36: Lösungen für die Isolierung der Gesamt-RNA**

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Aufschlusslösung	750 mM Natriumcitrat-Lösung pH 7	7 ml	35 mM
	30 % (w/v) <i>N</i> -Lauroylsarcosin	3,5 ml	0,7 % (w/v)
	$\beta$ -Mercaptoethanol	1 ml	0,7 % (w/v)
	Guanidiniumthiocyanat	100 g	67 % (w/v)
	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	127 ml	

### 3.3.14 Northern-Blot Analyse

Zur Auftrennung der Gesamt-RNA für die Northern-Blot-Analyse wurde zunächst ein RNA-Gel gegossen. Hierfür wurden 0,7 g Agarose eingewogen, mit 60 ml H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> gemischt und unter Kochen gelöst. Danach wurden unter Rühren 7 ml 10x MOPS und nach dem Abkühlen auf unter 70 °C unter dem Abzug 2,5 ml 37 % Formaldehyd hinzugegeben. Zum Aushärten wurde die Lösung in einen Gelschlitten gegeben.

Während dem Aushärten des Gels wurden 5  $\mu$ g Gesamt-RNA sowie 1  $\mu$ l des Markers mit dem vierfachen Volumen an RNA-Probenpuffer versetzt, für 10 min auf 60 °C erhitzt und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert.

Nach dem Aushärten wurde das Gel beladen und die RNA bei 120 V für 2 h aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS verwendet.

Die verwendeten Lösungen sind in der folgenden Tabelle dargestellt (siehe Tab. 37).

**Tab. 37: Lösungen für RNA-Gele**

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
10x MOPS	MOPS	104,7 g	500 mM
	EDTA	3,7 g	10 mM
<b>ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub></b>			
<b>pH 7</b>			
<b>autoklavieren</b>			
<b>1:10 verdünnen für Laufpuffer</b>			
RNA-Probenpuffer	10x MOPS	1 ml	1x
	100 % Formamid	5 ml	50 % (v/v)
	37 % Formaldehyd	1,84 ml	6,8 % (v/v)
	87 % Glycerin	1,34 ml	11,7 % (v/v)
	Bromphenolblau	10 mg	0,1 % (w/v)
	Ethidiumbromid (0,1 mg/ml)	50 $\mu$ l	50 $\mu$ g/ml
	H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	770 $\mu$ l	

Der Northern-Blot verlief analog zum Southern-Blot (siehe 3.3.10), lediglich bei der Vorhybridisierung wurde Hefe-tRNA in einer Endkonzentration von 120 µg/ml dazugegeben.

### **3.3.15 Überexpression von Proteinen**

#### **3.3.15.1 Induktion mit Tryptophan**

Bei Verwendung des Vektors pTA929 wurden die Kulturen bis zur exponentiellen Phase gezogen und dann mit 7,5 ml 25 mM Tryptophan (in Basalsalz) zu einer Endkonzentration von 5 mM induziert. Für die Expression der ori1- und ori2-nahen Gene, wurde für 3, 5 oder 7 h inkubiert. Alternativ erfolgte die Induktion schon zu Beginn des Wachstums. Bei Mikrotiterplatten wurde durch Zugabe von 37,5 µl 25 mM Tryptophan (in Basalsalz) ebenfalls zu einer Endkonzentration von 5 mM induziert.

#### **3.3.15.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

Eine Kultur, die sich 72 h nach der Inokulation in der stationären Wachstumsphase befand, wurde überimpft, sodass sie am nächsten Tag in der exponentiellen Wachstumsphase war. Diese Kultur wurde erneut überimpft und auf eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,025 in Synthetischem Medium mit Glukose ohne Uracil eingestellt. Sie wurde solange inkubiert, bis sie eine Zellzahl von  $8 \times 10^8$  Zellen/ml erreicht hatte. Es wurden  $4 \times 10^8$  Zellen als uninduzierte Kontrolle entnommen (13.000 rpm, 5 min), dann wurde mit Tryptophan induziert, und nochmals  $4 \times 10^8$  Zellen geerntet.

Die Pellets wurden mit 30 µl 1x SDS-Probenpuffer lysiert und dann für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurde für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu sedimentieren.

Für die Auftrennung in der SDS-PAGE wurden Polyacrylamidgele der Konzentrationen 7,5 %, 12 % und 15 % verwendet, je nach Proteingröße (siehe Tab. 39). 30 µl der Proben und 5 µl Größenstandard wurden aufgetragen und zunächst bei 100 V aufgetrennt, bis das Trenngel erreicht wurde, dann wurde auf 150 V erhöht und solange laufen gelassen, bis die Bromphenolblaubande anfang, aus dem Gel zu laufen. Als Laufpuffer wurde 1x SDS-Laufpuffer verwendet.

Die verwendeten Lösungen sind im Folgenden dargestellt (siehe Tab. 38).

**Tab. 38: Lösungen für die SDS-PAGE**

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Trenngelpuffer	Tris	181,65 g	1,5 M
	SDS	3,84 g	0,384 % (w/v)
		<b>ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O</b>	
		<b>pH 8,8 mit HCl</b>	
Sammelgelpuffer	Tris	60,55 g	0,5 M
	SDS	4 g	0,4 % (w/v)
		<b>ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O</b>	
		<b>pH 6,8 mit HCl</b>	
APS	Ammonionperoxodisulfat	100 mg	10 % (w/v)
		<b>ad 1 ml mit H<sub>2</sub>O bidest.</b>	
		<b>bei -20 °C lagern</b>	
1x SDS-Probenpuffer	1,25 M Tris/HCl pH 6,8	0,5 ml	125 mM
	SDS	0,25 g	5 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	0,5 ml	10 % (v/v)
	87 % Glycerin	1,16 ml	20 % (v/v)
	Bromphenolblau	5 mg	0,1 % (w/v)
		<b>ad 5 ml mit H<sub>2</sub>O bidest.</b>	
10x SDS-Laufpuffer	Tris	30 g	248 mM
	Glycin	144 g	1,9 M
	SDS	10 g	1 % (w/v)
		<b>ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O</b>	
		<b>vor Verwendung 1:10 verdünnen</b>	

**Tab. 39: Zusammensetzung des Trenn- und der Sammelgele für Polyacrylamidgele**

Gel		Menge (7,5 %)	Menge (12 %)	Menge (15 %)
Trenngel	H <sub>2</sub> O bidest.	2,39 ml	1,64 ml	1,14
	Trenngelpuffer	1,29 ml	1,29 ml	1,29 ml
	30 % Acrylamid	1,25 ml	2 ml	2,5 ml
	10 % APS	75 µl	75 µl	75 µl
	TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
Sammelgel	H <sub>2</sub> O bidest.	1,5 ml		
	Sammelgelpuffer	635 µl		
	30 % Acrylamid	333 µl		
	10 % APS	40 µl		
	TEMED	3,5 µl		

### 3.3.15.3 Western-Blot

Der Western-Blot wurde per Elektroblothing durchgeführt. Hierfür wurden 5 0,37 mm dicke, in Transferpuffer äquilibrierte Filterpapiere als Basis gelegt. Hierauf kam die für 10 min in Methanol vorgequollene und in Transferpuffer äquilibrierte PVDF-Membran und darauf das SDS-Gel. Hierauf kamen nochmal 5 0,37 mm dicke, in Transferpuffer äquilibrierte Filterpapiere. Die Luftblasen wurden herausgewalzt und die Proteine wurden für 2 h bei  $3 \text{ mA/cm}^2$  geblottet.

Zur Kontrolle der Proteinübertragung wurde das SDS-Gel für 15 min bei Raumtemperatur in Coomassie gefärbt und dann über Nacht entfärbt. Die Membran wurde für 15 min in Titenfärbelösung gefärbt und dann für 1 h in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. entfärbt.

Anschließend wurde die Membran kurz in PBS geschwenkt und dann mit 5 % (w/v) Milchpulver in PBS über Nacht geblockt. Danach wurde die Membran kurz mit PBS gespült und dann mit dem 1. Antikörper, dem Penta-His-Antikörper in einer Verdünnung von 1:4.000, für 1 h inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für je 10 min in PBST. Dann wurde die Membran für 1 h mit dem 2. Antikörper, dem Anti-Mouse IgG-Peroxidase-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10.000, inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschrte für je 10 min in PBST. Die verwendeten Lösungen sind in der folgenden Tabelle dargestellt (siehe Tab. 40).

Zur Detektion der Banden, wurde Roti® Lumin nach Herstellerangaben verwendet. Die Detektion fand in der Dunkelkammer unter Rotlicht statt und der Röntgenfilm wurde für 2 h belichtet. Für die Entwicklung und Fixierung des Röntgenfilms siehe 3.3.10.

**Tab. 40: Lösungen für den Western-Blot**

Name	Substanz	Menge	Endkonzentration
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Blue R-250	0,5 g	0,05 % (w/v)
	Methanol	545 ml	55 % (v/v)
	Eisessig	92 ml	9,2 % (v/v)
	$\text{H}_2\text{O}$ bidest.	454 ml	
Entfärbelösung	Methanol	500 ml	25 % (w/v)
	Eisessig	100 ml	5 % (w/v)
	$\text{H}_2\text{O}$ bidest.	1400 ml	

Tintenfärbelösung	Tween 20	0,5 ml	0,05 % (v/v)
	Eisessigsäure	10 ml	1 % (v/v)
	Tinte	1 ml	0,1 % (v/v)
	<b>ad 1 l mit PBS</b>		
Transferpuffer	Tris	3 g	25 mM
	Glycin	11,3 g	150 mM
	Methanol	100 ml	
	<b>ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O</b> <b>pH 8,5 mit HCl</b>		
PBS	NaCl	8 g	138 mM
	KCl	0,2 g	2,6 μM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g	8,1 μM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g	1,5 μM
<b>ad 1 l mit VE-H<sub>2</sub>O</b>			
PBST	PBS	999 ml	
	Tween 20	1 ml	0,1 % (v/v)

## 4 Ergebnisse

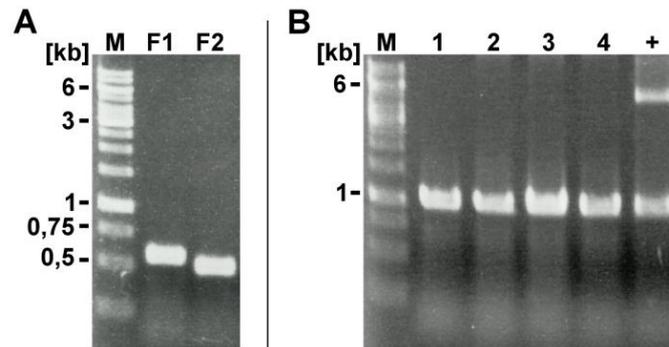
### 4.1 Untersuchung der 16 *orc*-Gene und eines *cdc*-Gens in *Haloferax volcanii*

Orc-Proteine (= Origin Recognition Complex) sind in Eukaryoten an der Erkennung des Replikationsursprungs und der Assemblierung der Replikationsmaschinerie beteiligt. In Archaea konnte ihre Beteiligung an der Initiation der DNA-Replikation bereits in Eury- und in Crenarchaeota gezeigt werden. *H. volcanii* besitzt 16 *orc*-Gene, sechs davon sind wie in anderen Organismen typisch mit einem Replikationsursprung kolokalisiert, die restlichen zehn sind „verwaist“. Um den Einfluss dieser 16 *orc*-Gene auf Fitness und Ploidielevel zu untersuchen, wurden Einzelgen-Deletionsmutanten aller Gene hergestellt. Hierbei sollte auch aufgeklärt werden, ob die „verwaisten“ *orc*-Gene ebenfalls an der Initiation der DNA-Replikation beteiligt sind, eine andere Funktion haben oder inaktive Relikte aus vergangenen Zeiten sind. Des Weiteren wurde ein *cdc*-Gen zur Untersuchung ausgewählt. In *H. volcaniis* Genom sind keine *cdc6*-Gene annotiert, die typischerweise in Eukaryoten an der Replikation beteiligt sind, weshalb exemplarisch *cdc48a* als ein Vertreter der *cdc*-Gene ausgewählt wurde.

#### 4.1.1 Herstellung der Deletionsmutanten

Die Herstellung der Deletionsmutanten erfolgte wie unter 3.3.2 beschrieben und wird im Folgenden stellvertretend für alle Gene anhand des Beispiels von  $\Delta A0257$  dargestellt.

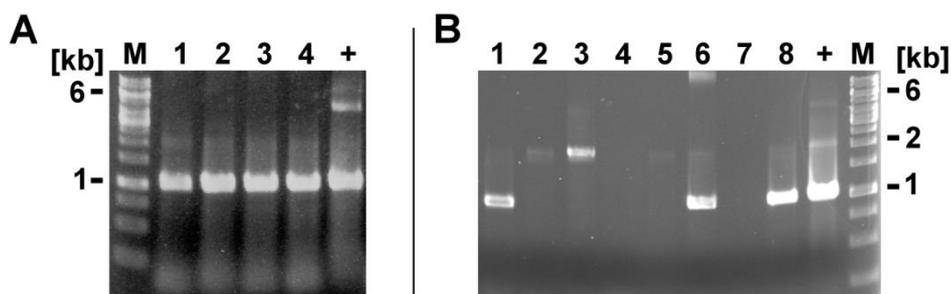
Es wurden mithilfe einer PCR die F1- und F2-Fragmente von *HVO\_A0257* (siehe Abb. 9A) sowie das Vektorrückrad von pMH101 amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden gereinigt und zusammen in ein Gibson-Assembly eingesetzt, um ein geschlossenes Konstrukt zu generieren. Anschließend wurde mit dem kompletten Gibson-Assembly-Ansatz *E. coli* transformiert. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden vier Klone gepickt und mittels Kolonie-PCR untersucht. Alle Klone wurden als positiv identifiziert (siehe Abb. 9B).



**Abb. 9: Generierung der F1- & F2-Fragmente und Kolonie-PCR transformierter *E. coli*-Klone**

**(A)** Agarosegel der F1- & F2-Fragmente von *HVO\_A0257*. Die Fragmente entsprechen den erwarteten Größen von 619 bp (F1) und 547 (F2). **(B)** Agarosegel der Kolonie-PCR transformierter *E. coli*-Klone. Gezeigt sind 4 Klone (1 – 4), als Positivkontrolle wurde ein anderes Deletionsplasmid verwendet (+). Alle untersuchten Klone sind positiv, da sie die erwartete Bande auf einer Höhe von 1202 bp zeigen.

Es wurde der Vektor aus einem positiven Klon isoliert und zur Sequenzierung zur GATC GmbH geschickt. Nachdem Mutationen im Insert ausgeschlossen waren, wurde *Haloferax volcanii* mit dem Vektor transformiert. Nach einer Inkubation von 4 – 5 Tagen wurden vier Klone gepickt und mittels Kolonie-PCR untersucht. Alle Klone wurden als positive Pop-In-Klone identifiziert (siehe Abb. 10A). Ein Klon wurde über Nacht in Synthetischem Medium mit Casaminosäuren als Kohlenstoffquelle angezogen und dann auf 5-FOA-haltigem Medium ausplattiert. Nach einer Inkubation von 4 Tagen wurden 8 Klone gepickt und mittels Kolonie-PCR untersucht. Klon 3 zeigt deutlich die Bande des Wildtyps. Drei Klone – Klon 1, 6 und 8 – konnten als mögliche Deletionsmutante identifiziert werden und wurden fünf Mal in Komplexmedium überimpft (siehe Abb. 10B).

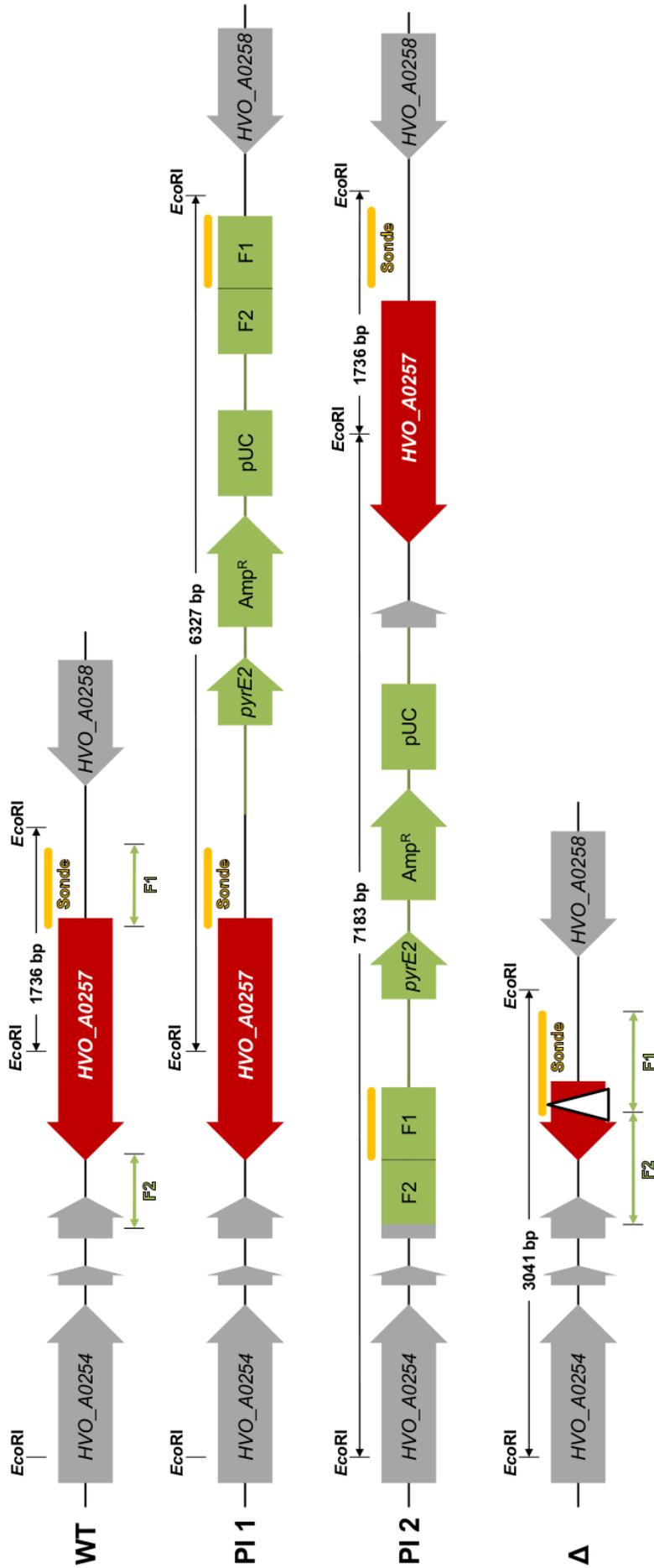


**Abb. 10: Kolonie-PCR der Pop-In und Pop-Out Klone von *HVO\_A0257***

Als Positivkontrolle wurde pM101\_ΔA0257 verwendet (+). **(A)** Gezeigt sind 4 untersuchte Klone (1 – 4). Alle zeigen die erwartete Bande bei 1123 bp und sind somit positiv. **(B)** Gezeigt sind 8 untersuchte Klone (1 – 8). Klon 1, 6 und 8 zeigen die erwartete Bande der Deletion bei 1123 bp. Klon 3 zeigt die erwartete Bande des Wildtyps auf Höhe von 2365 bp. Bei Klon 4 und 7 konnte keine Bande detektiert werden.

Die Gesamt-DNA der Klone wurde isoliert, mit *EcoRI* verdaut und mithilfe eines 1 %-igen Agarosgels gelelektrophoretisch aufgetrennt.

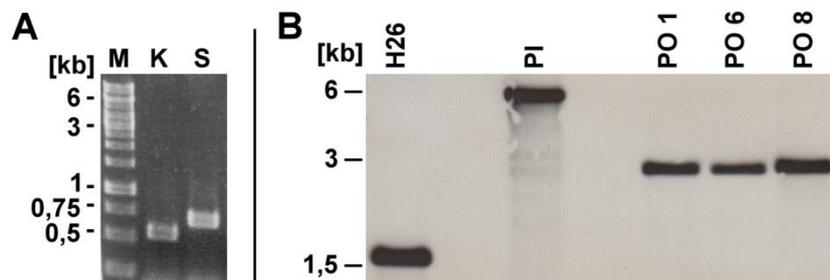
Die Planung des Southern-Blots ist in Abb. 11 dargestellt.



**Abb. 11: Planung des Southern-Blots von *HVO\_A0257***

Nach dem Verdau der genomischen DNA mit *EcoRI* können mit der generierten Sonde verschieden große Fragmente für Wildtyp (WT), Pop-In 1 (PI 1), Pop-In 2 (PI 2) und die Deletionsmutante (Δ) detektiert werden. Das zu deletierende Gen ist in rot dargestellt, die Sonde in gelb und die Vektor-DNA in grün. F1 und F2 beschreiben die upstream und downstream-Bereiche, die amplifiziert und in den Vektor kloniert werden.

Zur Detektion der Banden im Southern-Blot wurde eine Digoxigenin-markierte Sonde generiert. Die F1-Sonde für den Southern-Blot konnte erfolgreich generiert werden. Sie zeigt im Vergleich zur Dig-UTP-freien Kontrolle das erwartete verzögerte Laufverhalten, das auf einen guten Dig-UTP-Einbau hindeutet (siehe Abb. 12A). Das Agarosgel mit der verdauten DNA wurde über Nacht geblottet und die Banden dann per Röntgenfilm nachgewiesen. Der Southern-Blot zeigt die erwarteten Fragmentgrößen (siehe Abb. 12B). Die Pop-In-Mutante konnte als Pop-In 1 identifiziert werden, d. h. die Integration des Plasmids ins Genom erfolgte durch homologe Rekombination über das F1-Fragment. Bei allen drei untersuchten Pop-Out-Mutanten handelt es sich um die gewünschte Deletionsmutante.



**Abb. 12: Sonden-PCR und Southern-Blot von *HVO\_A0257***

(A) Der Kontrollansatz (K) ohne Dig-UTP zeigt die gewünschte Größe von 619 bp, der Sonden-Ansatz (S) zeigt das durch Dig-UTP-Einbau verlangsamte Laufverhalten. (B) Gezeigt ist ein Röntgenfilm nach 1 Minute Belichtung. H26, der hier als Wildtyp verwendet wurde, zeigt die erwartete Bandengröße von 1736 bp. Bei der Pop-In-Mutante (PI) konnte das Bandenmuster des Pop-In 1 (6372 bp) detektiert werden. Bei den Pop-Out-Mutanten (PO) 1, 6 & 8 konnte nur die Deletionsbande von 3041 bp detektiert werden.

Die übrigen 15 *orc*-Gene wurden analog zu dem hier gezeigten Vorgehen deletiert. Insgesamt haben sich 13 *orc*-Gene als nicht essentiell herausgestellt. Darunter sind fünf Gene, die mit einem Replikationsursprung kolokalisiert sind (z.B. *HVO\_0001*) und acht Gene, die „verwaist“ sind (z.B. *HVO\_0194*). Bei drei weiteren Genen konnten bei 100 untersuchten Pop-Out Klonen nur welche mit Wildtypbande gefunden werden, weshalb die Gene als essentiell klassifiziert wurden. Auch hier gibt es ein Gen, das mit einem Replikationsursprung kolokalisiert ist (*HVO\_B0001*) und zwei, die „verwaist“ sind (z.B. *HVO\_2293*). Bei dem Gen *HVO\_A0064* war keine Deletion möglich. Zwar wuchsen nach der Transformation mit dem Deletionsplamid Uracil-prototrophe Klone, aber im Southern-Blot konnte keine Bande detektiert werden, weder bei der Pop-In Mutante noch bei der Pop-Out Mutante, weshalb dieses Gen als nicht-essentiell klassifiziert wurde, die Deletionsmutante aber

aufgrund der möglichen polaren Effekte durch das genomische Rearrangment nicht weiter untersucht wurde.

Im Folgenden ist eine tabellarische Übersicht über die Deletionsmutanten gegeben (siehe Tab. 41).

**Tab. 41: Übersicht der *orc*-Deletionsmutanten**

Replikon	Gennummer	Genname	Genomische Region/Strang Deletierter Bereich	Genlänge
Chr	<b>HVO_0001</b> (ori1)	<b><i>orc1</i></b>	258-1952/F 282-1925	1695
Chr	HVO_0194	<i>orc9</i>	174892-176016/F 174909-176000	1125
Chr	<b>HVO_0634</b> (ori3)	<b><i>orc2</i></b>	569203-570429/R 569215-570384	1227
Chr	HVO_1537	<i>orc15</i>	1403626-1404828/R 1403674-1404810	1203
Chr	<b>HVO_1725</b> (ori2)	<b><i>orc5</i></b>	1594707-1595912/F 1594719-1595900	1206
Chr	HVO_2042	<i>orc4</i>	1888354-1889583/F 1888369-1889568	1230
Chr	HVO_2133	<i>orc16</i>	1998477-1999643/R 1998492-1999634	1167
Chr	HVO_2292	<i>orc14</i>	2160851-2161873/R 2160870-2161857	1023
Chr	HVO_2293	<i>orc11</i>	2162076-2162873/F	798
pHV4	<b>HVO_A0001</b> (ori-pHV4)	<b><i>orc3</i></b>	152-1402/F 167-1387	1251
pHV4	HVO_A0064	<i>orc13</i>	55398-56897/R	1500
pHV4	HVO_A0072	<i>orc12</i>	65261-66289/R	1029
pHV4	HVO_A0257	<i>orc7</i>	257391-258668/R 257415-258656	1278
pHV3	<b>HVO_B0001</b> (ori-pHV3)	<b><i>orc6</i></b>	201-1433/F 222-1409	1233
pHV1	<b>HVO_C0001</b> (ori-pHV1)	<b><i>orc10</i></b>	101-1327/F 143-1288	1227
pHV1	HVO_C0057	<i>orc8</i>	56369-57616/F 56375-57604	1248

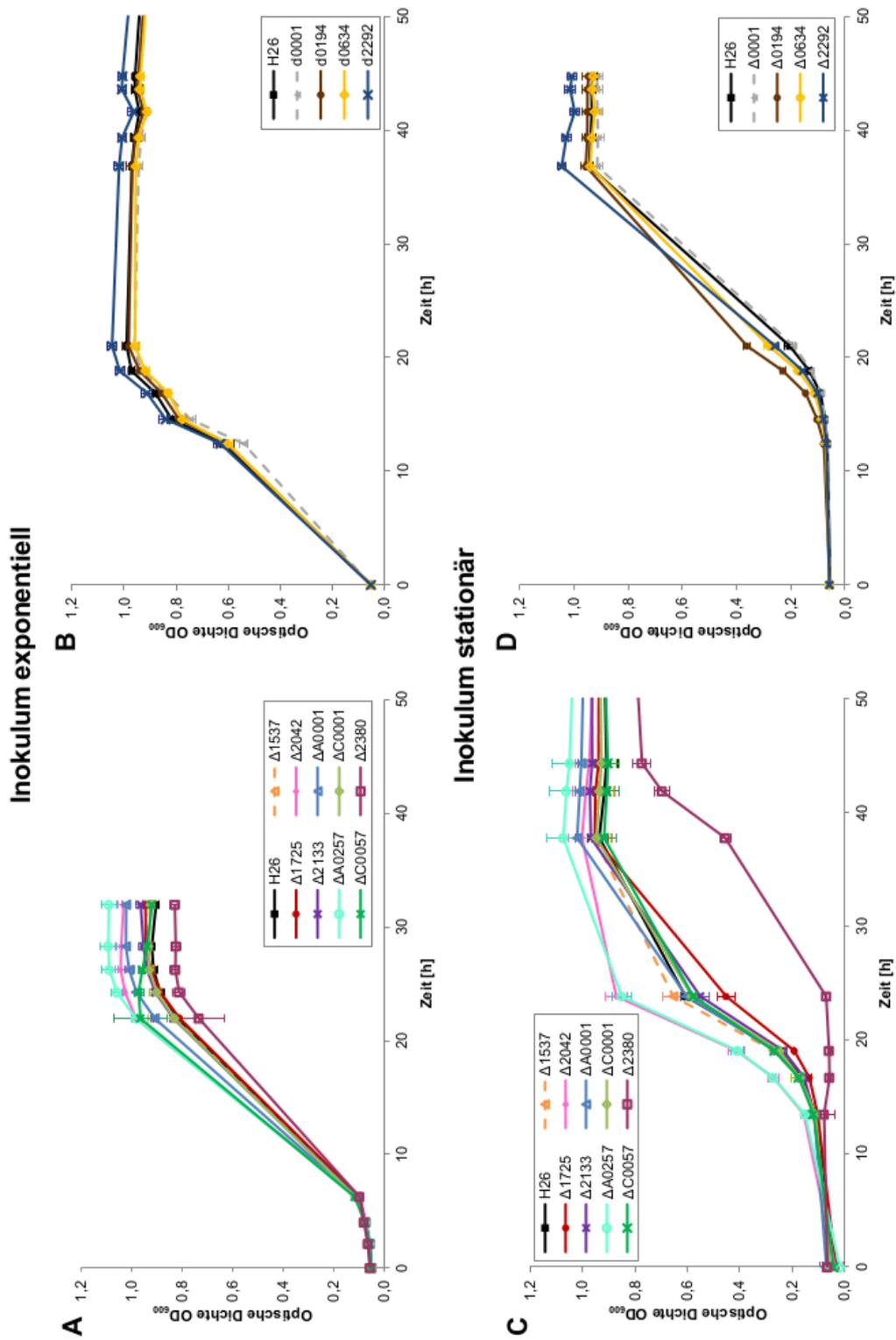
grün: deletiert; rot: essentiell; gelb: Pop-In nicht möglich, nicht essentiell; grau/fett & unterstrichen: Teil eines Replikationsursprungs; f: forward; r: reverse

Darüber hinaus konnte das Gen *HVO\_2380* (*cdc48a*) erfolgreich deletiert werden. Da in *H. volcaniis* Genom sind keine *cdc6*-Gene annotiert sind, die typischerweise in Eukaryoten als Helikaselader bei der DNA-Replikation fungieren, wurde *cdc48a* exemplarisch als ein Vertreter der *cdc*-Gene ausgewählt, um seinen Einfluss auf das Ploidielevel und die Fitness zu charakterisieren.

#### 4.1.2 Wachstum der Deletionsmutanten

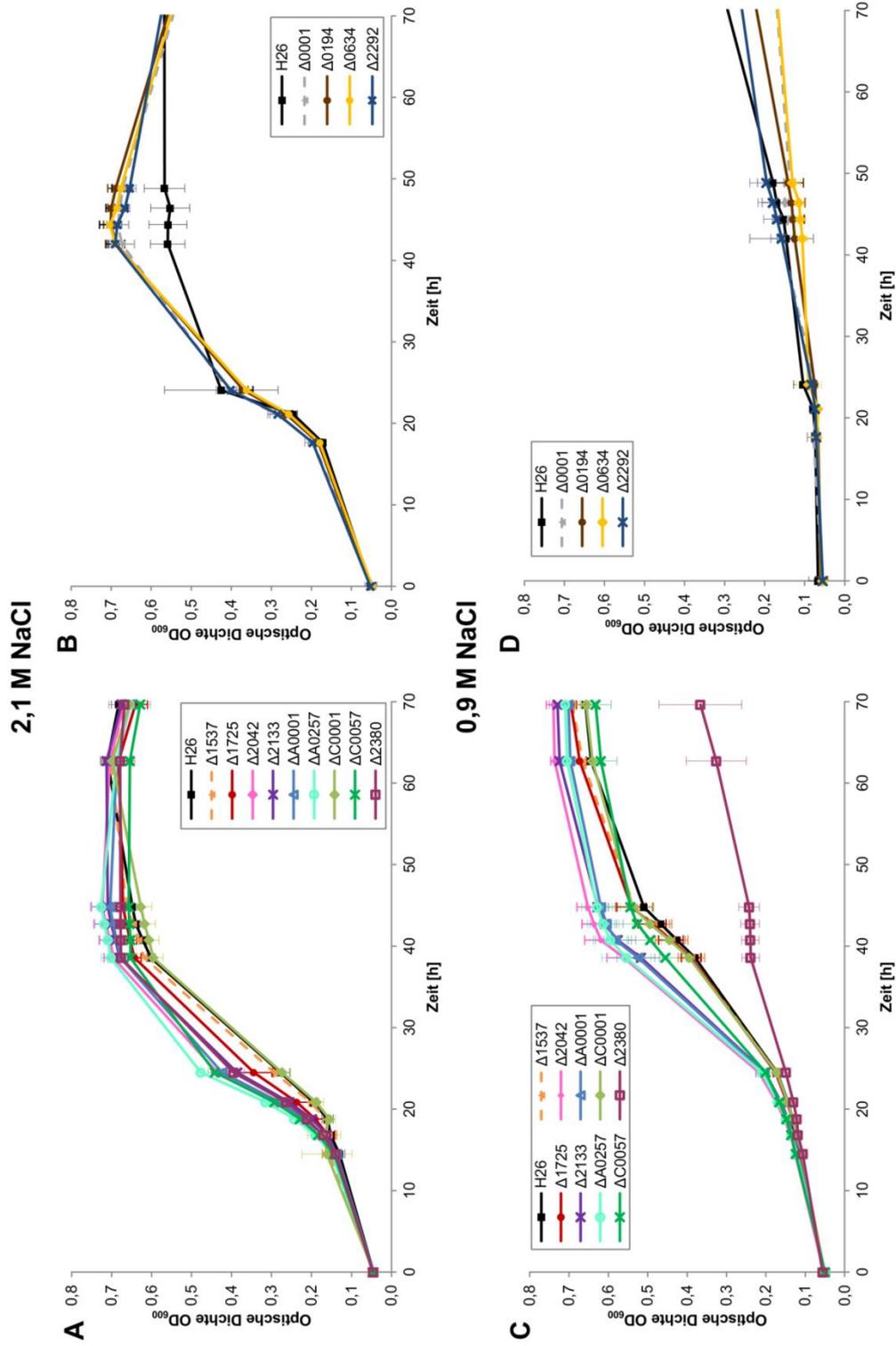
Zur Untersuchung der Fitness der generierten Deletionsmutanten, wurden Mikrotiterwachstumstests unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Das Wachstum von drei biologischen Replikaten wurde zum einen in Komplexmedium charakterisiert; hierfür wurden einmal exponentielle und einmal 11 Tage stationäre Kulturen zum Animpfen verwendet (siehe Abb. 13). Zum anderen wurde das Wachstum in synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle untersucht; hierbei lag die NaCl-Konzentration einmal bei optimalen 2,1 M und einmal bei 0,9 M, was für *H. volcanii* osmotischem Stress entspricht und nah an der unteren Wachstumsgrenze von 0,7 M liegt (siehe Abb. 14). Darüber hinaus wurde noch das Wachstum unter Phosphatmangel untersucht, mit dem Hinblick auf die Möglichkeit der Verwendung von DNA als Phosphatspeicher (siehe Abb. 15).

Die Deletion eines *orc*-Gens führt in Komplexmedium meist zu verbessertem oder identischem Wachstum im Vergleich zum Wildtyp (H26) (siehe Abb. 13). Lediglich die Mutante  $\Delta 1725$  zeigt nach Anwachsen aus stationärer Kultur ein geringfügig langsameres Wachstumsverhalten. Die Mutanten  $\Delta 2042$  und  $\Delta A0257$  zeigen ein deutlich schnelleres Wachstum und eine höhere End-OD<sub>600</sub> (siehe Abb. 13A & C).  $\Delta 0194$  zeigt nach Inokulation aus stationärer Kultur ein schnelleres Anwachsen (siehe Abb. 13D), während  $\Delta 2292$  und  $\Delta A0001$  in beiden Fällen kein verbessertes Wachstum zeigen, aber eine höhere End-OD<sub>600</sub> erreichen. Deletion des Gens *HVO\_2380* (*cdc48a*) führt zu verminderter Fitness, insbesondere beim Anwachsen nach längerer stationärer Phase (siehe Abb. 13A & C).



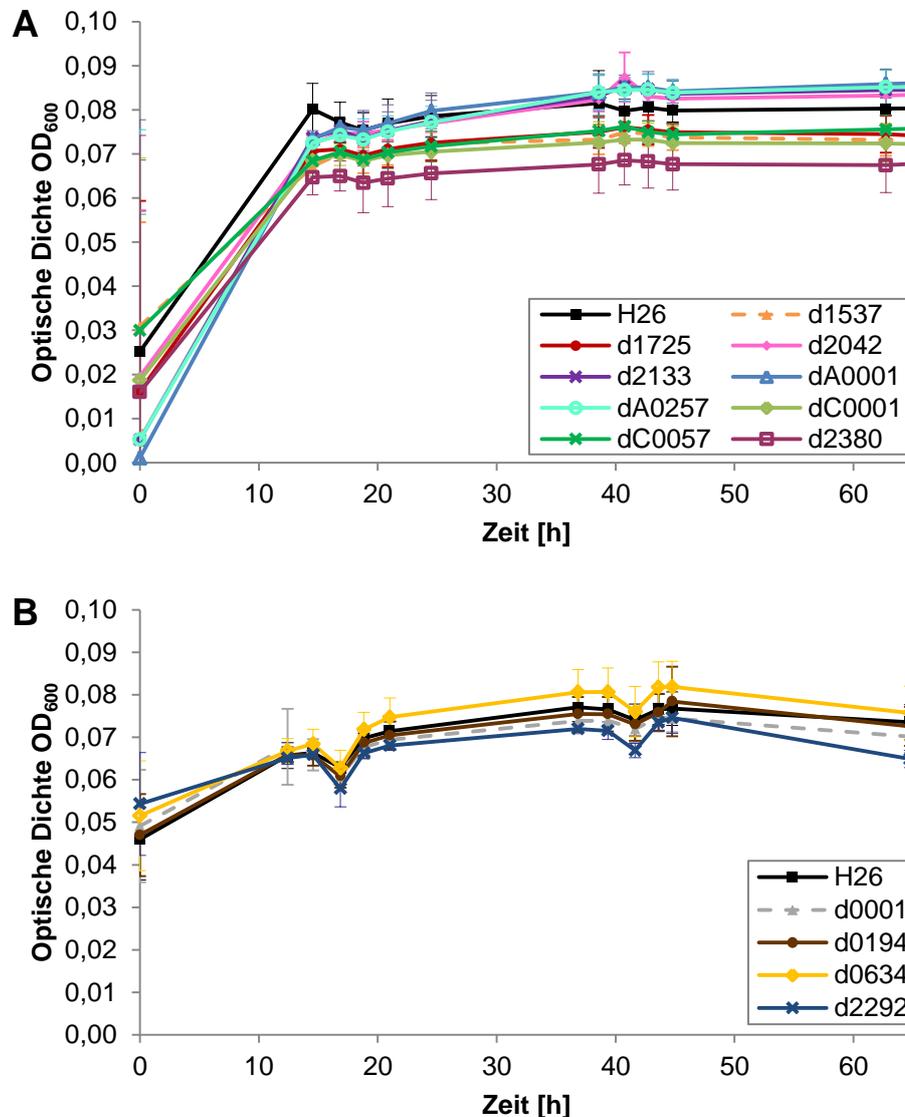
**Abb. 13: Wachstum der *orc*- und *cdc*-Deletionsmutanten nach Inokulation mit exponentiellen und stationären Kulturen**  
 Gezeigt sind die Wachstumskurven der 12 *orc*- und der einen *cdc*-Deletionsmutanten (Δ2380) in Komplexmedium nach dem Animpfen mit exponentiellen (A & B) oder 11-Tage stationären Kulturen (C & D). Aufgetragen sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten und ihren Standardabweichungen.

Bei normaler Salzkonzentration und unter osmotischem Stress führt die Deletion eines *orc*-Gens wie im Komplexmedium zu verbessertem oder identischem Wachstum im Vergleich zum Wildtyp (H26) (siehe Abb. 14). Die Mutanten  $\Delta 1537$  und  $\Delta C0001$  zeigen, wie auch schon im Komplexmedium, gleiches Wachstum wie der Wildtyp, während die Mutanten  $\Delta 2042$  und  $\Delta A0257$  wie zuvor schneller wachsen und eine höhere End-OD<sub>600</sub> erreichen (siehe Abb. 14A & C). Die Mutante  $\Delta 2133$  zeigt in Synthetischem Medium mit Glukose bei beiden Salzkonzentrationen verbessertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp, das in Komplexmedium nicht auftritt (siehe Abb. 14A & C). Für die Mutanten  $\Delta 0001$ ,  $\Delta 0194$ ,  $\Delta 0634$  und  $\Delta 2292$  kann nicht mit Sicherheit eine Aussage getroffen werden, da der Wildtyp unter beiden Bedingungen kein optimales Wachstum zeigt und die Werte große Standardabweichungen haben (siehe Abb. 14B & D). Die Deletion des Gens *HVO\_2380* (*cdc48a*) führt unter osmotischem Stress zu einem Phänotyp mit deutlich verminderter Fitness, nicht jedoch bei normaler Salzkonzentration (siehe Abb. 14A & C).



**Abb. 14: Wachstum der *orc*- und *cdc*-Deletionsmutanten unter normalen und osmotischen Stressbedingungen**  
 Gezeigt sind die Wachstumskurven der 12 *orc*- und der einen *cdc*-Deletionsmutanten ( $\Delta 2380$ ) in Synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle, einmal bei optimaler Salzkonzentration von 2,1 M NaCl (**A & B**) und einmal unter starkem osmotischem Stress bei 0,9 M NaCl (**C & D**). Aufgetragen sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten und ihren Standardabweichungen.

Die Charakterisierung des Wachstums unter Phosphatmangel ergab, dass alle 13 Deletionsmutanten unter diesen Bedingungen mit dem Wildtyp (H26) vergleichbares Wachstum zeigen (siehe Abb. 15).



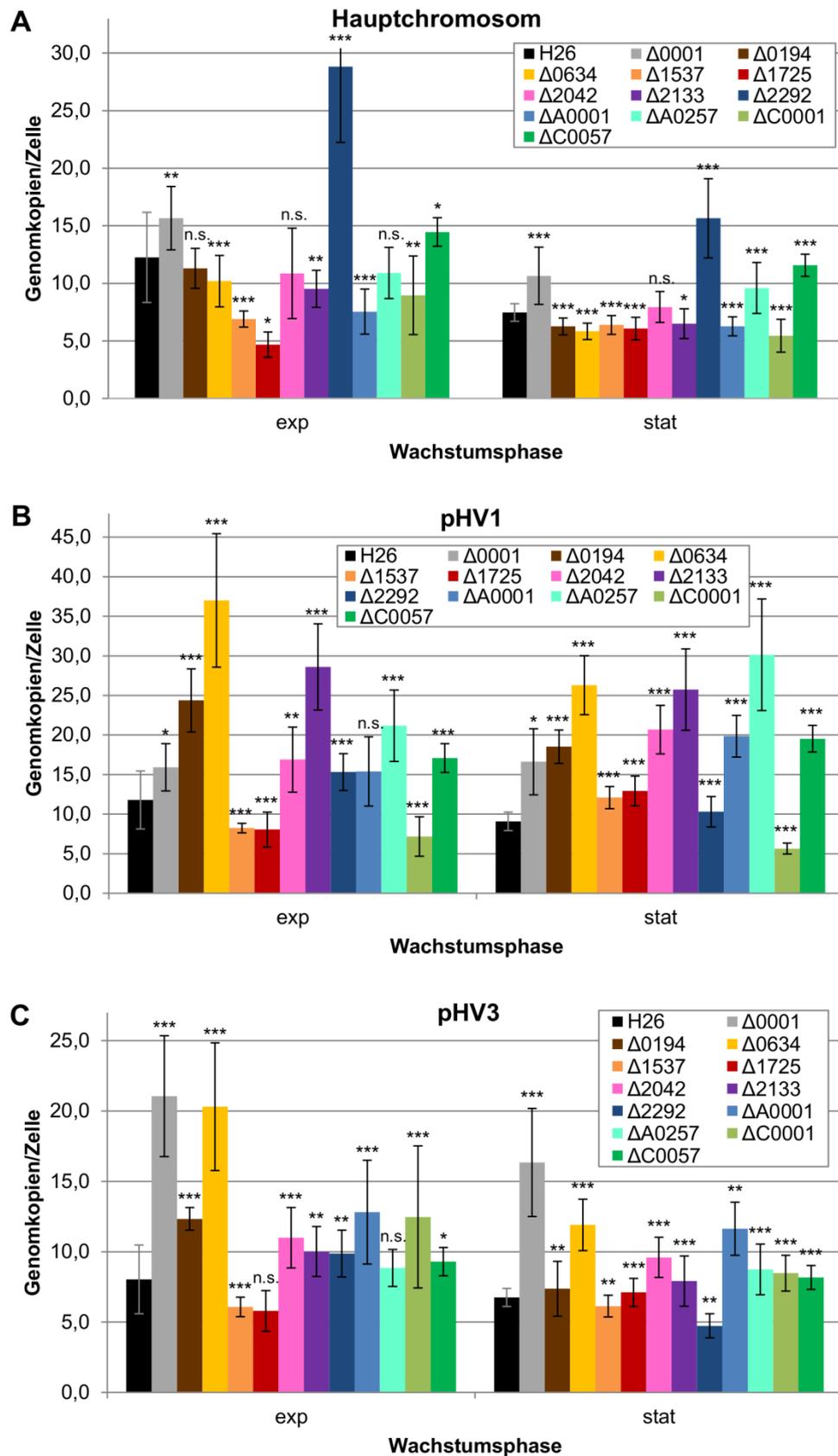
**Abb. 15: Wachstum der *orc*- und *cdc*-Deletionsmutanten unter Phosphatmangel**

Gezeigt sind die Wachstumskurven der 12 *orc*- und der einen *cdc*-Deletionsmutanten ( $\Delta 2380$ ) in Synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle ohne Phosphat. Aufgetragen sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten und ihren Standardabweichungen.

#### 4.1.3 Genomkopienzahl der Deletionsmutanten

Da es sich bei der Replikationsinitiation vermutlich um den entscheidenden Schritt bei der Regulation des Ploidielevels handelt, wurde die Genomkopienzahl der *orc*- und der *cdc*-Deletionsmutanten untersucht. Hierfür wurden Proben in Komplexmedium genommen und mittels qPCR die Genomkopienzahl pro Zelle bestimmt (siehe Abb. 16 & Abb. 18).

Die Ergebnisse zeigen, dass alle *orc*-Gene das Ploidielevel mindestens eines Replikons beeinflussen (siehe Abb. 16). Manche beeinflussen mehrere Replikons, wie z.B. *HVO\_0634*, das großen Einfluss auf pHV1 und pHV3 zeigt. *HVO\_2292* (kodiert auf Hauptchromosom) und *HVO\_C0057* (kodiert auf pHV1) beeinflussen am stärksten das Replikon, auf dem sie kodiert sind, während z.B. *HVO\_0001* und *HVO\_2133* den größten Einfluss auf pHV1 zeigen, obwohl sie auf dem Hauptchromosom kodiert sind. Darüber hinaus unterscheiden sich „verwaiste“ und mit einem Replikationsursprung kolokalisierte Gene nicht in der Größe ihres Einflusses, so führt die Deletion der Gene *HVO\_0001* (*ori1*) und *HVO\_0634* (*ori3*) zu ähnlich starken Veränderungen wie die Deletion der vewaisten Gene *HVO\_2133*, *HVO\_2292* und *HVO\_A0257*.

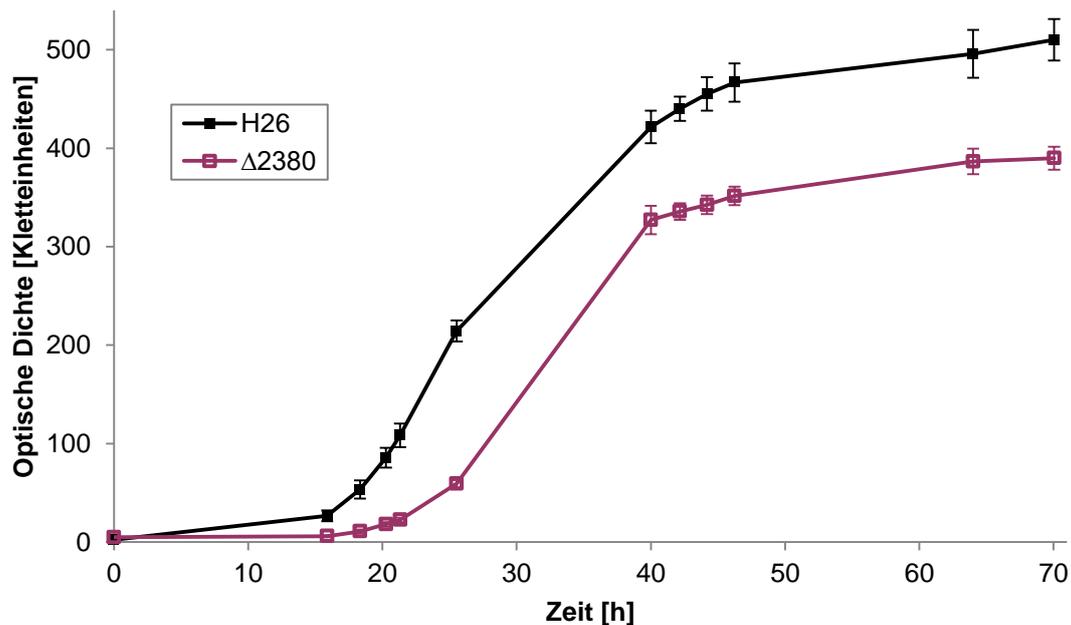


**Abb. 16: Ploidielevel der *orc*-Deletionsmutanten**

Gezeigt ist die Genomkopienzahl pro Zelle der 12 *orc*-Deletionsmutanten in Komplexmedium. Aufgetragen sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten und ihren Standardabweichungen. Die Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Ploidieleveln wurden mittels *t*-Test bestimmt:  $p$ -Wert  $< 5\%$  = \*,  $< 1\%$  = \*\*,  $< 0.1\%$  = \*\*\* und n.s. = nicht signifikant.

Da die *cdc*-Deletionsmutante  $\Delta 2380$  in Mikrotiterplatten einen starken Wachstumsdefekt in Komplexmedium im Vergleich zum Wildtyp zeigt, wurde eine Wachstumskurve in Klettkolben angefertigt, um die optimalen Zeitpunkte für einen Vergleich der Genomkopienzahl zu ermitteln (siehe Abb. 17).

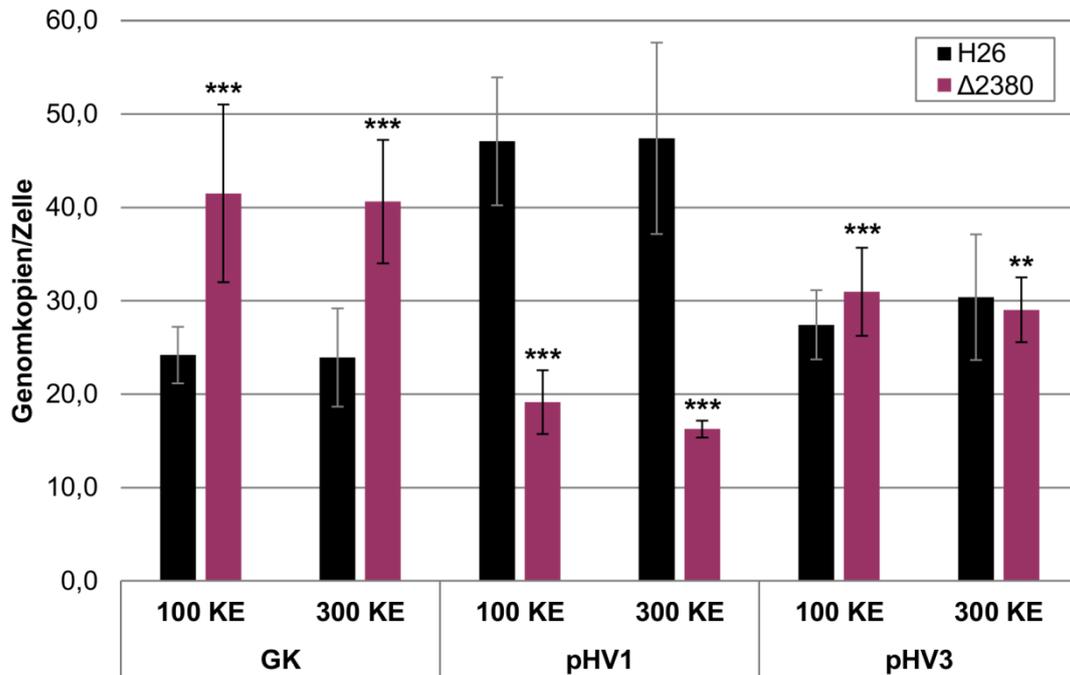
Die Wachstumskurve zeigt deutlich, dass die Mutante  $\Delta 2380$  auch in Klettkolben deutlich langsamer wächst und nicht die End-OD<sub>600</sub> des Wildtyps erreicht.



**Abb. 17: Wachstumskurve von  $\Delta 2380$  in Komplexmedium**

Gezeigt ist das Wachstum von  $\Delta 2380$  im Vergleich zum Wildtyp in Klettkolben in Komplexmedium. Die Durchschnittswerte von drei biologischen Replikaten sowie deren Standardabweichungen wurden aufgetragen.

Um das Ploidielevel besser vergleichen zu können, wurde die Probe für die exponentielle Phase bei 100 KE und die für die stationäre Phase bei 300 KE genommen. Die Proben wurden mittels qPCR analysiert, ausgewertet und dargestellt (siehe Abb. 18). Die Deletion von *HVO\_2380* hat großen Einfluss auf das Ploidielevel. Im Falle des Hauptchromosoms (GK) ist die Genomkopienzahl pro Zelle deutlich höher, im Falle von pHV1 wesentlich niedriger im Vergleich zum Wildtyp (H26). Lediglich bei pHV3 ist das Ploidielevel nahezu identisch.



**Abb. 18: Ploidielevel der *cdc*-Deletionsmutante Δ2380**

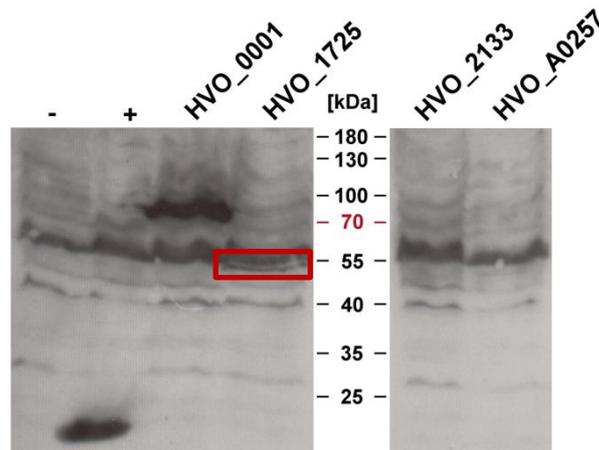
Gezeigt ist die Genomkopienzahl von Δ2380 im Vergleich zum Wildtyp (H26) bei 100 und 300 KE. Ermittelt wurden die Genomkopienzahlen des Hauptchromosoms (GK), von pHV1 und pHV3. Aufgetragen sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten und ihren Standardabweichungen. Die Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Ploidieleveln wurden mittels *t*-Test bestimmt: *p*-Wert < 5 % = \*, < 1 % = \*\*, < 0.1 % = \*\*\* und n.s. = nicht signifikant.

#### 4.1.4 Überexpression ausgewählter *orc*-Gene

Um das Zusammenspiel der *orc*-Proteine miteinander oder mit anderen Proteinen genauer untersuchen zu können, wurden konstitutive Überexpressionsvektoren mit N-terminalem Hexahistidin-Tag von zwei replikationsursprungsassoziierten (*HVO\_0001* (*ori1*) und *HVO\_1725* (*ori2*)) und zwei „verwaisten“ Genen (*HVO\_2133* und *HVO\_A0257*) im Vektor pTA929\_M2-18 angefertigt und in ihre entsprechenden Deletionsmutanten transformiert. Die Überexpression erfolgte über Nacht in Hv-Cab-Medium. Zellen wurden in exponentieller Phase geerntet, aufgeschlossen und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Blotting erfolgte die Detektion mit einem Antikörper gegen den Hexahistidin-Tag.

Bei der Negativkontrolle, bei der H26 aufgetragen wurde, ist wie erwartet, keine Bande erkennbar (siehe Abb. 19). Als Positivkontrolle wurde die konstitutiv exprimierte DHFR verwendet und die Bande wurde auf der erwarteten Höhe von 18 kDa detektiert. Da *H. volcaniis* Proteine aufgrund vieler Glutamat- und Aspartat-Reste stark negativ geladen sind, laufen die Proteinbanden im SDS-Gel ungefähr 20 % höher als aufgrund ihrer Größe eigentlich zu erwarten wäre. *HVO\_0001* hat

eine Größe von 62 kDa, was in etwa der Bande entspricht, die im Western-Blot zwischen 70 und 100 kDa detektiert wurde. Bei HVO\_1725 ist eine schwache Bande bei ungefähr 55 kDa erkennbar, was ungefähr mit der erwarteten Größe von 45 kDa übereinstimmt. Für HVO\_2133 und HVO\_A0257 wurden Banden auf der Höhe von 42 kDa und 48 kDa erwartet, allerdings sind bei dieser Größe keine Banden erkennbar.



**Abb. 19: Western-Blot der überexprimierten *orc*-Gene**

Gezeigt ist ein Röntgenfilm nach einer Belichtungszeit von 2 h. Es wurde Cytoplasmaextrakt aufgetragen. Als Negativkontrolle (-) wurde H26 verwendet, als Positivkontrolle (+) die DHFR. Bei der Überexpression von *HVO\_0001* ist eine Bande zwischen 70 und 100 kDa erkennbar, bei der Überexpression von *HVO\_1725* bei ungefähr 55 kDa. Bei der Überexpression von *HVO\_2133* und *HVO\_A0257* sind keine Banden erkennbar, die mit ihren überexprimierten Proteinen korrelieren.

Die hier überexprimierten und detektierten Hexahistidin-getaggten Orc-Proteine *HVO\_0001* und *HVO\_1725* können nun für Co-Affinitätsaufreinigungen verwendet werden, um sowohl DNA-Bindestellen als auch Proteinbindungspartner der Orc-Proteine genauer zu untersuchen.

#### 4.2 Untersuchung der *ori1*- und *ori2*-nahen Gene

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Replikationsursprünge *ori1* und *ori2* sowie ihre umliegenden Regionen einen Einfluss auf das Ploidielevel haben. Um herauszufinden, welche Gene genau in den 5'-Regionen der Replikationsursprünge für den beobachteten Effekt verantwortlich waren, wurden diese Gene in dieser Arbeit genauer charakterisiert.

#### 4.2.1 Verifizierung der Expression des *oap*-Operons

Das *oap*-Operon besteht aus drei Genen – *HVO\_3014* (*oapA*), *HVO\_3013* (*oapB*) und *HVO\_3012* (*oapC*) -, die auf dem reverse-Strang upstream von *ori1* liegen. Wie *ori1* selbst, ist auch dieses Operon in Haloarchaea hoch-konserviert. Über die Funktion ist nichts bekannt, aber aufgrund der Konservierung und der Nähe zum Replikationsursprung besteht die Vermutung, dass das Operon an der Regulation des Ploidielevels beteiligt sein könnte.

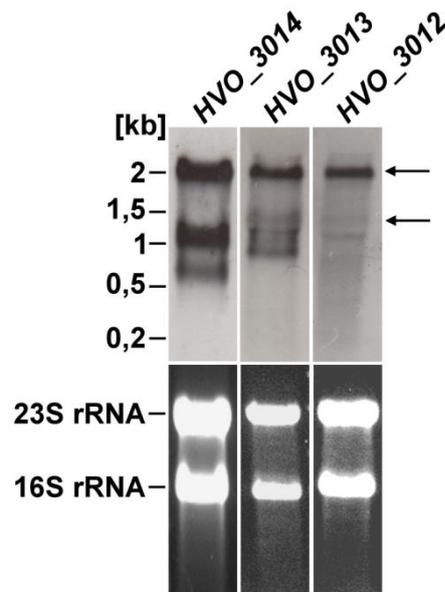
Die dRNA-Seq-Daten zeigen einen Replikationsstart vor dem ersten Gen des Operons *HVO\_3014*, allerdings ist dort auch eine sRNA annotiert, sodass der Start nicht eindeutig festgelegt werden konnte. Ein zweiter Replikationsstart wurde beim zweiten Gen *HVO\_3013* detektiert. Die RNA-Seq-Daten zeigen eine Expression der gesamten drei Gene, jedoch mit einer deutlich stärkeren Expression der ersten beiden Gene, *HVO\_3014* und *HVO\_3013*, und einer deutlich schwächeren des letzten Gens *HVO\_3012*. Aufgrund dieser nicht ganz eindeutigen HTS-Daten, wurde ein Northern-Blot von Zellen in exponentieller Phase in Komplexmedium angefertigt, um die Expression des *oap*-Operons genauer zu untersuchen (siehe Abb. 20).

In allen drei Blots ist die Bande für das gesamte Operon bei 2082 bp erkennbar (siehe oberer Pfeil in Abb. 20). Darüber hinaus ist sowohl die Expression der ersten beiden Gene (*HVO\_3014* – *HVO\_3013*) sowie des ersten Gens alleine sichtbar (*HVO\_3014*). Der Transkriptionsstart, der mithilfe von dRNA-Seq bei Gen *HVO\_3013* detektiert werden konnte, ist im Northern-Blot von *HVO\_3013* ebenfalls erkennbar und das Transkript, bestehend aus *HVO\_3013* und *HVO\_3012*, entspricht auch der erwarteten Länge von 1433 bp. Im Widerspruch hierzu steht jedoch die deutlich schwächere Bande bei *HVO\_3012*, da sie im Falle eines gemeinsamen Transkripts die gleiche Intensität wie die bei *HVO\_3012* detektierte Bande aufweisen sollte (siehe unterer Pfeil in Abb. 20). Die monocistronischen Transkripte von *HVO\_3013* und *HVO\_3012* konnten nicht detektiert werden.

Im Folgenden sind zur besseren Übersicht die Größen für die verschiedenen Transkripte aufgeführt. Die grau unterlegten Zellen zeigen, welche Transkripte möglich sind (siehe Tab. 42).

**Tab. 42: Mögliche Transkriptgrößen des *oap*-Operons**

<i>HVO_3014 (oapA)</i>	<i>HVO_3013 (oapB)</i>	<i>HVO_3012 (oapC)</i>
2082 bp		
1041 bp		
641 bp		
	1433 bp	
	393 bp	
		993 bp



**Abb. 20: Northern-Blot des *oap*-Operons**

Gezeigt sind die Northern-Blots von *HVO\_3014 (oapA)*, *HVO\_3013 (oapB)* und *HVO\_3012 (oapC)* und den entsprechenden RNA-Gelen. Die Pfeile markieren die Transkripte des gesamten Operons (*HVO\_3014 – HVO\_3012*: oberer Pfeil) und der letzten beiden Gene (*HVO\_3013 – HVO\_3012*: unterer Pfeil), die auch mittels dRNA-Seq ermittelt werden konnten.

#### 4.2.2 Überexpression der *ori1*- und *ori2*-nahen Gene in H26

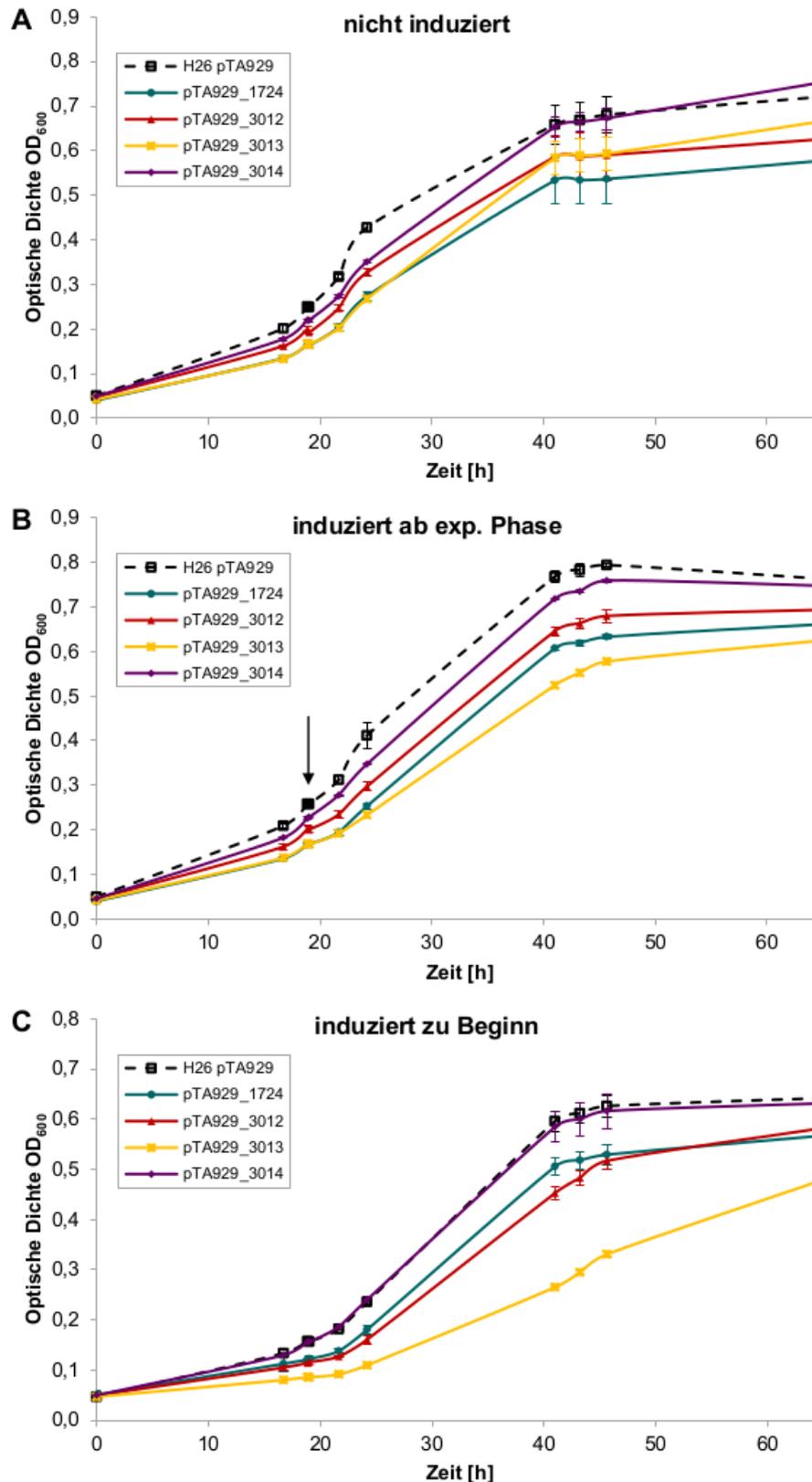
Um die upstream-liegenden Gene von *ori1* und *ori2* weiter zu klassifizieren, wurden Tryptophan-induzierbare Überexpressionsvektoren mit einem Hexahistidin-Tag von dem hypothetischen Gen *HVO\_1724*, der Rad25d-Helikase *HVO\_1723*, der Hef-Helikase *HVO\_3010*, dem *oapA*-Gen *HVO\_3014*, *oapB*-Gen *HVO\_3013* und dem *oapC*-Gen *HVO\_3012* generiert. Diese wurden zunächst in den Wildtyp H26 transformiert und ihr Wachstum in Mikrotiterplatten untersucht (siehe Abb. 21 und

Abb. 22). Zusätzlich wurde ein Western-Blot angefertigt, um den Grundstein weiterer Charakterisierungen der Gene bzw. ihrer Proteine zu legen (siehe Abb. 23).

#### **4.2.2.1 Wachstum der Überexpressionsmutanten**

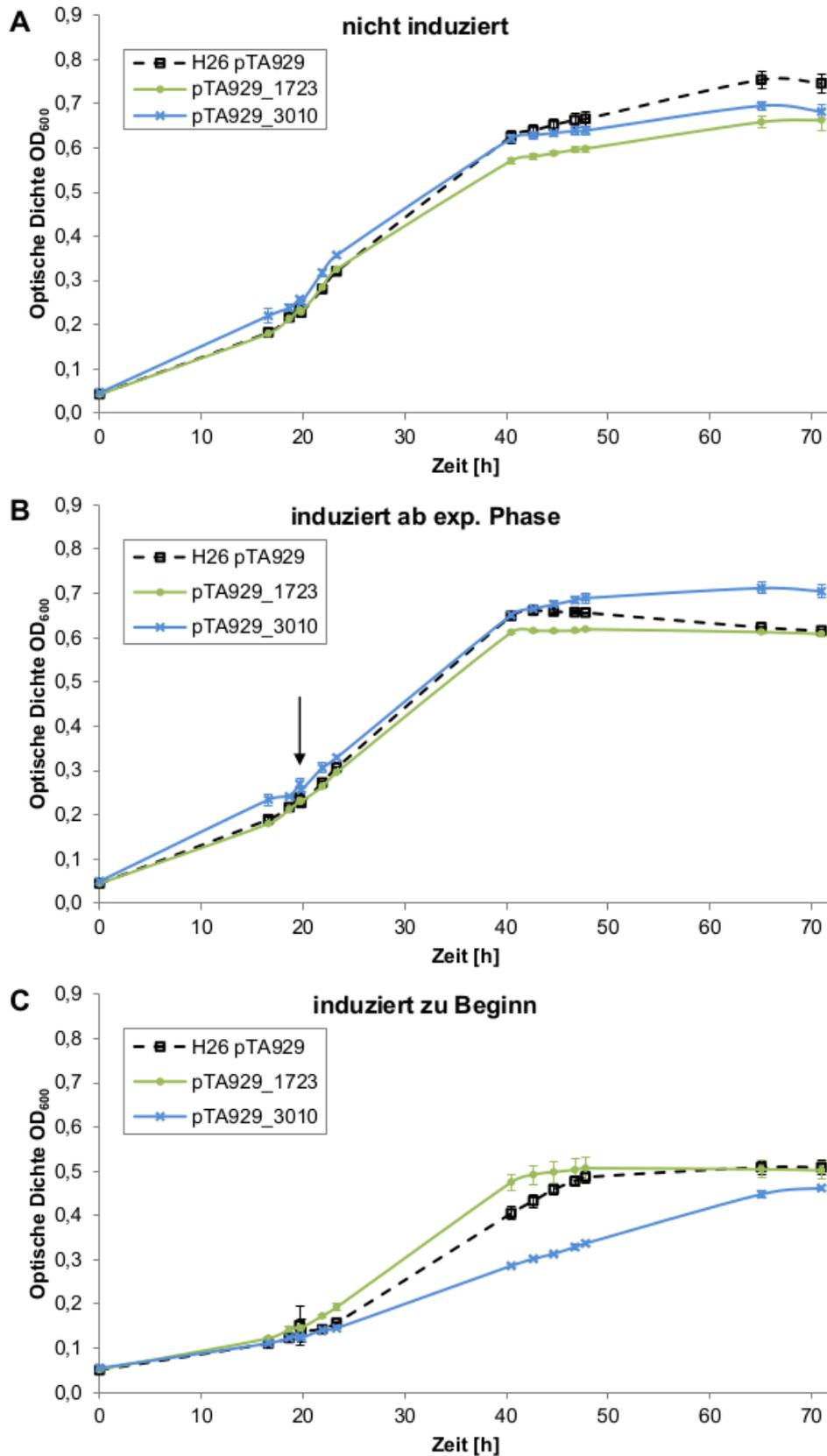
Die Wachstumsversuche wurden in Mikrotiterplatten in Synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle durchgeführt. Einmal wurden die Zellen nicht induziert, einmal erfolgte die Induktion mit 5 mM Trp in der exponentiellen Phase (Pfeil) und einmal wurde von Beginn an induziert. Als Kontrolle wurde der Wildtyp H26 mit dem Leervektor mitgeführt.

Bis auf die Überexpressionsmutanten der Helikasen (*HVO\_1723* & *HVO\_3010*) zeigen die Mutanten auch unter nicht-exprimierten Bedingungen bereits einen Wachstumsdefekt im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abb. 21 & Abb. 22). Bei Induktion in exponentieller Phase (Pfeil), zeigt sich ein ähnliches Bild. Beim Wachstum mit Induktion zu Beginn wächst die Überexpressionsmutante von *HVO\_1723* besser als die Kontrolle, die von *HVO\_3014* vergleichbar und die übrigen Mutanten schlechter als der Wildtyp. Besonders ausgeprägt ist der Wachstumsdefekt bei den Überexpressionsmutanten von *HVO\_3010* und *HVO\_3013*.



**Abb. 21: Wachstum der Überexpressionsmutanten der upstream-liegenden Gene**

Gezeigt sind die Wachstumskurven der Überexpressionsmutanten der upstream von *ori1*- und *ori2*-liegenden Gene. Als Kontrolle wurde das Leerplasmid pTA929 in *H. volcanii* mitgeführt (schwarze gestrichelte Linie). Das Wachstum fand in Synthetischem Medium mit Glukose (**A**), mit Induktion mit 5 mM Tryptophan in exponentieller Phase (**B** – Pfeil) und mit Induktion von Beginn an (**C**) statt. Aufgetragen sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten und ihren Standardabweichungen.



**Abb. 22: Wachstum der Überexpressionsmutanten der Helikasen**

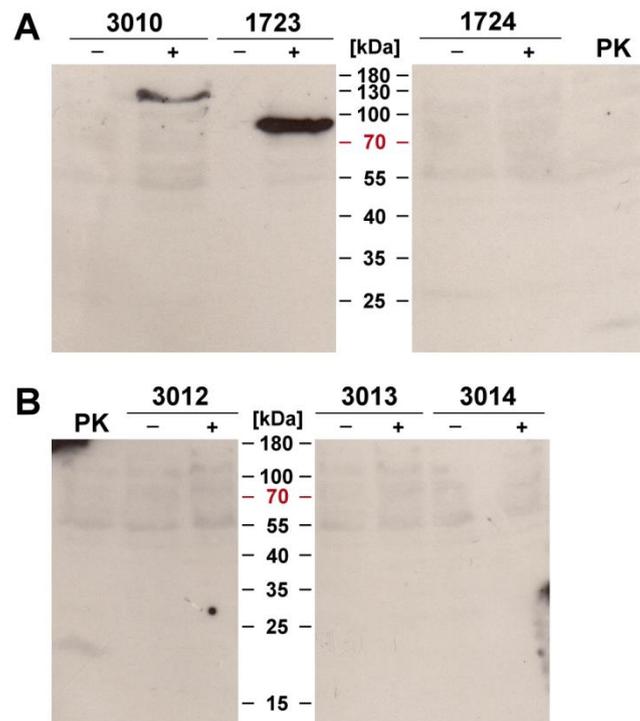
Gezeigt sind die Wachstumskurven der Überexpressionsmutanten der ori1- und ori2-nahen Helikasen. Als Kontrolle wurde das Leerplasmid pTA929 in *H. volcanii* mitgeführt (schwarze gestrichelte Linie). Das Wachstum fand in Synthetischem Medium mit Glukose (A), mit Induktion mit 5 mM Tryptophan in exponentieller Phase (B – Pfeil) und mit Induktion von Beginn an (C) statt. Aufgetragen sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten und ihren Standardabweichungen.

#### 4.2.2.2 Detektion der überexprimierten Proteine im Western-Blot

Um eine weitere Charakterisierung der Gene bzw. der Proteine und ihrem Einfluss auf die Ploidie zu ermöglichen, wurde ein Western-Blot angefertigt. Hierfür wurde Cytoplasmaextrakt aus einer exponentiellen Kultur aufgetragen. Die Überexpression wurde in Synthetischem Medium mit Glukose durchgeführt und erfolgte durch Zugabe von 5 mM Tryptophan in der exponentiellen Phase. Es wurde für 3 h inkubiert, ehe Proben für die induzierten Zellen (+) entnommen wurden. Der Antikörper war gegen den Hexahistidin-Tag gerichtet.

Für die Hef-Helikase (*HVO\_3010*) wird eine Bande mit einer Größe von 94 kDa, für die Rad25d-Helikase (*HVO\_1723*) eine Bande von 77 kDa und für das hypothetische Protein *HVO\_1724* eine Bande von 19 kDa erwartet. Für die Proteine des *oap*-Operons *OapC* (*HVO\_3012*), *OapB* (*HVO\_3013*) und *OapA* (*HVO\_3014*) werden Proteinbanden von einer Größe von 35 kDa, 14 kDa und 24 kDa erwartet. Als Positivkontrolle (PK) wurde die DHFR verwendet, deren Größe bei 18 kDa liegt.

Keine der Überexpressionsmutanten zeigt eine Proteinbande ohne Induktion (siehe Abb. 23). Die Positivkontrolle ist nur als sehr schwache Bande detektierbar. Da *H. volcaniis* Proteine aufgrund vieler Glutamat- und Aspartat-Reste stark negativ geladen sind, laufen die Proteinbanden im SDS-Gel ungefähr 20 % höher als aufgrund ihrer Größe eigentlich zu erwarten wäre. Bei der Rad25d-Helikase kann unter Berücksichtigung des langsameren Laufverhaltens eine starke Bande auf der erwarteten Höhe detektiert werden, bei der Hef-Helikase läuft die Bande allerdings höher als erwartet. Möglicherweise ist das Protein selbst für *H. volcanii* ungewöhnlich Glutamat- und Aspartat-reich oder es wird posttranslational modifiziert, was ebenfalls ein Grund für das verzögerte Laufverhalten sein könnte. Bei den anderen überexprimierten Proteinen konnten keine Banden detektiert werden nicht. Die anderen Proteine konnten auch nicht nach einer Induktion von Beginn an in dem nährstoffreicheren Hv-Cab-Medium detektiert werden (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abb. 23: Western-Blot der upstream von ori1- und ori2-kodierten Proteine**

Gezeigt ist ein Röntgenfilm nach einer Belichtungszeit von 2 h. Es wurden Cytoplasmaextrakt aufgetragen und als Positivkontrolle (PK) wurde die DHFR verwendet. (-) bezeichnet die nicht induzierten Zellen, (+) bezeichnet die mit 5 mM Tryptophan induzierten Kulturen. **(A)** Überexpression der Helikasen (3010 & 1723) und dem hypothetischen Protein (1724). **(B)** Überexpression des *oap*-Operons.

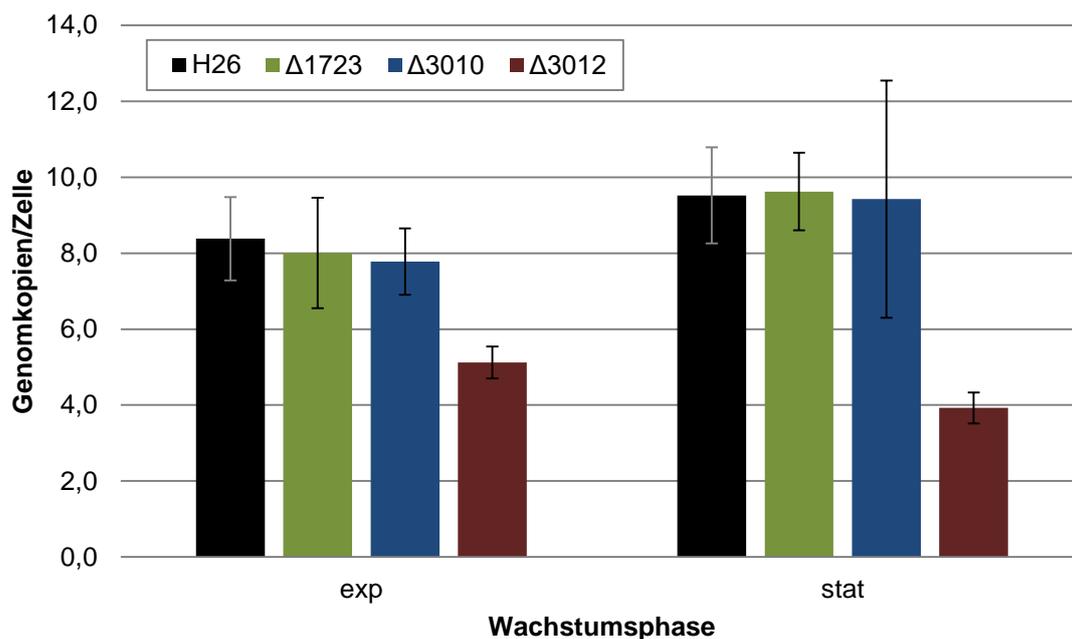
#### 4.2.3 Genomkopienzahl der Deletionsmutanten ausgewählter Gene

Drei Gene wurden für die genauere Charakterisierung ihres Einflusses auf die Genomkopienzahl ausgewählt: *HVO\_1723* und *HVO\_3010*, die für Helikasen kodieren, sowie das letzte Gen des *oap*-Operons *HVO\_3012*. Für *HVO\_3012* wurde sich entschieden, da aufgrund der Ergebnisse vorheriger Arbeiten (Maurer 2015) davon auszugehen ist, dass mindestens ein Gen des *oap*-Operons essentiell ist. Bei der Deletion von *HVO\_3013* hätte die Rekombination des Vektors in das Genom das Operon in beiden möglichen Fällen zerstört, weshalb dieses Gen nicht ausgewählt wurde. Bei *HVO\_3014* handelt es sich um das erste Gen im Operon und auch wenn eine in-frame Deletion vorgenommen wird, sind polare Effekte, die das ganze Operon beeinflussen, nicht ausgeschlossen. Aus diesem Grund wurde *HVO\_3014* ebenfalls nicht ausgewählt, sondern *HVO\_3012*, das letzte Gen des Operons, bei dem die Rekombination des Vektors ins Genom zumindest in einem Fall definitiv kein essentielles Gen trifft und somit Pop-In Mutanten generiert werden können.

Es wurden Deletionsmutanten von *HVO\_1723*, *HVO\_3010* und *HVO\_3012* angefertigt und die Genomkopienzahl in Synthetischem Medium mit Glukose als

Kohlenstoffquelle in exponentieller sowie stationärer Phase bestimmt (siehe Abb. 24).

Die Deletion der Gene *HVO\_1723* und *HVO\_3010*, die für Helikasen kodieren, hat keinen Einfluss auf die Genomkopienzahl der Zelle. Bei der Deletion des *oap*-Gens *HVO\_3012* allerdings, ist eine deutliche Reduktion des Ploidielevels zu beobachten – in der stationären Phase um die Hälfte, in der exponentiellen Phase um etwas mehr als ein Drittel.



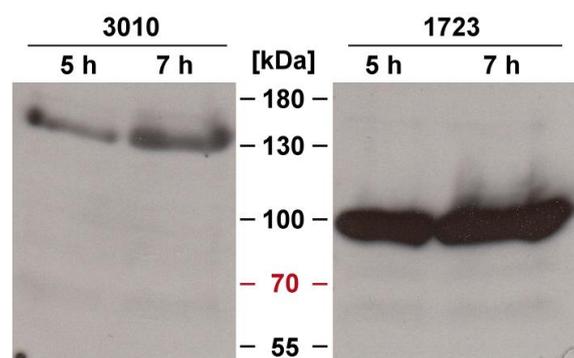
**Abb. 24: Ploidielevel der Deletionsmutanten von *ori1*- und *ori2*-nahen Genen**

Gezeigt ist die Genomkopienzahl der nach Deletion der *ori1*-nahen Helikase *HVO\_3010* und dem *oap*-Gen *HVO\_3012* sowie der *ori2*-nahen Helikase *HVO\_1723*.

#### 4.2.4 Bestimmung der Genomkopienzahl bei Überexpression der Helikasen

Um den Einfluss der Überexpression der von *HVO\_3010* und *HVO\_1723* kodierten Helikasen auf das Ploidielevel genauer untersuchen zu können, wurde die Überexpression in den entsprechenden Deletionsmutanten wiederholt, um Effekte durch das nicht Hexahistidin-getaggte Wildtyp-Protein auszuschließen. Hierfür wurden die induzierbaren Überexpressionsvektoren in die entsprechenden Deletionsmutanten transformiert. Anschließend wurde die Überexpression optimiert. Hierzu wurde die Phase der Induktion von 3 h auf 5 h und 7 h verlängert und anschließend ein Western-Blot angefertigt. Es wurde Cytoplasmaextrakt aufgetragen und der Antikörper war gegen den Hexahistidin-Tag gerichtet (siehe Abb. 25).

Für die Hef-Helikase (*HVO\_3010*) wurde eine Proteinbande bei einer Größe von 94 kDa, für die Rad25d-Helikase (*HVO\_1723*) eine Bande auf Höhe von 77 kDa erwartet. Da *H. volcaniis* Proteine aufgrund vieler Glutamat- und Aspartat-Reste stark negativ geladen sind, laufen die Proteinbanden im SDS-Gel ungefähr 20 % höher als aufgrund ihrer Größe eigentlich zu erwarten wäre. Für beide Proteine konnte eine deutliche Bande sowohl bei 5 h als auch bei 7 h Induktion detektiert werden. Die Bande der Hef-Helikase wurde wieder (wie auch schon in 4.2.2.2) höher als erwartet detektiert. Mögliche Ursachen hierfür sind ein noch höherer Aspartat- und Glutamat-Anteil oder posttranslationale Modifikationen. Die für die Rad25d-Helikase detektierte Bande entspricht den Erwartungen. Da die beobachtete Bande bei 7 h bei beiden Proteinen stärker war, wurde 7 h als Induktionszeit für die Untersuchung des Einflusses der Helikasen auf die Genomkopienzahl ausgewählt.

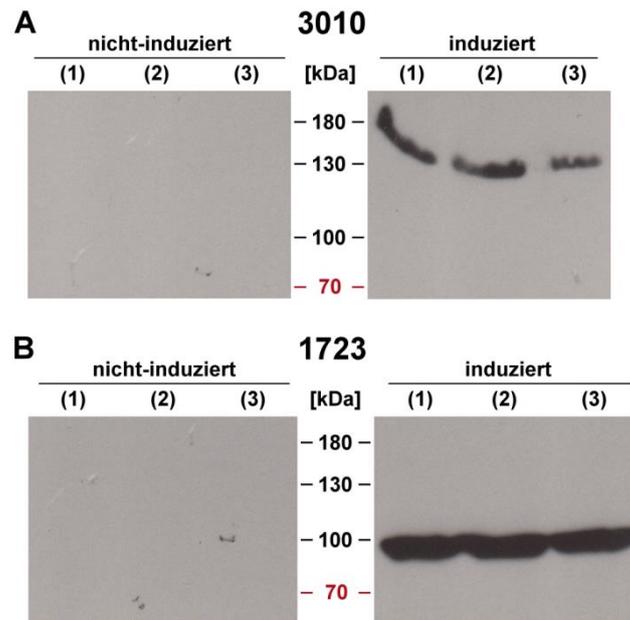


**Abb. 25: Optimierung der Überexpression der *ori1*- und *ori2*-nahen Helikasen**

Gezeigt ist ein Röntgenfilm nach einer Belichtungszeit von 2 h. Es wurde Cytoplasmaextrakt aufgetragen. Die Überexpression von *HVO\_3010* und *HVO\_1723* erfolgte in Synthetischem Medium mit Glukose. Es wurde mit 5 mM Tryptophan für 5 h oder 7 h induziert.

Für die Untersuchung des Einflusses der Helikasen auf das Ploidielevel wurden drei biologische Replikate in Synthetischem Medium mit Glukose angezogen. In exponentieller Phase wurden für einen Western-Blot (siehe Abb. 26) sowie eine qPCR-Analyse Proben als Kontrolle genommen (siehe Abb. 27), dann wurde mit 5 mM Tryptophan für 7 h induziert. Anschließend wurden von den Kulturen nochmals Zellen für eine Untersuchung mittels Western-Blot und qPCR-Analyse entnommen.

Bei den nicht-induzierten Kulturen konnte kein Protein detektiert werden (siehe Abb. 26). Bei den induzierten Kulturen konnte eine Proteinbande auf der erwarteten Höhe detektiert werden.

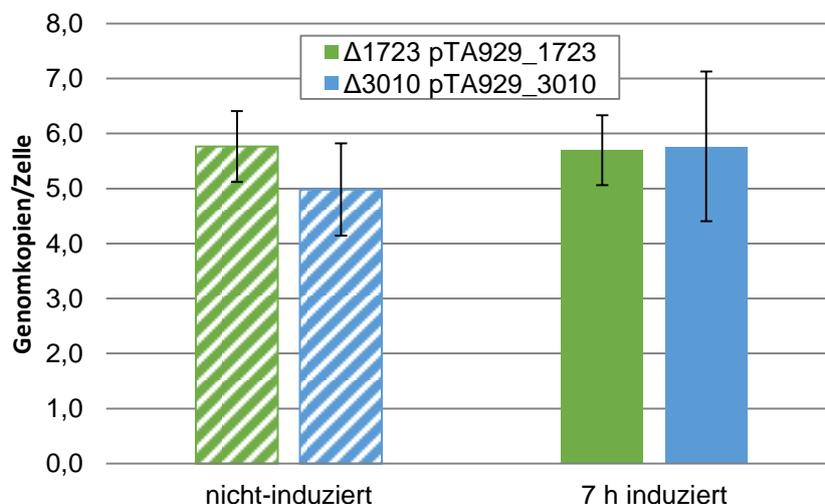


**Abb. 26: Western-Blot der Überexpression der ori1- und ori2-nahen Helikasen**

Gezeigt ist ein Röntgenfilm nach einer Belichtungszeit von 2 h. Es wurde Cytoplasmaextrakt aufgetragen. Die Überexpression von *HVO\_3010* und *HVO\_1723* erfolgte für 7 h in Synthetischem Medium mit Glukose. Als Kontrolle wurden nicht-induzierte Kulturen aufgetragen.

Mit Zellen derselben Kulturen wurde eine qPCR-Analyse zur Bestimmung der Genomkopienzahl pro Zelle durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt (siehe Abb. 27).

Die Ergebnisse zeigen keinen Unterschied der Genomkopienzahl pro Zelle zwischen der nicht-induzierten Kontrolle und nach 7-stündiger Überexpression der Helikasen.



**Abb. 27: Veränderung des Ploidielevels bei Überexpression der Helikasen**

Gezeigt ist die Genomkopienzahl bei der Überexpression der Hef-Helikase (*HVO\_3010*) und Rad25d-Helikase (*HVO\_1723*) im Vergleich zur nicht-induzierten Kontrolle. Aufgetragen sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten und ihren Standardabweichungen.

### 4.3 Untersuchung der Genkonversion in *Haloferax volcanii*

Als Genkonversion wird das nicht-reziproke Übertragen von Erbinformation zwischen homologen DNA-Sequenzen bezeichnet. *H. volcanii* ist ein polyploider Organismus, d. h. Wildtyp-Zellen enthalten in exponentieller Phase bis zu 20, in stationärer Phase bis zu 10 Genomkopien. Lange und Kollegen (2011) konnten zeigen, dass *H. volcanii* in der Lage ist, Genkonversion zwischen den Kopien seines Genoms zu betreiben und so die einzelnen Kopien aneinander anzupassen. Um den Ablauf der Genkonversion genauer untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit eine Methode etabliert, um Genkonversion farblich sichtbar zu machen. Hierfür wurden zwei verschiedene, weiße Elternstämme verschmolzen, um eine heterozygote Tochterzelle zu generieren, die bei erfolgreicher Genkonversion zwischen den verschiedenen Genomkopien der Eltern ein Gen der Carotinoidbiosynthese reparieren und dadurch rot werden konnte (detaillierter experimenteller Aufbau unter 4.3.4).

#### 4.3.1 Auswahl und Generierung der auxotrophen Deletionsmutanten

Für das Experiment wurden zwei auxotrophe, farblose Stämme benötigt. Als erster Stamm wurde H53, ein Tryptophan-auxotropher Stamm, ausgewählt, der von der Gruppe von Thorsten Allers generiert wurde (Allers *et al.* 2004) und nach Supplementation ein besseres Wachstum als der Wildtyp zeigt (Jantzer *et al.* 2011). Bei diesem Stamm wurde das Gen *HVO\_0789* (*trpA*) deletiert, das für die  $\beta$ -Untereinheit der Tryptophan-Synthase kodiert, die die Umwandlung von (3-indoyl)-Glycerinphosphat zu L-Tryptophan katalysiert.

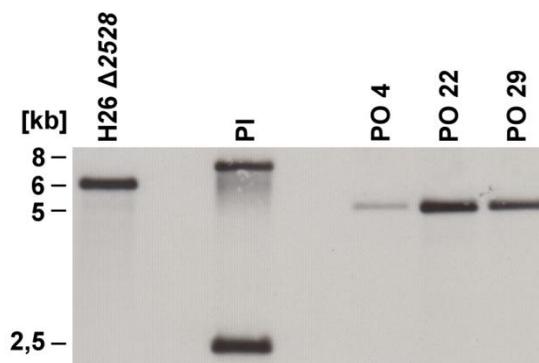
Da keine weitere Mutante gefunden werden konnte, die annähernd dieselbe Wachstumsrate und End-OD<sub>600</sub> wie der Wildtyp H26 zeigte, wurde in dieser Arbeit eine weitere Mutante generiert. Hierfür wurde das Gen *HVO\_2918* (*thyA*) deletiert, das für die Thymidylat-Synthase kodiert, die die Synthese von Desoxyuridinmonophosphat zu Desoxythymidinmonophosphat katalysiert und somit an der Synthese der DNA-Base dTTP beteiligt ist. Hierfür wurde die Pop-In/Pop-Out-Methode, wie unter 3.3.2 beschrieben und unter 4.1.1 exemplarisch dargestellt, verwendet.

Im Folgenden abgebildet, sind die erwarteten Fragmentgrößen beim Southern-Blot nach Verdau mit *SacI* (siehe Tab. 43).

**Tab. 43: Erwartete Fragmentgrößen für den Southern-Blot von *HVO\_2918* (*thyA*)**

Wildtyp	Pop-In 1	Pop-In 2	Deletionsmutante
5838 bp	7089 bp & 3280 bp	8019 bp & 1487 bp	4908 bp

Der Southern-Blot zeigt die erfolgreiche Deletion von *HVO\_2918* im weißen Wildtyp H26  $\Delta 2528$  (siehe Abb. 28). Beim Wildtyp H26  $\Delta 2528$  konnte die erwartete Bande einer Größe von 5838 bp detektiert werden und bei allen drei untersuchten Pop-Outs handelt es sich um die gewünschte Deletionsmutante. Bei der Pop-In-Mutante konnte zuerst nicht bestimmt werden, um welches Pop-In es sich handelt. Bei genauerer Betrachtung der genomischen Sequenz scheint es allerdings, als wäre eine Schnittstelle in der MCS des Plasmids nicht geschnitten worden. Beim Wegfallen dieser Schnittstelle werden für Pop-In 2 zwei Fragmente mit den Größen 8019 bp und 2350 bp erwartet, was mit den detektierten Banden im Southern-Blot übereinstimmt. Bei der Pop-In-Mutante handelt es sich also um Pop-In 2, d. h. dass der Vektor über das F2-Fragment in die genomische DNA integriert wurde.

**Abb. 28: Southern-Blot von *HVO\_2918* (*thyA*)**

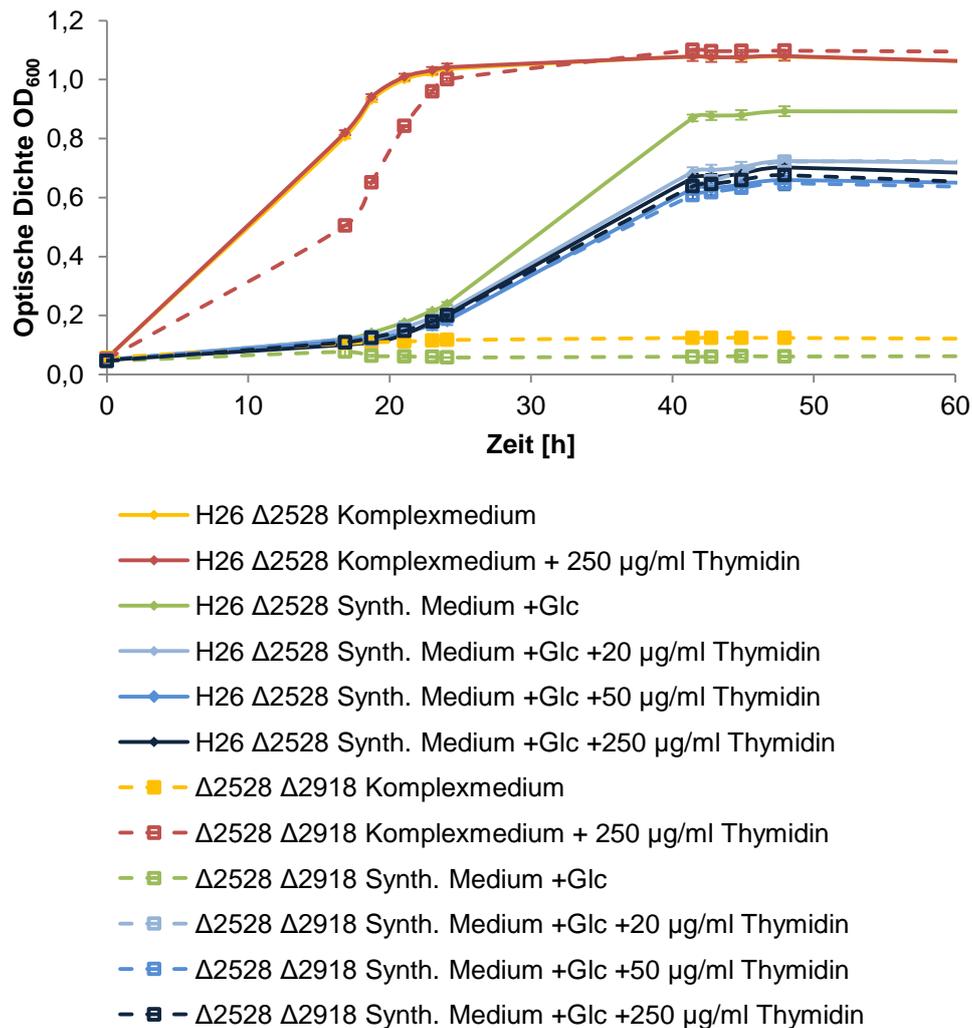
Gezeigt ist ein Röntgenfilm nach 1 Minute Belichtung. Der Verdau der genomischen DNA erfolgte mit *SacI*. H26  $\Delta 2528$ , der hier als Wildtyp verwendet wurde, zeigt die erwartete Bandengröße von 5838 bp. Das Bandenmuster der Pop-In-Mutante (PI) konnte nicht eindeutig Pop-In 1 oder Pop-In 2 zugeordnet werden. Bei der Pop-Out-Mutanten (PO) 4, 22 & 29 konnte nur die Deletionsbande von 4908 bp detektiert werden.

#### 4.3.2 Wachstum von $\Delta 2528 \Delta 2918$

Um die Thymin-Auxotrophie zu bestätigen und die optimale Supplementationskonzentration zu ermitteln, wurde ein Mikrotiterplattenwachstumstest durchgeführt. Es wurde mit Thymidin supplementiert, das eine Vorstufe von Desoxythymidinmonophosphat ist, wodurch eine Synthese von dTTP wieder möglich ist.

Der Wachstumstest wurde in Komplexmedium, sowie in Synthetischem Medium mit Glukose durchgeführt. Supplementiert wurde mit Thymidin in einer Endkonzentration von 20 µg/ml, 50 µg/ml und 250 µg/ml.

Die Mutante  $\Delta 2528 \Delta 2918$  zeigt kein bzw. kaum Wachstum in unsupplementiertem Medium, sowohl in Synthetischem Medium mit Glukose als auch in Komplexmedium – sie ist also in der Tat Thymin-auxotroph (siehe Abb. 29). Bei Supplementation mit verschiedenen Konzentrationen von Thymidin zeigt sie in Synthetischem Medium mit Glukose vergleichbares Wachstum und erreicht eine ähnliche Zelldichte wie der Wildtyp. In Komplexmedium wächst sie etwas langsamer, erreicht aber die gleiche Zelldichte. Die höchste Zelldichte wird bei einer Supplementation von 20 µg/ml Thymidin erreicht, weshalb diese Konzentration für die Supplementation in den folgenden Experimenten ausgewählt wurde.

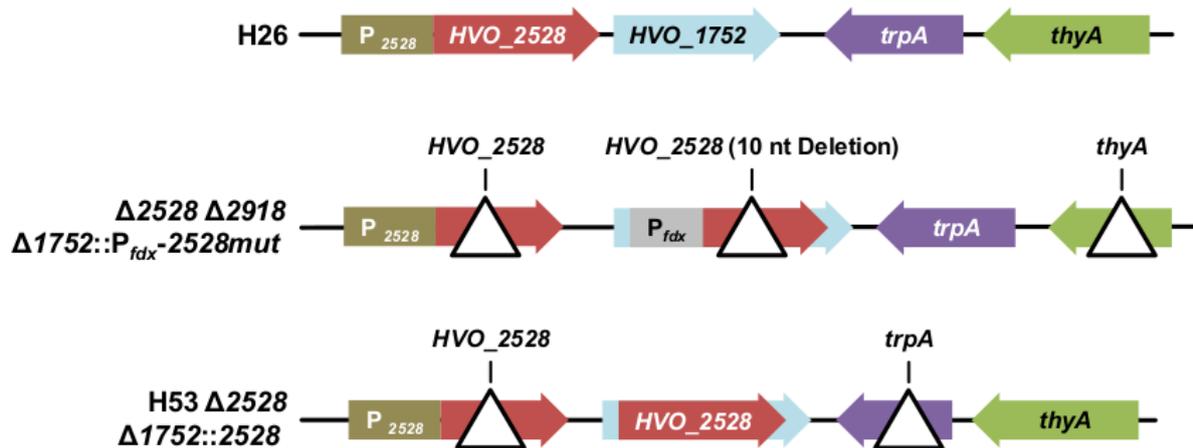


#### Abb. 29: Wachstum von $\Delta 2528 \Delta 2918$

Gezeigt sind die Wachstumskurven der Thymin-auxotrophen Mutante  $\Delta 2528 \Delta 2918$  im Vergleich zum Wildtyp H26  $\Delta 2528$  in Komplexmedium und Synthetischem Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle. Es wurde mit verschiedenen Thymidinmengen supplementiert, um die optimale Konzentration zu ermitteln. Aufgetragen sind die Durchschnittswerte von drei unabhängigen biologischen Replikaten und ihren Standardabweichungen.

#### 4.3.3 Generierung der Mutanten für die Untersuchung der Genkonversion

Mithilfe der Pop-In/Pop-Out-Methode wurden die beiden Mutanten für das Genkonversionsexperiment konstruiert (siehe 3.3.2). Die genomischen Besonderheiten der generierten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp sind im Folgenden schematisch dargestellt (siehe Abb. 30).



**Abb. 30: Genomische Besonderheiten der Genkonversionsstämme**

Als erstes ist der Wildtyp H26 abgebildet. Bei den Mutanten wurde zuerst *HVO\_2528* in-frame deletiert ( $\Delta$ ), wodurch die Zellen ihre charakteristische rote Färbung verloren und weiß wurden. Die Mutante  $\Delta 2528 \Delta 2918 \Delta 1752::P_{fdx}-2528mut$  ist Thymin-auxotroph, da das Gen *thyA* in-frame deletiert wurde ( $\Delta$ ). Darüber hinaus wurde das nicht-essentielle Gen *HVO\_1752* durch den konstitutiven, nicht-nativen  $P_{fdx}$ -Promotor mit *HVO\_2528* ersetzt, jedoch befindet sich im ORF des Gens eine 10 nt Deletion ( $\Delta$ ). Die Mutante H53  $\Delta 2528 \Delta 1752::2528$  ist Tryptophan-auxotroph, da das Gen *trpA* in-frame deletiert wurde ( $\Delta$ ). Außerdem wurde das nicht-essentielle Gen *HVO\_1752* durch das intakte Gen *HVO\_2528* ohne Promotor ersetzt.

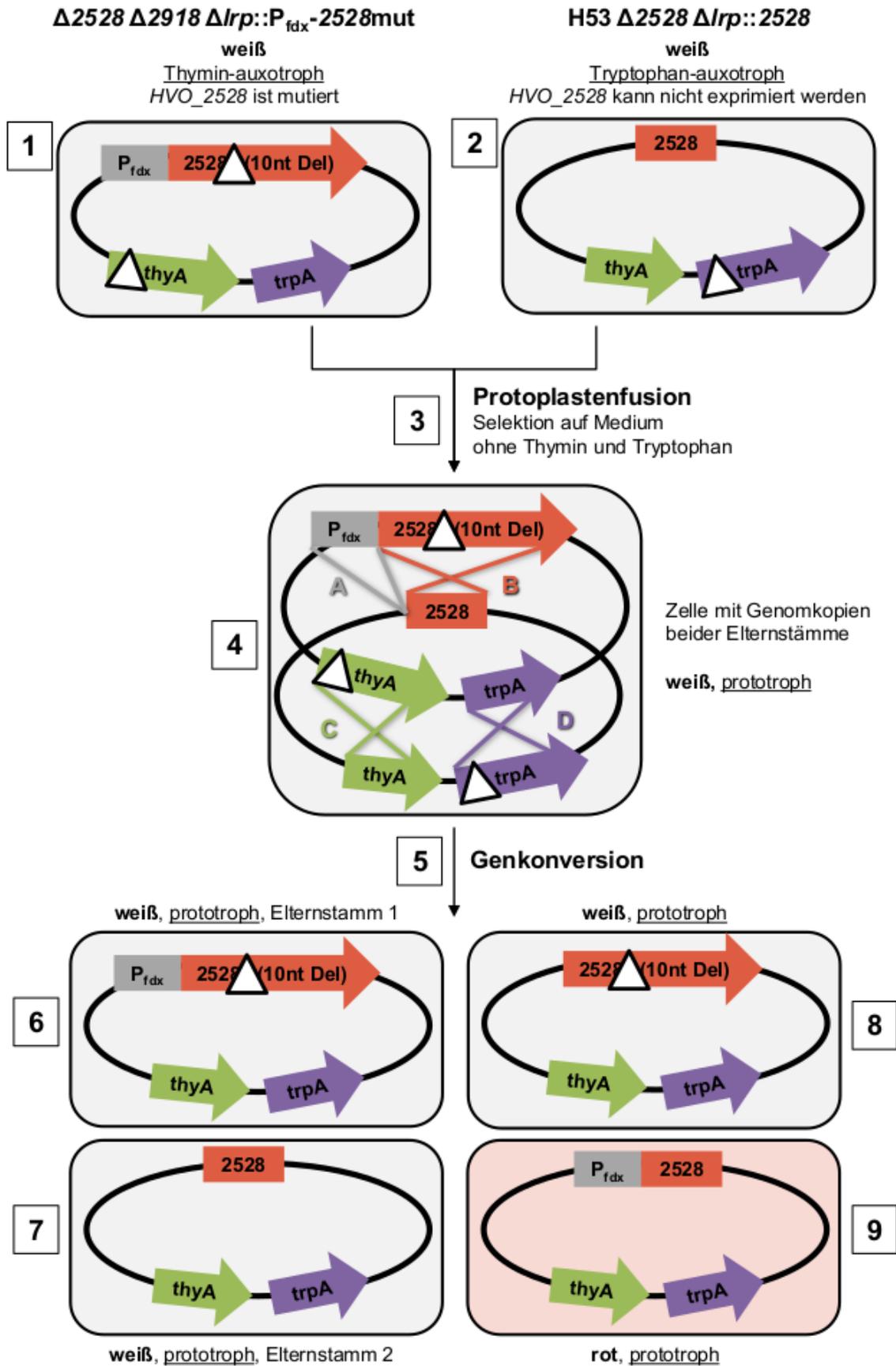
Durch die in-frame Deletion des kompletten Gens *HVO\_2528*, das für die Phytoen-Desaturase kodiert, wurde die Carotinoidbiosynthese unterbrochen und dadurch Zellen generiert, die ihre charakteristische rote Färbung verloren hatten und stattdessen weiß erschienen.

In dem zuvor generierten weißen, Thymin-auxotrophen Stamm H26  $\Delta 2528 \Delta 2918$  wurde das nicht-essentielle Gen *HVO\_1752* durch den  $P_{fdx}$ -Promotor mit dem Gen *HVO\_2528* ersetzt. Allerdings enthielt das Gen eine 10 nt Deletion im ORF, wodurch kein funktionales Enzym synthetisiert werden konnte und die Zellen weiterhin weiß blieben.

Im weißen, Tryptophan-auxotrophen Stamm H53  $\Delta 2528$  wurde dasselbe nicht-essentielle Gen *HVO\_1752* durch das intakte *HVO\_2528* ersetzt. Allerdings befand sich upstream von *HVO\_2528* kein Promotor, sodass das Gen nicht transkribiert werden konnte und die Zellen ebenfalls weiß blieben.

#### 4.3.4 Experimenteller Aufbau zur Untersuchung der Genkonversion

Der experimentelle Versuchsaufbau zur Untersuchung der Genkonversion ist in der folgenden Abbildung dargestellt (siehe Abb. 31).



**Abb. 31: Experimenteller Versuchsaufbau des Genkonversionsexperiments**

Schematische Darstellung der genomischen Organisation der Elternstämme, der Tochterzelle mit Genomen beider Elternstämme und der Zellen nach der Genkonversion. Für eine genaue Erklärung siehe den folgenden Text.

Zur Untersuchung der Genkonversion wurden zwei auxotrophe Stämme verwendet, die durch eine in-frame Deletion des kompletten Gens *HVO\_2528* ihre charakteristische rote Farbe verloren hatten. In den Thymin-auxotrophen Stamm wurde das mutierte Gen *HVO\_2528* mit Promotor eingebracht (siehe Abb. 31 [1]), in den Tryptophan-auxotrophen Stamm das intakte Gen *HVO\_2528*, allerdings ohne Promotor (siehe Abb. 31 [2]). Beide Stämme konnte kein funktionales Protein bilden, weshalb sie weiß blieben. Für eine detaillierte Beschreibung der Herstellung der Mutanten, siehe 4.3.3. Die beiden Elternstämme werden mittels Protoplastenfusion verschmolzen (siehe Abb. 31 [3]), sodass eine Tochterzelle entsteht, die Genomkopien beider Elternteile enthält und somit prototroph sowohl für Thymin als auch Tryptophan ist (siehe Abb. 31 [4]). Zwischen den homologen Bereichen der elterlichen Genomkopien kann daraufhin Genkonversion stattfinden (siehe Abb. 31 [5]). Rekombinationsereignisse, die eine genomische Reorganisation zur Folge haben, können im Bereich des  $P_{fdx}$ -Promotors (siehe Abb. 31 (A)), im ORF von *HVO\_2528* (siehe Abb. 31 (B)) und im Bereich der Auxotrophie/Prototrophie-Gene *thyA* (siehe Abb. 31 (C)) und *trpA* stattfinden (siehe Abb. 31 (D)). Je nachdem, welche Richtung der Genkonversion sich durchsetzt, können vier verschiedene homozygote Zellen, aber auch eine Vielzahl von Zellen mit verschiedenen heterozygoten Loci entstehen (der Übersicht halber in der Abbildung nicht dargestellt, Beschreibung siehe weiter unten). Im Falle der homozygoten Zellen, kann sich bei der Genkonversion der  $P_{fdx}$ -Promotor mit dem mutierten ORF von *HVO\_2528* durchsetzen; es entsteht eine prototrophe Version von Elternstamm 1 – die Zelle bleibt weiß (siehe Abb. 31 [6]). Wenn sich bei der Genkonversion das intakte *HVO\_2528* durchsetzt, entsteht eine prototrophe Version von Elternstamm 2 – die Zelle bleibt ebenfalls weiß (siehe Abb. 31 [7]). Als dritte Option wird, anstatt das ORF von *HVO\_2528* zu reparieren, die 10 nt Deletion in das intakte *HVO\_2528* eingefügt und dieses ORF dadurch zerstört – auch diese Zelle bleibt weiß (siehe Abb. 31 [8]). Als letzte Möglichkeit wird das intakte *HVO\_2528* als Vorlage verwendet und damit die 10 nt Deletion im mutierten ORF repariert oder der  $P_{fdx}$ -Promotor vor das intakte *HVO\_2528* rekombiniert (siehe Abb. 31 [9]). Dadurch befindet sich ein intaktes *HVO\_2528* downstream des Promotors, wodurch die Expression eines funktionalen Proteins möglich ist und die Carotinoidbiosynthese wieder ablaufen kann - die Zellen werden rot. Im Laufe des Wachstums einer Kolonie, ist das Genkonversionereignis durch das Herauswachsen eines roten Keils sichtbar, da alle

Tochterzellen dieser ersten, roten Zelle auch rot sein werden. Neben den beschriebenen homozygoten Zellen, ist eine Vielzahl verschiedener heterozygoter Zellen denkbar. Für die Loci der auxotrophen/prototrophen Gene konnte zum Beispiel bereits gezeigt werden, dass wenige intakte Kopie ausreichen, um Wachstum zu ermöglichen, sodass in diesen Fällen eventuell keine Genkonversion stattfindet oder sich größtenteils auch die Deletion durchsetzen könnte. Auch ist unklar, ob möglicherweise bereits eine Kopie von Promotor mit funktionalem *HVO\_2528* ausreicht, um rote Zellen zu generieren; die anderen Genomkopien könnten dann weiterhin das *HVO\_2528* ohne Promotor sowie das zerstörte *HVO\_2528* mit Promotor aufweisen. Zellen, die heterozygot für alle vier Loci sind, sind dementsprechend durchaus möglich, genauso sind Zellen mit einem, zwei oder drei heterozygoten Loci denkbar.

#### 4.3.5 Optimierung der Protoplastenfusion

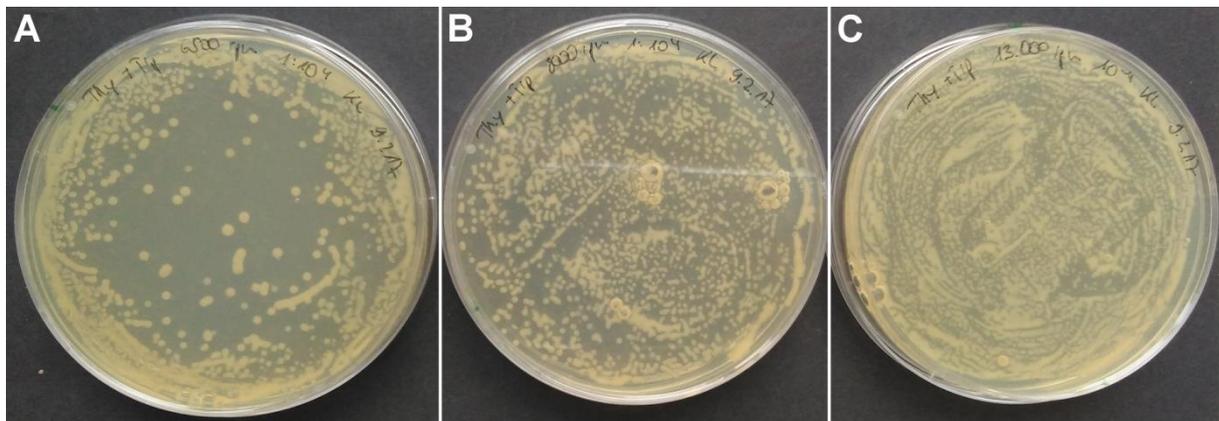
Um die beiden Elternstämme zu verschmelzen und eine heterozygote Tochterzelle zu generieren, wurde die Protoplastenfusion verwendet, die nach Tchelet und Mevarech (1993) durchgeführt wurde. Das Prinzip der Protoplastenfusion beruht darauf, dass die Zellen zuerst durch Entzug von Magnesium durch Inkubation in 1 M NaCl zu Protoplasten gemacht werden, die dann in physischen Kontakt gebracht werden, um eine Fusion zu ermöglichen. Für das Genkonversionsexperiment wurde die Methode speziell angepasst, was im Folgenden beschrieben wird. Für einen Überblick über die Methode siehe 3.3.11.

Das Paper gibt an, nach dem Ernten der Zellen zwei Mal mit SMT-Lösung zu waschen, ehe die Zellen in 1 M NaCl inkubiert wurden. Die SMT-Lösung enthält mit 3,5 M NaCl eine noch höhere Salzkonzentration als das Medium (2,1 M NaCl), weshalb sich die Logik diese Wachsschritte vor dem Herabsenken auf 1 M NaCl nicht erschloss und dieser Schritt weggelassen wurde. Die Zellen waren nach einer 10-minütigen Inkubation in 1 M NaCl auch ohne vorheriges Waschen mit SMT-Lösung bei mikroskopischer Kontrolle alle Protoplasten (Ergebnisse nicht gezeigt).

Als nächstes wurde der Zentrifugationsschritt nach dem Mischen der Elternstämme optimiert, da die Tryptophan-auxotrophe Mutante H53  $\Delta 2528 \Delta 1752::2528$  bei den angegebenen 6.500 rpm kein festes Pellet bildete, und somit nicht als Kontrolle mitgeführt werden konnte. Darüber hinaus war das Pellet mit den gemischten Elternstämmen H53  $\Delta 2528 \Delta 1752::2528$  und  $\Delta 2528 \Delta 2918 \Delta 1752::P_{fdx^-}$

2528mut sehr weich, wodurch der Überstand nur sehr schwer abgenommen werden konnte. Deshalb wurde die Zentrifugationsgeschwindigkeit auf 8.000 und 13.000 rpm erhöht und die Protoplasten danach auf Komplexmedium ausgestrichen, um ihre Überlebensrate zu analysieren (siehe Abb. 32).

Anhand der bewachsenen Agarplatten ist erkennbar, dass mit steigender Zentrifugationsgeschwindigkeit die Anzahl an Kolonien wächst. Die Protoplasten widerstehen trotz ihrer fehlenden Zellwand den  $g$ -Kräften. Deshalb wurde für das Genkonversionsexperiment nach dem Mischen der Elternstämme eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 13.000 rpm gewählt, da zum Einen die Zellpellets fest genug waren, um weiter damit zu arbeiten und zum Anderen mehr Protoplasten für die spätere Fusion sedimentiert werden konnten.



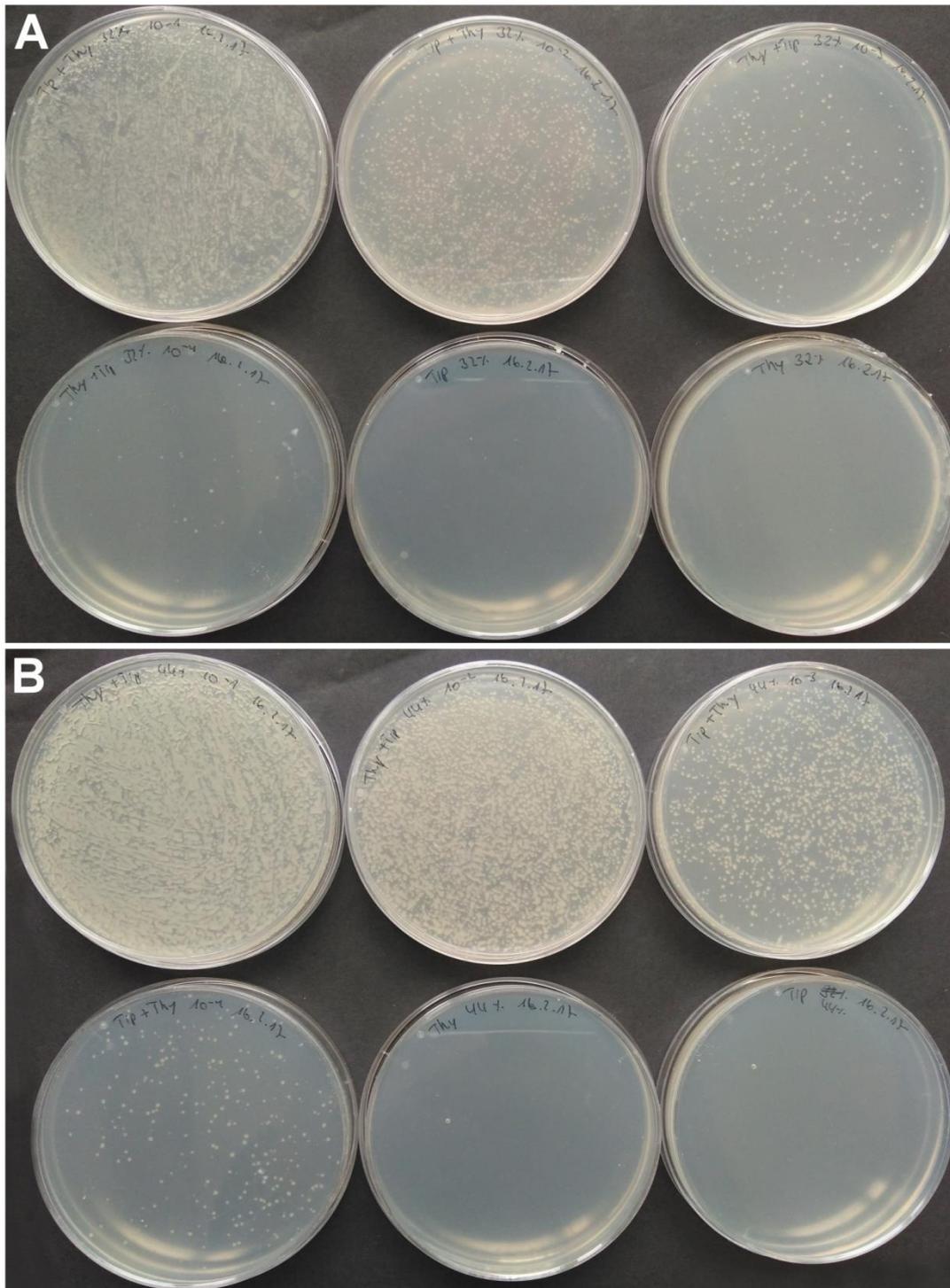
**Abb. 32: Optimierung des Zentrifugationsschritts nach Mischen der Elternstämme**

Die Protoplasten der Elternstämme wurden zusammengeführt und anschließend bei 6.500 rpm (A), 8.000 rpm (B) oder 13.000 rpm (C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in Basalsalz resuspendiert und auf Komplexmedium ausgestrichen. Gezeigt sind die  $10^{-4}$  Verdünnungen nach 4 Tagen Inkubation bei 42 °C.

Als nächstes wurde die PEG-600-Konzentration optimiert, da das Paper keine genauen Angaben zur PEG-600-Menge in der PEG-600-SMT-Lösung macht. Da zu viel PEG-600 den Zellen schadet und den folgenden Zentrifugationsschritt erschwert, wurde die eingesetzte PEG-600-Menge bei der Transformation von *Haloferax volcanii* (44 % (v/v)) und eine niedrigere Konzentration getestet (32 % (v/v)). Das Protoplastenfusionsprotokoll wurde zu Ende durchgeführt und die Zellen auf nicht supplementiertem Synthetischem Medium mit Glukose ausgestrichen, um die Effizienz der Protoplastenfusion beurteilen zu können (siehe Abb. 33).

Beide getesteten PEG-600-Konzentrationen ermöglichen eine Protoplastenfusion. Anhand der  $10^{-4}$ -Verdünnung ist jedoch ersichtlich, dass die Effizienz der Protoplastenfusion bei 44 % höher ist als bei 32 %, weshalb diese Konzentration

ausgewählt wurde. Bei beiden Konzentrationen sind auf den Kontrollplatten (siehe Abb. 33A & B: Platten unten mitte und unten rechts), bei denen die Elternstämme einzeln mitgeführt wurden, keine Klone zu sehen.



**Abb. 33: Optimierung der PEG-600-Konzentration bei der Protoplastenfusion**

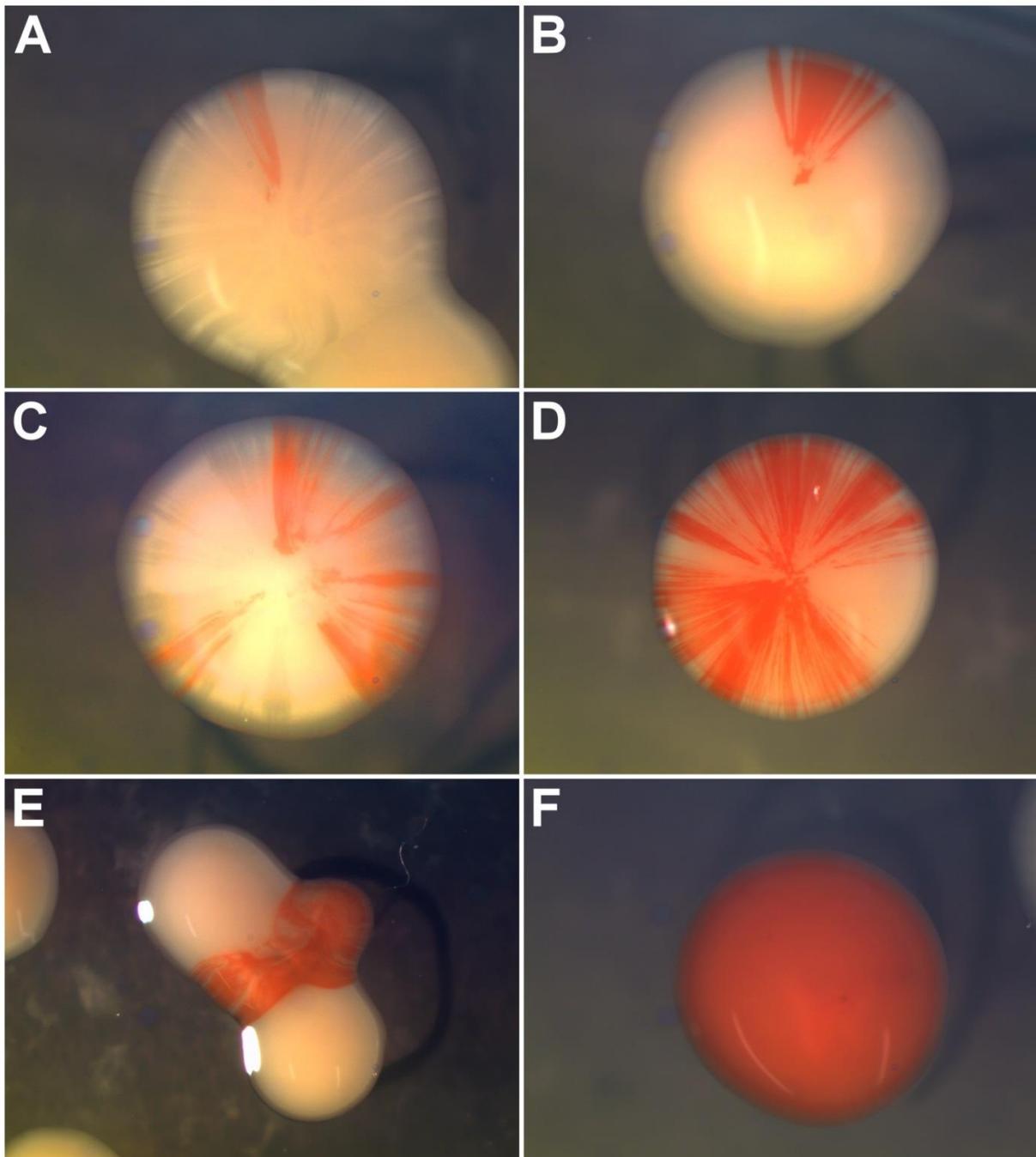
Die gemischten Protoplasten der Elternstämme wurden für 10 Minuten entweder in einer 32 %-igen (A) oder 44 %-igen PEG-600-SMT-Lösung (B) inkubiert und auf Synthetischem Medium mit Glukose ausgestrichen, um die Protoplastenfusionseffizienz beurteilen zu können. Abgebildet sind die Verdünnungen  $10^{-1}$  -  $10^{-4}$  sowie die beiden Kontrollen, wo die Elternstämme einzeln mitgeführt worden sind.

Um zu überprüfen, ob die 6.500 rpm des nachfolgenden Zentrifugationsschritt ausreichen, um die Protoplasten zu sedimentieren, wurde der Überstand mikroskopisch untersucht. Bei beiden PEG-600-Konzentrationen war der Überstand zellfrei, weshalb mit dieser Zentrifugationsgeschwindigkeit weiter gearbeitet wurde (Ergebnisse nicht gezeigt).

Als letzte Anpassung wurde der Inkubationsschritt in Medium für 24 h am Ende des Protokolls weggelassen, da die Möglichkeit bestand, dass nach diesen 24 h die Genkonversion schon komplett abgelaufen war und die dann ausgestrichenen Kolonien bereits alle rot sein würden. Aus diesem Grund wurden die Protoplasten in Basalzsatz mit 15 % (w/v) Saccharose zur Stabilisierung der Protoplasten resuspendiert und direkt ausgestrichen.

#### **4.3.6 Ergebnisse der Protoplastenfusion**

Insgesamt wurden nach der Protoplastenfusion 8525 Klone betrachtet. 12 davon zeigten sich zum Teil oder vollständig rot, das sind 0,14 % der Klone. Im Folgenden ist eine Auswahl an Kolonien gezeigt mit verschiedenen Ausprägungen des roten Keils, der nach einer erfolgreichen Genkonversion entsteht, bei dem entweder der Promotor vor das intakte *HVO\_2528* rekombiniert oder die 10 nt Deletion im ORF von *HVO\_2528* repariert wurde, sodass die Carotinoidbiosynthese wieder ablaufen kann (siehe Abb. 34).

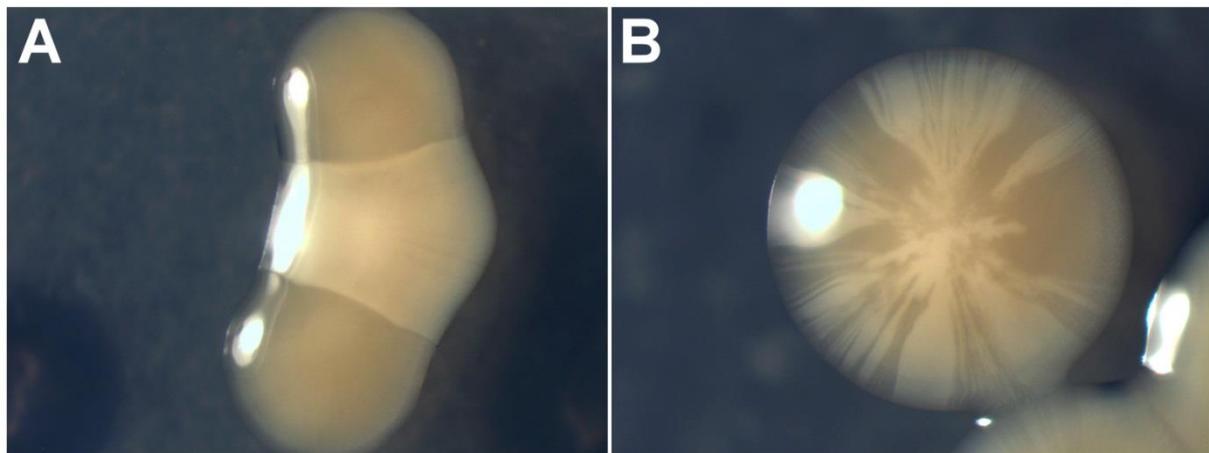
**Abb. 34: Rote Klone durch Genkonversion**

Gezeigt sind verschiedene Ausprägungen des roten Keils nach erfolgreicher Genkonversion (**A – E**) oder auch eine komplett rote Kolonie (**F**), wenn das Genkonversionsereignis sehr früh im Wachstum der Kolonie stattfand.

Die Abbildung zeigt weiße Kolonien mit weniger (siehe Abb. 34A) oder mehr (siehe Abb. 34D) roten Keilen. Je weiter die Spitze des Keils von der Mitte der Kolonie entfernt ist, desto später fand das Genkonversionsereignis statt, das zur Rekombination des Promotors vor *HVO\_2528* oder zur Reparatur des Gens und somit zur roten Färbung führte. Bei der vollständig roten Kolonie (siehe Abb. 34F) fand das Rekombinationsereignis sehr früh im Wachstum der Kolonie statt, weshalb

keine weißen Zellen mehr erkennbar sind. Auffällig ist auch, dass die roten Keile nicht homogen, sondern ihrerseits von weißen Keilen durchzogen sind, so als wären bei eigentlich roten Zellen noch Genomkopien mit dem nicht-exprimierbaren oder zerstörten *HVO\_2528* vorhanden, die sich durch erneute Genkonversionsereignisse wieder durchsetzen, wodurch die Zelle wieder weiß wurde.

Auch bei den weißen Kolonien konnten Unterschiede in der Färbung festgestellt werden. Manche Kolonien zeigten eine hellere Färbung als andere (siehe Abb. 35A), während manche Kolonien eine Mischung aus beiden Farben aufwiesen (siehe Abb. 35B). Kolonien der Elternstämme wiesen diese Unterschiede in der Färbung nicht auf – sie waren alle homogen (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abb. 35: Weiße Klone nach der Protoplastenfusion**

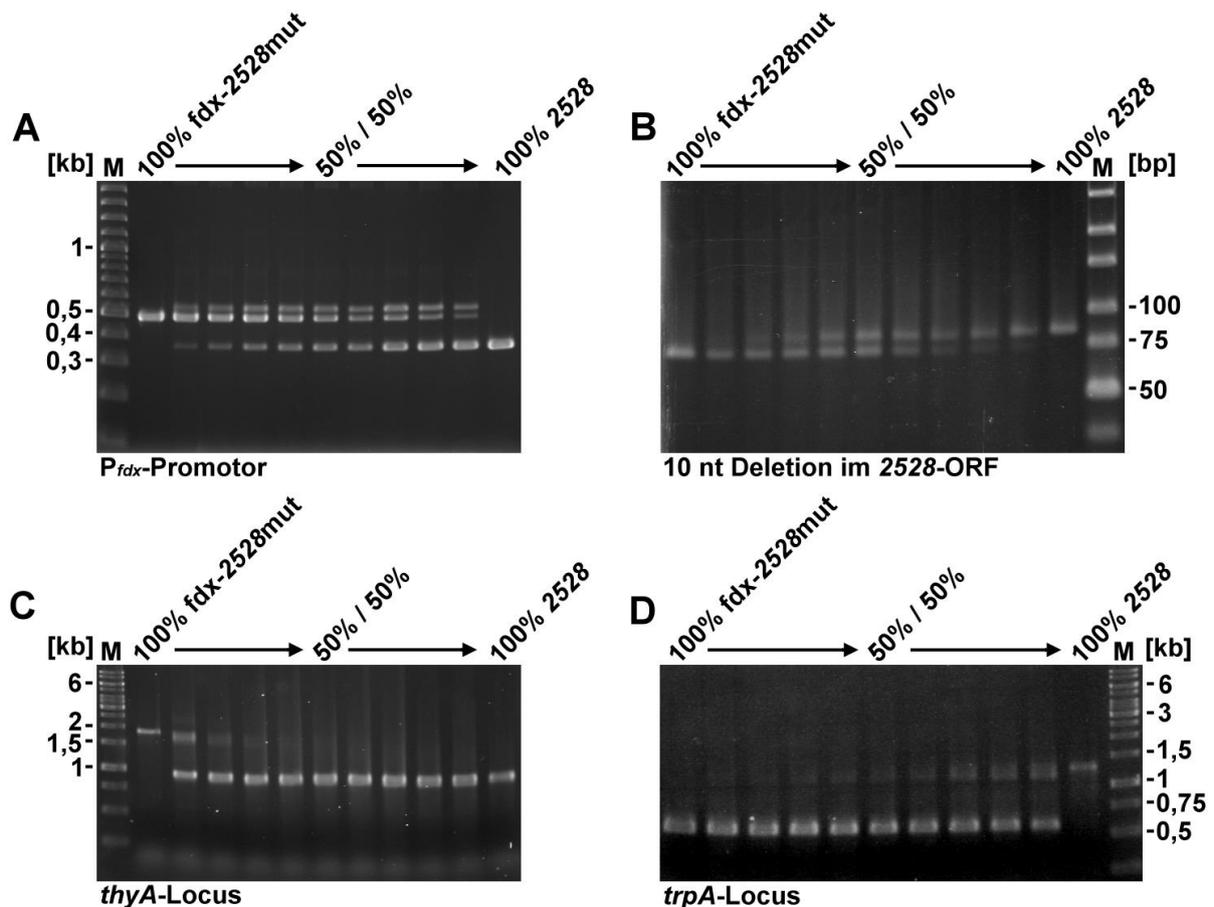
Gezeigt sind die verschiedenen Farbstufen der unterschiedlichen weißen Klone (A) oder innerhalb eines Klons (B) nach der Protoplastenfusion.

#### 4.3.6.1 Optimierung der PCR für die Einzelklonanalyse

Um die Genkonversion auf genetischer Ebene genauer zu untersuchen und herauszufinden, ob bei den weißen Klonen keine Genkonversion stattfand oder etwas anderes passiert ist, wurden PCRs für vier verschiedene Loci optimiert. Einmal die nicht selektierten Bereiche des  $P_{fdx}$ -Promotors und der 10 nt Deletion im *HVO\_2528*-ORF und einmal die selektierten Bereiche der Auxotrophie/Prototrophie-Gene *trpA* (Tryptophan) und *thyA* (Thymin).

Hierfür wurde die DNA der Elternstämme in verschiedenen Verhältnissen geschmischt. Begonnen wurde mit 100 % des Elternstamms  $\Delta 2528 \Delta 2918 \Delta 1752::P_{fdx}$ -2528mut und in 10 % Schritten wurde der Anteil des Elternstamms H53  $\Delta 2528 \Delta 1752::2528$  erhöht, bis 100 % der DNA von H53  $\Delta 2528 \Delta 1752::2528$  vorlag. Die Ergebnisse der Optimierungs-PCR sind im Folgenden dargestellt (siehe Abb. 36).

Bei allen PCRs ist eine Detektion der Deletion sowie des Vorhandenseins der entsprechenden DNA-Sequenz möglich. Bei der PCR zur Detektion des  $P_{fdx}$ -Promotors ist eine Doppelbande bei Vorhandensein des Promotors erkennbar, die aber die Auswertung der PCR nicht beeinträchtigt. Bei der PCR zur Detektion der 10 nt Deletion im *HVO\_2528*-ORF sind die Banden bei geringer DNA-Menge nicht mehr klar zu erkennen, weshalb die Zyklenzahl hier um 10 Zyklen erhöht wurde. Bei der Untersuchung des *thyA*- und des *trpA*-Locus wird bei abnehmender DNA-Menge des intakten Gens bevorzugt die Deletion amplifiziert, sodass hier bei einem 50/50-Verhältnis das intakte Gen zum Teil nur schwer erkennbar ist. Deshalb wurde auch hier die Zyklenzahl um 10 Zyklen erhöht, um eine bessere Auswertbarkeit zu gewährleisten und auch nur eine Genomkopie mit dem intakten Gen detektieren zu können.



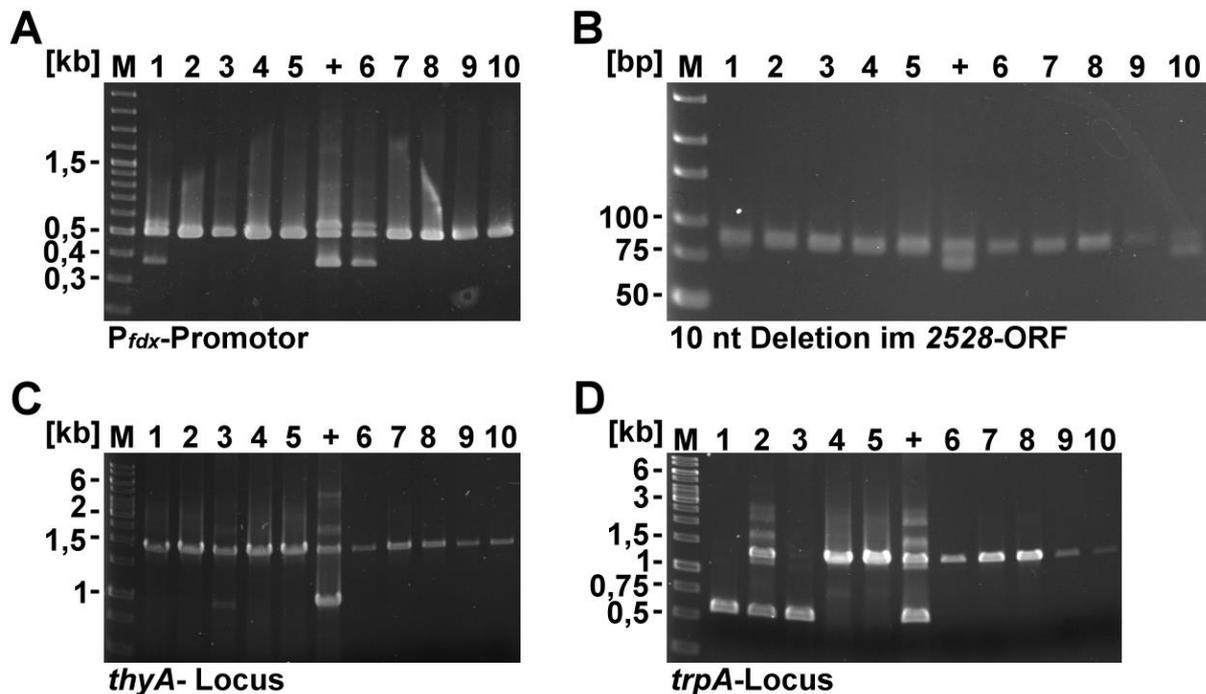
**Abb. 36: Optimierung der PCRs für die Einzelklonanalyse**

Zu sehen sind die entstandenen Fragmente bei den verschiedenen DNA-Verhältnissen der Elternstämme  $\Delta 2528 \Delta 2918 \Delta 1752::P_{fdx-2528mut}$  (*fdx-2528mut*) und H53  $\Delta 2528 \Delta 1752::2528$  (*2528*) in 10 % Abstufungen. **(A)** Optimierung der PCR zur Untersuchung des Locus des  $P_{fdx}$ -Promotors. Zu sehen ist die Bande des vorhandenen Promotors bei 497 bp und die des fehlenden Promotors bei 366 bp. **(B)** Optimierung der PCR zur Untersuchung des Locus des der 10 nt Deletion im *HVO\_2528*-ORF. Zu sehen ist die Bande der 10 nt Deletion bei 75 bp und die der fehlenden 10 nt Deletion bei 85 bp. **(C)** Optimierung der PCR zur Untersuchung des Locus des *thyA*-Gens. Zu sehen ist die Bande die des vorhandenen *thyA*-Gens bei 1898 bp und der *thyA*-Deletion bei 968 bp. **(D)** Optimierung der PCR zur Untersuchung des Locus des *trpA*-Gens. Zu sehen ist die Bande der *trpA*-Deletion bei 543 bp und die des vorhandenen *trpA*-Gens bei 1322 bp.

#### 4.3.6.2 Ergebnisse der Einzelklonanalyse

Um die einzelnen Genkonversionsloci der roten Klone genauer zu untersuchen und um zu beurteilen, ob möglicherweise eine intakte Genomkopie ausreicht, um die rote Färbung zu erzeugen oder ob Zellen homozygot vorliegen, wurde eine Einzelkolonieanalyse der Klone durchgeführt. Zur Untersuchung wurden lediglich Klone ausgewählt, bei denen das Picken von nur roten Zellen möglich war. Es wurden die Loci des  $P_{fdx}$ -Promotors und der 10 nt Deletion im *HVO\_2528*-ORF, sowie die teilweise unter Selektionsdruck stehenden Loci von *thyA* und *trpA* (siehe Abb. 37). Hierfür wurden alle roten Klone herangezogen, die im Laufe der Genkonversionsexperimente entstanden sind.

Bei allen untersuchten roten Klonen konnte eine Bande generiert werden. Für die selektionsfreien Loci des  $P_{fdx}$ -Promotors und der 10 nt Deletion liegen die Zellen im Wesentlichen homozygot vor. Sie besitzen den  $P_{fdx}$ -Promotor und zeigen keine 10 nt Deletion und sind so in der Lage, Carotinoide zu synthetisieren, die ihnen ihre rote Farbe verleihen. Zwei Klone (1 und 6) sind für den  $P_{fdx}$ -Promotor und ein Klon (Klon 10) ist für die 10 nt Deletion heterozygot. Beim *thyA*-Locus, der für die Thymin-Auxotrophie verantwortlich ist, zeigt sich ein ähnliches Bild. Die Zellen sind bis auf einen Klon (Klon 3) homozygot und besitzen alle das Gen. Da Tryptophan in Komplexmedium vorhanden und der *trpA*-Locus somit nicht selektiert ist, zeigt sich hier ein etwas anderes Bild. Bei zwei Klonen (Klon 1 und 3) hat sich die Deletion durchgesetzt, ein Klon ist heterozygot (Klon 2) und bei drei hat sich das Vorhandensein des *trpA*-Gens durchgesetzt. Die Klone, die auf Synthetischem Medium mit Glukose gewachsen sind (Klon 7 – 10) sind alle homozygot für das Vorhandensein des *trpA*-Gens.



**Abb. 37: Ergebnisse der Einzelklonanalyse der roten Klone**

Gezeigt sind die PCR-Analysen der Loci **(A)** P<sub>fdx</sub>-Promotor, **(B)** 10 nt Deletion im *HVO\_2528*-ORF, **(C)** *thyA* und **(D)** *trpA*. Die Klone 1 – 6 stammen von Komplexmedium, die Klone 7 – 10 von synthetischem Medium mit Glukose. Die Klone 7 – 9 sind teil der 12 roten Klone, die in 4.3.6 beschrieben wurden. Als Positivkontrolle (+) wurde eine 50/50-DNA-Mischung der Elternstämme  $\Delta 2528 \Delta 2918 \Delta 1752::P_{fdx-2528mut}$  und H53  $\Delta 2528 \Delta 1752::2528$  verwendet.

Neben den roten Klonen wurden die vier Loci in 135 weißen Klonen untersucht. Alle Klone wurden von Synthetischem Medium mit Glukose gepickt und zunächst die nicht-selektierten P<sub>fdx</sub>-Promotor und 10 nt Deletion im *HVO\_2528*-ORF untersucht.

Lediglich 16 der untersuchten Klone waren heterozygot für die beiden untersuchten Loci, während in 119 Klonen Genkonversion nachgewiesen werden konnte. Wie erwartet, zeigten keine die Kombination eines P<sub>fdx</sub>-Promotors und einem intakten *HVO\_2528* (+/+), da die Klone sonst rot gewesen wären. Lediglich ein Klon zeigte die Kombination eines fehlenden P<sub>fdx</sub>-Promotors und einer 10 nt Deletion im Gen *HVO\_2528* ( $\Delta/\Delta$ ). Diese Richtung der Genkonversion scheint damit ähnlich selten zu sein, wie die, die rote Klone entstehen lässt. Die eine Hälfte der restlichen Klone besaß keinen P<sub>fdx</sub>-Promotor, hatten aber das intakte *HVO\_2528* ( $\Delta/+$ ) und zeigten damit die gleiche genetische Organisation wie der Elternstamm H53  $\Delta 2528 \Delta 1752::2528$ . Die andere Hälfte der Klone besaß einen P<sub>fdx</sub>-Promotor, das ORF von *HVO\_2528* war jedoch durch die 10 nt Deletion zerstört ( $+/\Delta$ ). Sie zeigen die gleiche genetische Organisation wie der Elternstamm  $\Delta 2528 \Delta 2918 \Delta 1752::P_{fdx-2528mut}$ . Zwei Klone waren heterozygot für einen der beiden Loci, für den anderen jedoch

nicht. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (siehe Tab. 44).

**Tab. 44: Ergebnisse der Untersuchung der nicht-selektierten Loci der weißen Klone**

		untersuchte Klone	135
$P_{fdx}$ -Promotor		<i>HVO_2528</i> -ORF	
+		+	0
$\Delta$		+	58
$\Delta$		$\Delta$	1
+		$\Delta$	53
		<b>heterozygot: 2 Loci</b>	16
		<b>heterozygot: 1 Locus</b>	2

Als nächstes wurden die unter Selektionsdruck stehenden Loci des *thyA*- und des *trpA*-Gens untersucht (siehe Tab. 45).

Bei der Untersuchung von 135 Klonen waren bei beiden Loci 98,5 % der PCR-Reaktionen auswertbar. Beim *thyA*-Locus, der für die Thymin-Auxotrophie verantwortlich ist, waren mit ungefähr 70 % die meisten der untersuchten Klone heterozygot. Die restlichen 30 % waren homozygot für das Vorhandensein des Gens (+). Interessant ist auch, dass die Klone, die in der ersten PCR untersucht wurden, fast alle heterozygot waren, während die Klone, die einen Monat später in einer PCR untersucht waren, fast alle homozygot für das Vorhandensein des Gens waren. Beim *trpA*-Locus waren 90 % der Gene homozygot für das Vorhandensein des Gens und lediglich 10 % heterozygot. Bei beiden Loci gab es keine Klone, die homozygot für die Deletion waren ( $\Delta$ ), was den Erwartungen entspricht, da weder Thymidin noch Tryptophan im Medium waren und der Locus damit unter Selektionsdruck stand.

**Tab. 45: Ergebnisse der Untersuchung der selektierten Loci der weißen Klone**

		<i>thyA</i> -Locus		<i>trpA</i> -Locus	
untersuchte Klone	135	%	135	%	
auswertbar	133	98,5	133	98,5	
+	40	30,1	120	90,2	
$\Delta$	0	0,0	0	0,0	
heterozygot	93	69,9	13	9,8	

Ein genetischer Unterschied zwischen den verschiedenen Farbstufen der weißen Klone (siehe Abb. 35) konnte nicht detektiert werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Einfluss der Deletion der origin-assoziierten und „verwaisten“ *orc*-Gene auf Wachstum und Genomkopienzahl

Polyploidie, das Vorkommen von mehr als zwei Chromosomensätzen pro Zelle, galt lange als Eigenschaft der Eukaryoten, da Fische, Amphibien und insbesondere Pflanzen häufig polyploid sind (Comai 2005). Prokaryoten galten lange Zeit als monoploid, allerdings konnten in jüngster Zeit immer mehr Spezies beschrieben werden, die polyploid sind, sodass es tatsächlich so scheint, als sei Polyploidie in Prokaryoten eher die Regel als die Ausnahme (Soppa 2011b). Darüber hinaus sind die Zellen nicht einfach polyploid, sondern für *Haloferax volcanii* konnte gezeigt werden, dass innerhalb einer Population alle Zellen eine nahezu identische Genomkopienzahl aufweisen (Zerulla 2014). Außerdem konnte bei fast allen untersuchten Spezies eine wachstumsphasen-abhängige Regulation festgestellt werden, mit mehr Kopien in der exponentiellen als in der stationären Phase (Breuert *et al.* 2006; Griese *et al.* 2011; Hildenbrand *et al.* 2011; Pecoraro *et al.* 2011; Zerulla 2014; Spaans *et al.* 2015; Zerulla *et al.* 2016; Böttinger *et al.* 2018). Wie genau diese Regulation funktioniert ist unbekannt. Ein wahrscheinlicher Regulationspunkt ist jedoch die DNA-Replikation, da vermehrte DNA-Replikation zu mehr Genomkopien, verminderte zu weniger Genomkopien führt. Der entscheidende Punkt zur Regulation der DNA-Replikation ist die DNA-Initiation (Ausiannikava und Allers 2017). In Archaea wird die DNA-Replikation durch das Erkennen und Binden des Replikationsursprungs durch das Initiatorprotein Orc1/Cdc6 initiiert. *Haloferax volcanii* hat 16 solcher Orc1/Cdc6-Proteine, 6 davon sind, wie in vielen Archaea typisch, neben einem Replikationsursprung lokalisiert, die übrigen 10 sind „verwaist“. Um herauszufinden, welchen Einfluss die 16 Orc1/Cdc6-Proteine auf das Ploidielevel haben, ob die „verwaisten“ Proteine funktional oder nur rudimentäre Überbleibsel sind, wurden in dieser Arbeit Einzeldelentionsmutanten der Orc1/Cdc6-Proteine erstellt. Zwölf Gene konnten erfolgreich deletiert werden, bei drei war auch bei 100 untersuchten Pop-Out-Klonen nur die Wildtyp-Bande zu detektieren, weshalb diese *orc1/cdc6*-Gene als essentiell betrachtet werden. Bei dem „verwaisten“ Gen *HVO\_A0064 (orc13)* war trotz Uracil-Protrophie im Southern-Blot kein erfolgreiches Pop-In detektierbar – eine in-frame Deletion mit der Pop-In/Pop-Out-Methode war dementsprechend nicht möglich. Da *HVO\_A0064* mit 1 kb bzw. 3 kb Abstand zwischen zwei Transposons kodiert ist, besteht die Möglichkeit, dass die homologe

Rekombination des Suicide-Plasmids in das Genom ein Rekombinationsereignis ausgelöst hat, wodurch es zum Genom-Rearrangement kam. Da das Gen auch in einem Southern-Blot mit einer gegen das Gen gerichteten Sonde nicht mehr nachgewiesen werden konnte, wurde das Gen ebenfalls als nicht essentiell klassifiziert. Eine Untersuchung der Fitness und der Genomkopienzahl fand jedoch nicht statt, da es durch das Genom-Rearrangement zu polaren Effekten kommen kann und somit keine sichere Aussage über *HVO\_A0064* getroffen werden kann. In *Haloferax volcanii* sind dementsprechend wie auch in anderen Haloarchaea, die Mehrzahl der Orc1/Cdc6-Proteine nicht essentiell.

Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sowohl „verwaiste“ Gene (*HVO\_2293 (orc11)* & *HVO\_A0072 (orc7)*) als auch replikationsursprungsassoziierte Gene (*HVO\_B0001 (orc6)*) essentiell sein können. Replikationsursprungsassoziierte Gene sind dementsprechend nicht von größerer Bedeutung als „verwaiste“. Hawkins und Kollegen (2013) konnten alle vier Replikationsursprünge auf dem Hauptchromosom deletierten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, bei denen die Deletion der entsprechenden replikationsursprungsassoziierten Gene auch ohne den jeweiligen Replikationsursprung deletiert werden konnten (*HVO\_0001*, *HVO\_0634*, *HVO\_1725* und *HVO\_A0001*). Ausiannikava und Kollegen konnten zeigen, dass die Deletion von *HVO\_1725* zu weitreichenden Genomveränderungen und der Aufteilung des Hauptchromosoms in ein 2.696 kb und ein 787 kb großes Chromosom führt (Ausiannikava *et al.* 2018). Ob dies in dieser Arbeit auch der Fall war, ist unklar.

Um den Einfluss der jeweiligen Orc1/Cdc6-Proteine auf das Wachstum zu analysieren, wurden Mikrotiterwachstumstests unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass fast alle Mutanten vergleichbar mit dem Wildtyp oder besser wuchsen – lediglich die Deletionsmutante von *HVO\_1725* wies nach dem Anwachsen aus stationären Bedingungen ein etwas schlechteres Wachstumsverhalten auf. Dies entspricht im Wesentlichen den Ergebnissen der Gruppe Thorsten Allers', der ebenfalls verbessertes Wachstum der *orc1/cdc6*-Einzeldelentionsmutanten beobachten konnte (Ausiannikava *et al.* 2016). Das Wachstum konnte darüber hinaus durch Deletion weiterer *orc1/cdc6*-Gene noch verbessert werden. Interessant ist, dass Maurer und Kollegen (2018) bei kompetitiven Wachstumsversuchen ein verbessertes Wachstum der *ori1*-Deletionsmutante und ein vermindertes Wachstum der *ori2*-Deletionsmutante im

Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Dieser Effekt konnte in dieser Arbeit lediglich für die Deletion von *HVO\_1725* für das Anwachsen aus stationärer Kultur beobachtet werden. Möglicherweise liegt das daran, dass im Fall von Maurer und Kollegen der gesamte Replikationsursprung und nicht nur das *orc1/cdc6*-Gen deletiert wurde. Darüber hinaus fand der Versuch mit einer anderen Kohlenstoffquelle statt (Casaminosäuren anstatt Komplexmedium oder Glukose) und das Wachstum wurde nicht mittels Mikrotiterwachstumstest, sondern mithilfe eines kompetitiven Wachstumsversuchs verglichen, der auch minimale Fitnessunterschiede sichtbar macht. Interessant ist darüber hinaus auch, dass die Deletionsmutante von *HVO\_2133* (*orc16*) nur mit Glukose als Kohlenstoffquelle verbessertes Wachstum zeigt, nicht jedoch in Komplexmedium. Dies könnte darauf hindeuten, dass einzelne Orc1/Cdc6-Proteine möglicherweise unter bestimmten Bedingungen zur Replikationsinitiation verwendet werden. Moran-Reyna und Coker (2014) konnten zum Beispiel bei einer Transkriptomanalyse zeigen, dass die *orc1/cdc6*-Gene in *Halorubrum lacusprofundi*, *Haloferax volcanii* und *Halobacterium* sp. NRC-1 abhängig von Umweltbedingungen (in dem Fall hoher und niedriger pH) reguliert sind. Darüber hinaus scheinen die Orc1/Cdc6-Proteine keine Rolle bei der Verwendung der DNA als Phosphatspeicher zu spielen (Zerulla *et al.* 2014b), da keine der Deletionsmutanten einen Wachstumsphänotyp unter Phosphatmangel zeigte.

Die Quantifizierung der Kopienzahl aller drei Replikons zeigt, dass alle Orc1/Cdc6-Proteine einen Einfluss auf mindestens ein, in manchen Fällen auch zwei oder drei, Replikons haben. Dies zeigt, dass es sich bei den „verwaisten“ *orc1/cdc6*-Genen keinesfalls um inaktive, rudimentäre Überbleibsel, sondern um funktionelle Gene handelt, die sich in der Größe ihres Einflusses auch nicht von den kolokalisierten Orc1/Cdc6-Proteinen unterscheiden. Desweiteren ist der Einfluss des Orc1/Cdc6-Proteins nicht auf das Replikon beschränkt, auf dem es kodiert ist. Zwar zeigen einige den stärksten Effekt auf das Replikon, auf dem sie kodiert sind (z.B. *HVO\_2292* oder *HVO\_C0057*), andere wiederum beeinflussen im Wesentlichen die Replikons, auf denen sie nicht kodiert sind, wie z.B. *HVO\_0001* und *HVO\_2133*, die den größten Einfluss auf pHV1 zeigen, obwohl sie auf dem Hauptchromosom kodiert sind. Interessant ist auch, dass die Ergebnisse der Deletion des mit *ori1* kolokalisierten *HVO\_0001* und des mit *ori2* kolokalisierten *HVO\_1725* gegenläufig zu der kompletten Deletion der Replikationsursprünge, bestehend aus den Repeats

und den *orc1/cdc6*-Genen, sind. So beobachteten Maurer und Kollegen für die komplette Deletion von *ori1* eine verringerte Kopienzahl des Hauptchromosoms im Vergleich zum Wildtyp, bei der Deletion von *ori2* eine stark erhöhte. Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit hier bei der alleinigen Deletion von *HVO\_0001* (*ori1*) eine leichte Erhöhung der Kopienzahl des Hauptchromosoms im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden, bei der Deletion von *HVO\_1725* (*ori2*) eine Halbierung der Kopienzahl. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass bei *Haloferox volcanii* nicht alle Replikationsursprünge nur von ihren kolokalisierten Orc1/Cdc6-Proteinen aktiviert werden, wie es in *Sulfolobus acidocaldarius* (Lundgren *et al.* 2004), *Aeropyrum pernix* (Gaudier *et al.* 2007) und *Haloarcula hispanica* (Wu *et al.* 2014a) der Fall ist. Tatsächlich konnten Ausiannikava und Kollegen (2016) zeigen, dass *ori1* sowohl vom kolokalisierten Orc1 (*HVO\_0001*) sowie von dem mit *ori2* kolokalisierten Orc5 (*HVO\_1725*) und dem mit *ori3* lokalisierten Orc2 (*HVO\_0634*) aktiviert werden kann. *Ori3* und *ori-pHV4* können hingegen nur von ihren kolokalisierten Orc1/Cdc6-Proteinen Orc2 (*HVO\_0634*) und Orc3 (*HVO\_A0001*) aktiviert werden, wie es in *Sulfolobus* und *Haloarchula* der Fall ist. Möglicherweise kann *ori-pHV3* ebenfalls nur durch sein kolokalisiertes Orc1/Cdc6-Protein Orc6 (*HVO\_B0001*) aktiviert werden, weshalb dieses essentiell ist. In *Sulfolobus solfataricus* konnte gezeigt werden, dass *ori1* ebenfalls nicht von allen Orc1/Cdc6-Proteinen aktiviert werden kann, sondern lediglich von Cdc6-1 und Cdc6-2, wobei diese unterschiedliche Stellen im Replikationsursprung binden (Robinson *et al.* 2004; Robinson und Bell 2007; Ausiannikava und Allers 2017). *Ori2* und *ori3* können von allen drei Initiatorproteinen gebunden werden, jedoch mit unterschiedlicher Affinität.

Außer der Tatsache, dass alle Orc1/Cdc6-Proteine Einfluss auf die Kopienzahl mindestens eines Replikons haben, fällt darüber hinaus auf, dass der Einfluss unterschiedlich groß ist. Manche Orc1/Cdc6-Proteine, wie z.B. *HVO\_0001*, *HVO\_0634*, *HVO\_2292* oder *HVO\_2133* verändern die Kopienzahl verschiedener Replikons drastisch, während andere, wie z.B. *HVO\_2042*, nur minimalen Einfluss haben. Samson und Kollegen (2016) fanden bei Strukturanalysen der wH-Domäne der replikativen MCM-Helikase eine Ähnlichkeit mit der wH-Domäne des menschlichen RPA32, bei der es sich um ein bekanntes Protein-Protein-Interaktionsmodul handelt. RPA32, ein Einzelstrangbindeprotein, interagiert unter anderem mit der N-Glykosylase UNG2. Bei Strukturanalysen von Orc1-1 und Orc1-3 in *Sulfolobus islandicus* fanden sie eine mit UNG2 verwandte Sequenz und konnten

durch gezielte Mutation konservierter Aminosäuren nachweisen, dass die mutierten Orc1-Proteine zwar noch an den Replikationsursprung binden, aber nicht mehr die MCM-Helikase rekrutieren konnten, wodurch es zu keiner Aktivierung des Replikationsursprungs kam. Interessanterweise konnte diese sogenannte MCM-Recruitment-Motif (MRM) nicht in Orc1-2 gefunden werden, das nicht für die Aktivierung eines Replikationsursprungs benötigt wird und bei dem man davon ausgeht, dass es die DNA-Replikation reprimiert (Robinson *et al.* 2004; Samson *et al.* 2013). Aus diesem Grund wurde ebenfalls eine Sequenzanalyse der Orc1/Cdc6-Proteine von *Haloferax volcanii* durchgeführt und ist im Folgenden dargestellt (siehe Abb. 38).

	MRM	Sensor 2
Orc1-1-SiR 1740	RLCAALAAREHGDARR	
Orc1-3-SiR 0002	GYIAAISAKEHGDARK	
orc1-HV0 0001	PLCAAFAAQEHGDARR	
orc2-HV0 0634	NLCAALAARDSGSARO	
orc3-HV0 A0001	PLCAAYGAKDAGDARQ	
orc4-HV0 2042	PLCAAYGAKDSGDARQ	
orc5-HV0 1725	PRAAALAAREHGDARK	
orc6-HV0 B0001	PLASALAAQEHGDARK	
orc7-HV0 A0257	PLTAALAAQEHGDARK	
orc8-HV0 C0057	OLSAALAAODHGDARO	
orc9-HV0 0194	DQVAEFTADS - GDLRV	
orc10-HV0 C0001	SLCAALATQGGDARF	
orc11-HV0 2293	EEIAEOVAENSGDCRO	
orc12-HV0 A0072	LYRVADAAA - - GDARL	
orc13-HV0 A0064	PLVAAFGSQTHGDARK	
orc14-HV0 2292	TYIASST - - - - ONTGY	
orc15-HV0 1537	- - TREVAEWADGDAHD	
orc16-HV0 2133	- - ARDIAEWADGDAHD	

**Abb. 38: Sequenzanalyse des MRM der Orc1/Cdc6-Proteine**

Gezeigt sind die Orc1/Cdc6-Proteine von *Haloferax volcanii* sowie Orc1-1 und Orc1-3 von *Sulfolobus islandicus*. Die Farben geben Auskunft über die Ähnlichkeit der Sequenz: grün = geringe Ähnlichkeit, gelb = durchschnittliche Ähnlichkeit, hellrot = hohe Ähnlichkeit, dunkelrot = sehr hohe Ähnlichkeit. Die Sequenzanalyse wurde mit M-Coffee durchgeführt (Moretti *et al.* 2007).

Was auf den ersten Blick auffällt, ist, dass ein Großteil der Orc1/Cdc6-Proteine in *Haloferax volcanii* das MCM-Recruitment-Motif ebenfalls aufweist. Auch der Sensor 2-Rest, der für die Koordination des  $\gamma$ -Phosphats von ATP verantwortlich und für das MCM-Helikase-Loading essentiell ist, ist größtenteils konserviert. In den mit den Replikationsursprüngen kolokalisierten Orc1/Cdc6-Proteinen (Orc1, Orc2, Orc3, Orc5, Orc6 und Orc10) ist das MRM am ähnlichsten zu dem der Orc1/Cdc6-Proteine in *Sulfolobus*, aber auch ein paar „verwaiste“ Gene weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit auf, wie zum Beispiel Orc4, Orc7 oder Orc8, während in

manchen Proteinen das MRM nicht konserviert ist, wie z.B. in Orc9, Orc12, Orc14, Orc15 und Orc16. In *Sulfolobus islandicus* konnte gezeigt werden, dass die Orc1/Cdc6-Proteine, die an der DNA-Replikation beteiligt sind, das MRM aufweisen, die es nicht tun, kein MRM besitzen (Samson *et al.* 2016). In *Haloferax volcanii* entspricht das nicht den Beobachtungen. Zwar zeigen Orc1 und Orc2 großen Einfluss auf die Kopienzahl von pHV3 bzw. pHV1 und pHV3, aber auch Orc14 und Orc16 steigern die Kopienzahl des Hauptchromosoms bzw. pHV1 drastisch. In *Haloferax volcanii* ist nach wie vor unklar, wie die Orc1/Cdc6-Proteine an den Replikationsursprung binden, ob als Heterohexamer wie in Eukaryoten (O'Donnell *et al.* 2013), als Heterodimer wie in *Sulfolobus solfataricus* (Dueber *et al.* 2007), als Monomer wie in *Aeropyrum pernix* (Gaudier *et al.* 2007) oder auf eine bisher ungesehene Art und Weise. In *S. solfataricus* binden Cdc6-1 und Cdc6-3 nicht nur als Dimer, sie beeinflussen sich dabei auch in ihrer DNA-Bindeaffinität. Möglicherweise ist auch genau das der Fall in *Haloferax volcanii*. Die Orc1/Cdc6-Proteine mit MRM könnten an die Orc1/Cdc6-Proteine ohne MRM binden und so ihre Affinität zur DNA erhöhen. Nach der Bindung an den Replikationsursprung, rekrutiert das Orc1/Cdc6-Protein mit MRM die MCM-Helikase und initiiert so die Replikation. Möglicherweise haben die Orc1/Cdc6-Proteine ohne MRM auch weitere Funktionen und beeinflussen das Ploidielevel indirekt über noch unbekannte Mechanismen. In *Pyrococcus abyssi* konnten zum Beispiel bei der Immunopräzipitation von Cdc6 neben OriC1 noch weitere Regionen aufgereinigt werden (Matsunaga *et al.* 2007). Um die Bindung der Orc1/Cdc6-Proteine an DNA- und Proteinbindungspartner genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit von zwei kolokalisierten (*HVO\_0001* und *HVO\_1725*) und zwei „verwaisten“ Genen (*HVO\_2133* und *HVO\_A0257*) Hexahistidin-getaggte Überexpressionsvektoren angefertigt. Zwei der vier (*HVO\_0001* und *HVO\_1725*) Proteine konnten erfolgreich im Western-Blot nachgewiesen werden. Bei den anderen Proteinen wurde möglicherweise der Hexahistidin-Tag post-translational abgespalten, weshalb versucht werden könnte, das C- anstatt N-getaggte Protein nachzuweisen. Darüber hinaus ist es möglich, dass das Gen nicht exprimiert wurde – eine Northern-Blot-Analyse könnte hierrüber Auskunft geben. Die beiden erfolgreich überexprimierten Proteine eignen sich jedoch, um Co-Affinitätsaufreinigungen durchzuführen und mögliche DNA- bzw. Proteinbindungspartner zu identifizieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vielzahl von *Haloferax volcanii* Orc1/Cdc6-Proteinen auf komplexes Netzwerk schließen lässt, das viele

Regulationspunkte hat und an unterschiedlichen Stellen Einfluss auf die einzelnen Bestandteile nimmt. Es konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass Orc1/Cdc6-Proteine unter verschiedenen Bedingungen unterschiedlich exprimiert werden – eine Umweltspezifität der Orc1/Cdc6-Proteine ist dementsprechend möglich. Es konnte gezeigt werden, dass Replikationsursprünge von unterschiedlichen Orc1/Cdc6-Proteinen aktiviert werden können, was durch gezielte Expression einzelner *orc1/cdc6*-Gene die gerichtete Aktivierung einzelner Replikationsursprünge möglich macht. Dies ist insbesondere interessant, da Unterschiede in der Stärke von *ori1* und *ori2* bereits nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass sich die Orc1/Cdc6-Proteine durch Interaktion miteinander in ihrer Affinität zum Replikationsursprung beeinflussen, so wie in *Sulfolobus solfataricus* bereits gezeigt. Möglicherweise spielen hier auch die gezeigten strukturellen Unterschiede zwischen den Orc1/Cdc6-Proteinen eine Rolle, da manche die MRM-Interaktionsdomäne sowie den Sensor 2-Rest aufweisen, andere wiederum nicht. In dieser Arbeit konnte definitiv gezeigt werden, dass die Initiation der DNA-Replikation durch Orc1/Cdc6-Proteine einer der Regulationspunkte des Ploidielevels ist.

Neben den *orc1/cdc6*-Genen wurde in dieser Arbeit darüber hinaus der Einfluss von *HVO\_2380 (cdc48a)* auf das Ploidielevel untersucht. In *H. volcaniis* Genom sind neben *cdc48a* vier weitere *cdc48*-Gene kodiert, die eine Sequenzübereinstimmung von 65 – 95 % haben (Schmitt 2014). Im Euryarchaeon *Thermoplasma acidophilum* konnte gezeigt werden, dass Cdc48 mit der 20S Peptidase interagiert und so ein funktionales Proteasom bildet (Barthelme und Sauer 2012). Jessica Schmitt (2014) mittels Mikroarray und Northern-Blot Analysen zeigen, dass *cdc48a* unter Niedrigsalz, Phosphat- und Stickstoffhunger hochreguliert ist. In dieser Arbeit hier konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *HVO\_2380* einen Wachstumsphänotyp unter fast allen untersuchten Bedingungen nach sich zieht. Insbesondere nach Anwachsen aus stationärer Kultur und unter Niedrigsalzbedingungen, zeigt die Deletionsmutante einen starken Wachstumsdefekt. In Komplexmedium und unter Phosphatmangel zeigt die Deletionsmutante einen moderaten Wachstumsdefekt, während unter normalen osmotischen Bedingungen mit Glukose als Kohlenstoffquelle kein Wachstumsdefekt zu beobachten ist. Die Beobachtungen eines Wachstumsdefekts unter Niedrigsalzbedingungen und unter Phosphatmangel sind im Einklang mit der von Schmitt unter diesen Bedingungen beobachtete Hochregulation von *HVO\_2380*. Der Einfluss von *HVO\_2380* auf das Ploidielevel ist

ebenfalls sehr ausgeprägt. So führt die Deletion zur Verdopplung der Kopienzahl des Hauptchromosoms und zur Halbierung der Kopienzahl von pHV1, sowohl in der exponentiellen wie auch in der stationären Wachstumsphase. Lediglich auf die Kopienzahl von pHV3 hat *HVO\_2380* einen geringen Einfluss. Bei Cdc48 handelt es sich um ein Protein, das wie die Orc1/Cdc6-Proteine zur Familie der AAA+ ATPasen gehört. AAA+ ATPasen sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, wie z.B. der DNA-Replikation, Rekombination, Restriktion oder auch Protein-Degradation (Neuwald *et al.* 1999; Hanson und Whiteheart 2005). Es ist also möglich, dass Cdc48 einen direkten Einfluss auf die DNA-Replikation hat. In Anbetracht der Ergebnisse von Barthelme und Sauer (2012) allerdings, spielt Cdc48 auch in *Haloferax volcanii* vermutlich eher eine Rolle beim Proteinabbau. Somit beeinflusst es das Ploidielevel wahrscheinlich nicht direkt, sondern eher indirekt. Auch in andern Organismen konnte ein Einfluss weiterer Faktoren auf die DNA-Replikation nachgewiesen werden. So konnte für *Bacillus subtilis* ein Zusammenhang zwischen Nährstoffverfügbarkeit und Replikation gezeigt werden (Wang *et al.* 2007) und insbesondere die Glykolyse nimmt einen Einfluss auf die DNA-Replikation (Janniére *et al.* 2007).

## **5.2 Einfluss der ori1- und ori2-nahen Gene auf Wachstum und Genomkopienzahl**

In den Regionen um die Replikationsursprünge ori1 und ori2 in *Haloferax volcanii* sind einige Gene kodiert, deren Produkte an der DNA-Replikation beteiligt sind, wie z.B. Helikasen oder eine Untereinheit einer DNA-Polymerase. Maurer und Kollegen (2018) konnten darüber hinaus zeigen, dass die umliegenden Regionen von ori1 essentiell sind und nicht deletiert werden können. Die von ori2 können deletiert werden, jedoch haben sowohl die umliegenden Regionen von ori1 als auch ori2 einen Einfluss auf das Ploidielevel. Aus diesem Grund sollten die 5'-Regionen der beiden Replikationsursprünge in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

Hierzu sollte zunächst die Expression der Gene *HVO\_3012* – *HVO\_3014* als Operon mittels Northern-Blot verifiziert werden. Es handelt sich hierbei um das *oap*-Operon, das für Origin-assoziierte Proteine steht und in Haloarchaea in seinem Aufbau und in seiner Lage auf dem reverse-Strang upstream von ori1 hochkonserviert ist (Capes *et al.* 2011). In den dRNA-Seq-Daten (Babski *et al.* 2016) konnte ein Transkriptionsstart vor *HVO\_3014* ausgemacht werden, sowie ein

weiterer ab dem Gen *HVO\_3013*. Die RNA-Seq-Daten zeigen eine Expression der gesamten drei Gene, jedoch eine stärkere Expression der ersten beiden Gene, *HVO\_3014* und *HVO\_3013*. Die Northern-Blot-Analyse hat ergeben, dass das *oap*-Operon tatsächlich als Operon abgelesen wird. Mit Sonden gegen alle drei Gene, ist eine Bande von ungefähr 2082 bp detektierbar, was der Größe des Operons entspricht. Auch der in den dRNA-Seq-Daten gezeigte zweite Replikationsstart bei *HVO\_3013* konnte im Northern-Blot von *HVO\_3013* bestätigt werden. Die Transkriptlänge entspricht dem des bicistronischen Transkripts *HVO\_3013/HVO\_3012*. Im Northern-Blot von *HVO\_3012* ist die Bande des detektierten Transkripts allerdings wesentlich schwächer als die im Northern-Blot von *HVO\_3013* detektierte Bande. Dies steht im Widerspruch zu einem gemeinsamen Transkript, da dieses dann in beiden Northern-Blots in gleicher Menge vorhanden sein sollte. Die monocistronischen Transkripte von *HVO\_3013* und *HVO\_3012* konnten nicht detektiert werden. Darüber hinaus konnte noch das bicistronische Transkript von *HVO\_3014/HVO\_3013* nachgewiesen werden, sowie das Transkript von *HVO\_3014* alleine, was damit korreliert, dass in den RNA-Seq-Daten mehr Reads bei den ersten beiden Genen detektiert wurden.

Als nächstes wurden C-terminal Hexahistin-getaggte Tryptophan-induzierbare Überexpressionsvektoren von *HVO\_3012* – *HVO\_3014* (*oap*-Operon), sowie von *HVO\_1724* (konserviertes hypothetisches Protein) angefertigt und die N-terminal His-getaggen Vektoren für *HVO\_3010* (Hef-Helikase) und *HVO\_1723* (Rad25d-Helikase) von Sandy Maurer übernommen. Nach erfolgreicher Transformation in den Laborwildtypstamm H26, wurde zunächst das Wachstum charakterisiert. Hierfür wurden die Zellen in Mikrotiterplatten in Synthetischem Medium mit Glukose angezogen, einmal ohne Induktion, einmal mit Induktion in der exponentiellen Phase und einmal mit Induktion von Beginn an. Gezeigt werden konnte, dass die meisten Muntanten im Vergleich zur Kontrolle auch unter nicht-induzierten Bedingungen deutlich schlechter wachsen, bis auf die Überexpressionsmutanten der Hef-Helikase (*HVO\_3010*) und der Rad25d-Helikase (*HVO\_1723*). Dies könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass der Tryptophan-induzierbare Promotor nur bei Lokalisation auf dem Genom komplett dicht ist, auf Plasmiden nicht (Large *et al.* 2007). Bei Induktion in der exponentiellen Phase zeigt sich ein ähnliches Bild, während bei der Induktion von Beginn an deutliche Unterschiede auffallen. Die Überexpressionsmutante der Helikase Rad25d (*HVO\_1723*) wächst besser als die

Kontrolle, die von *HVO\_3014* (*oapA*) wächst vergleichbar, die von *HVO\_1724* (konserviertes hypothetisches Protein) und *HVO\_3012* (*oapC*) schlechter und die der Hef-Helikase (*HVO\_3010*) und *HVO\_3013* (*oapB*) zeigen einen starken Wachstumsdefekt. Warum diese Effekte beobachtet werden können, andere wiederum nicht, ist unklar. Möglicherweise stört es zelluläre Prozesse, wenn manche Proteine im Übermaß vorhanden sind, während andere in ihrer Menge limitierend sind und durch eine Überexpression das Wachstum fördern. Die Hef-Helikase ist an der Auflösung festgefahrener Replikationsgabeln beteiligt (Lestini *et al.* 2015). Möglicherweise ist das His-getaggte Protein nicht vollfunktional und verdrängt bei der Überexpression das funktionale, sodass die festgefahrenen Replikationsgabeln nicht aufgelöst werden können und dadurch der Wachstumsdefekt entsteht. Rad25d ist eine Helikase, die vermutlich an der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) beteiligt ist (Capes *et al.* 2011). Eventuell sorgt eine verbesserte Reparatur für ein besseres Wachstum, wobei *H. volcaniis* Mutationsrate unter Normalbedingungen bereits sehr gering ist und eine verbesserte NER daher keine so großen Auswirkungen haben sollte (Mackwan *et al.* 2007).

Als nächstes wurden die überexprimierten Proteine im Western-Blot mittels Anti-Hexahistidin-Antikörper nachgewiesen. Die Hef-Helikase (*HVO\_3010*) und die Rad25d-Helikase (*HVO\_1723*) konnten erfolgreich detektiert werden. Die anderen Proteine konnte nicht nachgewiesen werden. Aufgrund des Wachstumsphänotyps ist davon auszugehen, dass die Proteine exprimiert werden, der His-Tag jedoch post-translational abgespalten wird. In dieser Arbeit wurden die Proteine C-terminal His-getaggt, Sandy Maurer konnte jedoch auch für die N-terminal getaggten Varianten keine Bande im Western-Blot detektieren (Ergebnisse nicht publiziert).

Um den Einfluss der umliegenden Gene weiter untersuchen zu können, wurden drei Gene für eine Deletion ausgewählt: die Hef-Helikase (*HVO\_3010*), die Rad25d-Helikase (*HVO\_1723*) und das dritte Gen des *oap*-Operons (*HVO\_3012*). Alle drei Gene konnten deletiert werden. *HVO\_3010* wurde zuvor schon von Lestini und Kollegen als nicht essentiell beschrieben (Lestini *et al.* 2010), und die gesamte 5'-Region von *ori2*, in der sich auch *HVO\_1723* befindet, konnte von Maurer und Kollegen ebenfalls erfolgreich deletiert werden (Maurer *et al.* 2018). Maurer und Kollegen gelang es jedoch nicht, die 5'-Region von *ori1* zu deletieren, weshalb sich in dieser Region essentielle Gene befinden müssen. Da *HVO\_3010* und *HVO\_3012* nicht essentiell sind, muss es sich dabei um *HVO\_3011* (konserviertes hypothetisches

Protein), *HVO\_3013* (*oapB*) und/oder *HVO\_3014* (*oapA*) handeln. Um den Einfluss der Gene auf das Ploidielevel zu charakterisieren, wurde die Genomkopienzahl mittels qPCR bestimmt. Die Deletionen von *HVO\_1723* (Rad25d-Helikase) zeigte keinen Unterschied im Ploidielevel im Vergleich zum Wildtyp. Die von Maurer und Kollegen beobachtete Reduktion der Chromosomenzahl in exponentieller Phase bei Deletion der 5'-Region von *ori2* muss dementsprechend auf *HVO\_1724* zurückgehen, dass bis jetzt noch als konserviertes hypothetisches Protein annotiert ist. Die Deletion von *HVO\_3010* (Hef-Helikase) zeigte ebenfalls keinen Unterschied im Ploidielevel im Vergleich zum Wildtyp, während die Deletion von *HVO\_3012* (*oapC*) die Kopienzahl des Hauptchromoms in exponentieller Phase um ein Drittel und in stationärer Phase um die Hälfte reduzierte. Dies ist der erste Hinweis darauf, dass das in Haloarchaea hochkonservierte, mit *ori1*-assoziierte *oap*-Operon (Capes *et al.* 2011) tatsächlich etwas mit der DNA-Replikation zu tun haben könnte, allerdings sollten weitere Untersuchungen folgen, um die Funktion die *oap*-Operons genauer beschreiben zu können.

Als nächstes sollte der Einfluss der Helikasen auf das Ploidielevel bei Überexpression untersucht werden. Hierzu wurden die Überexpressionsvektoren der Helikasen in ihre entsprechenden Deletionsmutanten transformiert. Anschließend wurden die Kulturen bis zur mid-exponentiellen Phase angezogen und für fünf bzw. sieben Stunden induziert. Es wurden Proben genommen und ein Western-Blot mit einem gegen den Hexahistidin-Tag gerichteten Antikörper durchgeführt. Bei beiden Überexpressionsmutanten war mehr Protein nach 7 h Induktion zu sehen, weshalb dieser Zeitpunkt für den Vergleich des Ploidielevels mit uninduzierten Zellen gewählt wurde. Der Western-Blot der qPCR-Proben zeigte keine Bande bei den nicht-induzierten Zellen; bei den induzierten Zellen konnte eine deutliche Bande detektiert werden. Die qPCR-Analyse ergab, dass eine Überexpression sowohl der Hef-Helikase (*HVO\_3010*) als auch der Rad25d-Helikase (*HVO\_1725*) keinen Einfluss auf das Ploidielevel hat. Hierfür kommen verschiedene Ursachen in Frage. Lestini und Kollegen konnten zeigen, dass die Hef-Helikase an festgefahrene Replikationsgabeln rekrutiert wird und vermutlich rekombinationsunabhängig an der Auflösung dieser beteiligt ist (Lestini *et al.* 2013). Höchstwahrscheinlich kommen festgefahrene Replikationsgabeln nicht so oft vor, dass sie die DNA-Replikation nennenswert beeinträchtigen, weshalb eine Überexpression der Hef-Helikase keinen Einfluss auf das Ploidielevel hat. Darüber hinaus ist die Hef-Helikase nicht essentiell

für die Auflösung von festgefahrenen Replikationsgabeln, da eine Deletion möglich und nicht letal ist. In der Tat gibt es einen alternativen, rekombinationsabhängigen Weg unter Verwendung der Holiday-Junction-Resolvase Hjc und RadA (Lestini *et al.* 2015). Die Rad25d-Helikase ist vermutlich an der Nukleotid-Exisionsreparatur beteiligt und zumindest bei Eukaryoten Teil des Transkriptionsfaktors TFIIH (Capes *et al.* 2011). In *Sulfolobus solfataricus* konnte gezeigt werden, dass eine verkürzte Form von Rad25 namens XPB bei der Nukleotid-Exzisionsreparatur die DNA-Blase erweitert (Rouillon und White 2010). Die hier gezeigten Ergebnisse lassen in der Tat darauf schließen, dass die Rad25d-Helikase nicht direkt an der DNA-Replikation beteiligt ist und auch nicht auf anderem Wege das Ploidielevel beeinflusst.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass nicht die Menge der Helikase entscheidend ist, sondern wie viel Helikase rekrutiert wird. So konnten Samson und Kollegen (2013) zeigen, dass eine Walker B-Mutante von Orc1-1 in *Sulfolobus islandicus*, die zwar ATP binden, aber nicht hydrolisieren konnte, eine vermehrte Aktivierung des Replikationsursprungs zufolge hatte, der zu größeren Zellen mit einem erhöhten Menge an DNA führte. Nach weiteren Untersuchungen konnten sie zeigen, dass für die Aktivierung des Replikationsursprungs die Rekrutierung der Helikase essentiell ist und vermuten, dass die Walker B-Mutante des Orc1-1 nicht eine Helikase rekrutiert und dann inaktiv wird, sondern durch die fehlende Hydrolyse von ATP zu ADP ständig die MCM-Helikase rekrutiert, was zur vermehrten DNA-Replikation führt (Samson *et al.* 2016). Zwar handelt es sich bei den beiden untersuchten Helikasen nicht um die MCM-Helikase, weshalb sie vermutlich auch nicht von Orc1/Cdc6-Proteinen rekrutiert werden, aber anhand des hier dargestellten Modells, ist davon auszugehen, dass eine Überexpression der MCM-Helikase nicht unbedingt einen Effekt auf das Ploidielevel einer Zelle hätte, eine Hyperaktivität des rekrutierenden Faktors hingegen schon.

Neben den hier untersuchten Helikasen und der bereits erwähnten MCM-Helikase sind noch 12 weitere Helikasen (Rad25a-c nicht mitgezählt) und vier weitere Proteine, die eventuell als Helikase fungieren, annotiert (Quelle: Halolex). Außer der Hef- und der Rad25d-Helikase sind keine in direkter Nähe zu einem Replikationsursprung lokalisiert, die naheste andere Helikase ist die Hel308a-Helikase (*HVO\_0014*), die 13 Gene (etwa 10 kb) von ori1 entfernt ist. Auch auffällig ist, dass auf dem kleinen Chromosom pHV3 keine Helikase kodiert ist. Unter den 12 Helikasen sind einige, die vermutlich an der homologen Rekombination beteiligt sind,

wie z.B. die Helikase der UvrD/REP Familie (*HVO\_2827*), die Reparaturhelikasen UvrD (*HVO\_0415*) und Rad3 (*HVO\_0039* & *HVO\_1351*) und die Holiday-Junction Migrationshelikasen (*HVO\_0014* & *HVO\_0971*). Darüber sind Helikasen annotiert, die vermutlich am RNA-Metabolismus beteiligt sind (z.B. *HVO\_1703*, *HVO\_1744* & *HVO\_2955*), sowie die CRISPR-assoziierte Nuklease/Helikase Cas3 (*HVO\_A0209*). Neben diesen Helikasen, wo es bereits Hinweise auf ihre Funktion gibt, sind weitere drei Helikasen annotiert, deren Funktion unbekannt ist: die archaea-spezifische Helikase AshA (*HVO\_0283*) und zwei ATP-abhängige Helikasen (*HVO\_1333* & *HVO\_1766*). Möglicherweise spielen diese Helikasen eine Rolle bei der Regulation der Polyploidie oder beeinflussen das Ploidielevel auf indirekte Art und Weise, wie in dieser Arbeit für *cdc48a* gezeigt werden konnte.

### 5.3 Genkonversion als Vorteil von Polyploidie

Bei Genkonversion handelt es sich um die nicht-reziproke Übertragung von DNA-Sequenzen zwischen zwei homologen Genen oder Chromosomen. Im Fall von Polyploidie ermöglicht die Genkonversion die Equilibrierung der einzelnen Chromosomenkopien und damit einen Ausbruch aus der Mueller-Ratsche (Khakhlova und Bock 2006), die besagt, dass sich bei asexuell vermehrenden Organismen mit der Zeit die letalen Mutationen anhäufen und ein Überleben unmöglich machen (Crow 2005). Mittels Genkonversion können jedoch mutierter DNA-Abschnitte unter Verwendung intakter Chromosomen als Template repariert sowie vorteilhafte Mutationen auf alle Chromosomenkopien übertragen werden. In *Haloferax volcanii* konnte Genkonversion bereits 2011 nachgewiesen werden (Lange *et al.* 2011).

Um in dieser Arbeit Genkonversion genauer zu untersuchen, wurden zwei Stämme konstruiert, die durch die Deletion eines Gens der Carotinoidbiosynthese (*HVO\_2528*) ihre charakteristische rote Farbe verloren hatten. In einem der Stämme wurde ein nicht-essentielles Gen (*HVO\_1752*) (Dambeck und Soppa, unpublizierte Ergebnisse) durch das intakte *HVO\_2528* ersetzt, da jedoch kein Promotor vorhanden war, konnte es nicht exprimiert werden und der Stamm blieb weiß. Im anderen Stamm wurde das nicht-essentielle Gen durch ein durch eine 10 nt Deletion zerstörtes *HVO\_2528* ersetzt, vor das ein konstitutiver Promotor geschaltet war. Dieses Gen konnte zwar exprimiert werden, das Protein war aber aufgrund der Mutation nicht funktional, wodurch auch dieser Stamm weiß blieb. Diese beiden Elternstämme wurden mittels der bereits beschriebenen Protoplastenfusion

verschmolzen, um eine heterozygote Tochterzelle zu erhalten (Tchelet und Mevarech 1993). Durch Genkonversion kann nun in dieser Zelle entweder der Promotor vor das intakte Carotinoidbiosynthesegen rekombiniert oder das mutierte Gen anhand des intakten Templates repariert werden, wodurch die Zellen wieder rot werden und dies anhand eines roten Keils, der aus einer weißen Kolonie wächst, detektierbar ist.

Hierfür wurde zunächst eine farblose Thymin-auxotrophe Mutante generiert, indem das Gen der Thymidylat-Synthase (*HVO\_2918*) in dem bereits farblosen Stamm  $\Delta 2528$  deletiert wurde. Die Mutante konnte erfolgreich konstruiert werden. Die optimale Konzentration von Thymidin zur Supplementation im Medium konnte mittels Mikrotiterplattenwachstumstest ermittelt werden und betrug 20  $\mu\text{g/ml}$ . Die Mutante zeigte anähernd mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum, weshalb sie für das geplante Experiment geeignet war. Als zweite auxotrophe Mutante wurde eine bereits beschriebene Tryptophan-auxotrophe Mutante gewählt (Allers *et al.* 2004), die bei Supplementation sogar verbessertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp zeigte (Jantzer *et al.* 2011). In einer vorherigen Arbeit war bereits das Carotinoidbiosynthesegen *HVO\_2528* deletiert worden und der Stamm damit farblos (nicht publizierte Ergebnisse). In beiden Stämmen konnte das nicht-essentielle Gen *HVO\_1752* durch die Genkonversionskonstrukte - dem zerstörten *HVO\_2528* mit konstitutivem Promotor oder dem intakten *HVO\_2528* - ersetzt werden. Wie erwartet blieben beide Stämme auch nach dem Einbringen Konstrukte weiß, sodass nach wie vor keine Carotinoidbiosynthese stattfinden konnte.

Als nächstes wurde das Protokoll, das von Tchelet und Mevarech (1993) publiziert wurde, für das Genkonversionsexperiment angepasst. Es konnten in dieser Arbeit sowohl Fragen geklärt werden, die die Publikation offen ließ (wie z.B. die optimale PEG-600-Konzentration), sowie Schritte unternommen werden, das Protokoll mit den verwendeten Stämmen durchführbar (Optimierung der Zentrifugation der Elternstämme) und das Ergebnis der Genkonversion sichtbar zu machen (direktes Ausstreichen nach der Protoplastenfusion). Das Protokoll der Protoplastenfusion zur Untersuchung der Genkonversion konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals in der Arbeitsgruppe erfolgreich etabliert werden und führt zu einer effizienten Verschmelzung der Elternstämme, die pro Ansatz mehrere Tausend heterozygote Tochterzellen liefert.

Nach Verschmelzung der Elternstämme wurden 8525 Klone ausgestrichen. Durch das Weglassen von Thymidin und Tryptophan im Medium, wurde auf fusionierte

Zellen selektioniert. Innerhalb von zwei Monaten, zeigten sich 12 Klone zum Teil oder vollständig rot – das entspricht 0,14 %. Die weißen Klone waren zum Teil in unterschiedlichen Schattierungen gefärbt, die die Elternstämme nicht aufwiesen und für die es zu diesem Zeitpunkt keine Erklärung gibt. Um einen genaueren Einblick in die Vorgänge auf genetischer Ebene zu erhalten, wurden PCRs für vier verschiedene Loci optimiert: den  $P_{fdx-2528mut}$ -Locus, den  $2528$ -Locus, den  $trpA$ -Locus und den  $thyA$ -Locus. Die Temperatur und Zyklenzahl wurde so angepasst, dass im Falle einer Heterozygotie auch bei sehr verschiedenen Anteilen der Allele immer beide detektiert werden können. Insgesamt wurden 10 rote Klone untersucht. Hierfür wurden alle Klone, aus allen vorangegangenen Genkonversionsexperimenten herangezogen und es wurden nur Klone verwendet, bei denen sichergestellt war, dass nur rote Zellen gepickt werden konnten. Vier Klone gehörten zu den obengenannten zwölf. Die Ergebnisse für die Genkonversionsloci entsprachen den Erwartungen. Der Promotor war in allen Zellen vorhanden, genauso wie das intakte  $HVO_{2528}$ . Bei beiden Loci waren die meisten Zellen homozygot, lediglich zwei Zellen wiesen eine Heterozygotie auf. Anschließend wurden 135 weiße Klone untersucht. Wie erwartet wies kein Klon die Kombination aus Promotor und intaktem  $HVO_{2528}$  auf, was die Zelle hätte rot färben müssen. Ein Klon wies keinen Promotor und das zerstörte  $HVO_{2528}$  auf – im Prinzip das genetische „Gegenteil“ eines roten Klons und scheinbar ähnlich selten. Ungefähr die Hälfte der Zellen wies die Kombination aus Promotor und zerstörtem  $HVO_{2528}$  auf, die andere Hälfte das intakte  $HVO_{2528}$  ohne Promotor. Auch hier war die überwiegende Zahl der Zellen homozygot und nur ein kleiner Anteil an einem oder beiden Loci heterozygot.

Obwohl anhand der Anzahl der roten Klone zunächst davon auszugehen war, dass Genkonversion in *Haloferax volcanii* mit geringer Effizienz abläuft, konnte durch die molekularbiologische Analyse der Loci gezeigt werden, dass Genkonversion in *H. volcanii* im Gegenteil hocheffizient ist. Alle Klone zeigten Genkonversion an zumindest einem Locus, in vielen Fällen war die Mehrzahl der untersuchten Loci komplett homozygot, ganz unabhängig davon, ob der Locus unter Selektionsdruck (wie im Fall der auxotrophen/prototrophen Gene) stand oder nicht. Die homologe Rekombinationrate, die neben einem Crossing Over auch zu Genkonversion führen kann, ist sehr unterschiedlich innerhalb von Bakterien und Archaea (Vos und Didelot 2009). Genkonversion hat einen G/C-bias, d.h. es wird bevorzugt das G/C-reiche Allel als Template verwendet. Dies wird hiermit erklärt, dass Mutationen einen A/T-

bias haben, es also wahrscheinlicher ist, dass es sich bei dem G/C-reichen Allel um das richtige handelt (Hershberg und Petrov 2010). Es stellt sich natürlich die Frage, ob Spezies mit einem höheren GC-Anteil in ihrer DNA auch eine effizientere homologe Rekombination haben und in der Tat konnten mehrere Studien eine Korrelation zeigen (Touchon *et al.* 2009; Lassalle *et al.* 2015; Bobay und Ochman 2017). Haloarchaea haben alle einen relativen hohen GC-Anteil in ihrer DNA, in *H. volcanii* beträgt er zum Beispiel 65 % (Hartman *et al.* 2010). Ursprünglich ging man davon aus, dass dieser hohe GC-Anteil das Springen der vielen IS-Elemente innerhalb des Genoms unwahrscheinlicher machen würde, da IS-Elemente eine AT-Präferenz haben (Soppa 2011a), aber möglicherweise hat nicht alleine der Selektionsdruck der IS-Elemente den GC-Gehalt der DNA erhöht, sondern auch effiziente Genkonversion. Jedoch konnte für das Haloarchaeon *Halorubrum* gezeigt werden, dass es im Vergleich zu pathogenen und marinen Bakterien eher eine durchschnittliche homologe Rekombinationsrate besitzt (Papke *et al.* 2004; Vos und Didelot 2009). Allerdings sind vor allem pathogene Mikroorganismen auf eine extrem effiziente Genkonversion angewiesen, die eine schnelle Variation von Oberflächenantigenen erlaubt und so ihr Überleben sichert, weshalb diese Einordnung nicht weiter verwunderlich ist (Santoyo und Romero 2005; Paulsson *et al.* 2017). Für *Haloferax volcanii* und *H. mediteranii* hingegen konnte eine sehr effiziente homologe Rekombination beobachtet werden. Naor und Kollegen (2012) untersuchten inter- und intraspezies Rekombinationstrategien, indem sie ein Mating mit verschiedenen *H. volcanii*-Stämmen und auch *H. volcanii* mit *H. mediteranii* durchführten. Bei einem Mating handelt es sich um eine Form des horizontalen Gentransfers, bei dem die Zellen bei physischer Nähe zueinander Cytoplasmabrücken ausbilden und so ihre Chromosomen übertragen können (Rosenshine *et al.* 1989). Im Gegensatz hierzu ist die Protoplastenfusion ein nicht-natürlicher Vorgang, bei dem die Cytoplasmabrücken durch Magnesiumentzug destabilisiert werden und die Zellen fusionieren (Rosenshine *et al.* 1989; Tchelet und Mevarech 1993). Durch das Mating konnten verschiedene intra- und interspezies Hybride generiert werden. Naor und Kollegen (2012) konnten nachweisen, dass im Fall der intraspezies Hybride es am untersuchten Locus in 62 % der Fälle zu Rekombination kam, im Fall der interspezies Hybride immerhin noch in 8 %. Die Rekombinationsraten, die in dieser Arbeit hier gezeigt werden konnten, überstiegen diese noch, aber die Ergebnisse zeigen, dass *H. volcanii* in der Tat zu sehr

effizienter homologer Rekombination und damit auch Genkonversion in der Lage ist. Da homologe Rekombination durch Doppelstrangbrüche induziert wird und die Rekombinationsrate in *H. volcanii* zu hoch ist, um sie mit zufälligen Doppelstrangbrüchen erklären zu können, ist es möglich, dass *H. volcanii* wie Eukaryoten ein oder mehrere spezialisierte Enzyme hat, die Doppelstrangbrüche gezielt induzieren, wie es z.B. die Topoisomerase-ähnlichen Enzyme (SPO11) in der Meiose tun (Chen *et al.* 2007). Alternativ könnten auch Einzelstrangbrüche zu Genkonversion führen, wie es Holliday ursprünglich für die homologe Rekombination postulierte (Holliday 1964). Am häufigsten werden Einzelstrangbrüche durch Sauerstoffradikale verursacht, aber auch fehlerhaftes Arbeiten von Topoisomerasen oder der Einbau von Ribonukleotiden, die wieder entfernt werden, führen zu Einzelstrangbrüchen (Caldecott 2014). Insgesamt kommen Einzelstrangbrüche deutlich häufiger vor als Doppelstrangbrüche (Caldecott 2014), das könnte also das häufige Auftreten von Genkonversion bei *H. volcanii* erklären.

Dass *H. volcanii* mittels Genkonversion unter Selektionsdruck innerhalb kürzester Zeit homozygot in einem heterozygoten Locus werden kann, konnten Lange und Kollegen bereits 2011 zeigen. Sie konstruierten eine heterozygote Mutante, deren natives Tryptophan-synthese Gen (*trpA*) deletiert war und stattdessen in das Leucin-synthese Gen (*leuB*) inseriert war. Um nun prototroph zu bleiben, musste die Zelle sowohl das native *leuB*-Gen sowie das *leuB*-Gen mit inseriertem *trpA* (*leuB::trpA*) erhalten. Lange und Kollegen untersuchten mittels qPCR, wie viele Genomkopien das native *leuB* enthielten und wie viele das artifizielle Konstrukt aus *leuB::trpA*. Auffällig ist, dass schon zu Beginn des Experiments nur ungefähr nur ein fünftel der Zellen das *leuB::trpA*-Allel aufweist, der Rest *leuB*. Sie konnten dann zeigen, dass bei Zugabe von Tryptophan in das Medium, was gegen *leuB::trpA* selektiert, die Insertion bereits nach vier Tagen verloren gegangen war und die Zellen homozygot für das intakte *leuB* waren. Wenn sie im Gegenzug Leucin supplementierten erhöhte sich der Anteil an *leuB::trpA* deutlich, konnte aber auch nach 37 Tagen das *leuB*-Allel nicht verdrängen. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass für die Wiederherstellung des *leuB*-Allels lediglich 53 bp übertragen werden müssen, für die Generation des *leuB::trpA*-Allels allerdings 958 bp. Bei Zugabe beider Aminosäuren ins Medium war nach neun Tagen das *leuB::trpA*-Allel verdrängt und die Zellen homozygot für *leuB*. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Homozygotie bei den untersuchten Loci für die Auxotrophie/Prototrophie von *trpA* und *thyA* nach zwei Monaten Inkubationszeit

keines falls überraschen ist, auch wenn hier im Gegensatz zu dem Experiment von Lange und Kollegen nicht subkultiviert wurde. Warum der *thyA*-Locus bei den zuerst untersuchten Zellen durchgehend heterozygot und bei den einen Monat später untersuchten Zellen durchgehend homozygot war, ist schwerer zu erklären. Möglicherweise spielt tatsächlich die Zeit eine Rolle, da es aufgrund der Länge der zu übertragenden Sequenz (930 bp) dauert, bis die Zellen tatsächlich homozygot sind – bei Lange und Kollegen waren Zellen, in denen 958 bp für Homozygotie übertragen werden musste nach 37 Tagen ebenfalls nicht homozygot und es ist unbekannt, wie lange es gedauert hätte, bis sie es gewesen wären. Allerdings ist im Gegensatz dazu der *trpA*-Locus schon bei den zuerst untersuchten Zellen überwiegend homozygot, obwohl die zu übertragende Sequenz hier immerhin eine Länge von 779 bp aufweist und damit nicht wesentlich kürzer ist. Die einzige, weitere Untersuchung der Genkonversion in Archaea wurde in *Methanococcus maripaludis* durchgeführt und kommt zu einem vergleichbaren Ergebnis (Hildenbrand *et al.* 2011). Hier wurde das essentielle Gen *selD* durch das Gen *pacN* ersetzt, das eine Puromycin-Resistenz kodiert. Da *selD* essentiell ist, war die Zelle unter Selektionsdruck heterozygot und ähnlich wie in *H. volcanii* war ein Allel (*selD*) nur in geringer Anzahl vorhanden. Hildenbrand und Kollegen untersuchten nun, wie sich das Allelverhältnis unter abnehmendem Selektionsdruck mit verschiedenen Konzentrationen an Puromycin verschob. Gezeigt werden konnte, dass nach 14 Generationen ohne Selektionsdruck das native *selD* das *pacN* fast vollständig ersetzt hatte und dass die Geschwindigkeit dieses Ersatzes proportional war zur Puromycinkonzentration, d.h. auch bei den Zellen mit der geringsten Puromycin-Konzentration hatte die Allelkopienzahl von *selD* die von *pacN* überholt, bei der nächst höheren Konzentration hielten sich die Kopien die Waage und bei der vollen Puromycinkonzentration kam es kaum zu Veränderungen im Vergleich zum Anfang. Dies zeigt, dass der Selektionsdruck einen direkten Einfluss auf die Richtung und auch die Geschwindigkeit der Genkonversion hat. Auch bei *M. maripaludis* hat sich ohne Selektionsdruck das native Gen durchgesetzt – allerdings ist in diesem Fall unbekannt, wie die Größenverhältnisse von *selD* und *pacN* sind, sodass nicht eingeschätzt werden kann, ob hier möglicherweise auch die Länge der zu übertragenden Sequenz einen Einfluss hatte.

Unklar ist, wie genau *H. volcanii* und auch *M. maripaludis* es steuern, dass sich das native Gen gegenüber der artifizialen Deletion/Insertion durchsetzt, wenn damit

ein Wachstumsvorteil verbunden ist. In *Rhizobium etli* konnte gezeigt werden, dass das Allel, das den Doppelstrangbruch erleidet, als Akzeptor dient (Yanez-Cuna *et al.* 2016). Aber selbst wenn *H. volcanii* oder *M. maripaludis* Enzyme besitzen würde, die gezielt Doppelstrangbrüche induzieren könnten, um ein Allel als Akzeptorallel zu definieren, müsste es einen Mechanismus geben, der Auskunft darüber gibt, welches Allel denn das gewünschte ist. Bei der in dieser Arbeit generierten in-frame Mutanten wird sowohl bei der Deletion als auch bei dem intakten Gen eine mRNA synthetisiert und auch translatiert, d. h. es müsste einen Mechanismus geben, der die Funktionalität eines Proteins beurteilt. Nicht nur erscheint das sehr unwahrscheinlich, es konnte auch in nicht-selektierten Loci gezeigt werden, dass sowohl die Expression eines Gens als auch die Funktionalität nicht entscheidend für die Richtung der Genkonversion ist. Viel wahrscheinlicher ist, dass Genkonversion auch hier gleich häufig in beide Richtungen abläuft, gegen die Deletion nur selektiert wird, da ohne das Gen kein Wachstum mehr möglich ist – Zellen, die diesen Weg gegangen sind, können in Experimenten, die mit Selektionsdruck arbeiten, dementsprechend auch nicht detektiert werden. Zwar würde das dafür sprechen, dass die Zellen immer heterozygot blieben, aber da *H. volcanii* eine Vereinheitlichung seines Genoms bevorzugt, kommt es irgendwann zu Homozygotie – sowohl homozygot zur Deletion, als auch homozygot zum intakten Gen, nur das die erste Version kein Wachstum zeigt und damit nicht detektiert werden kann. Diese Vereinheitlichung des Genoms scheint für polyploide Organismen tatsächlich eher die Norm als die Ausnahme zu sein. Neben *H. volcanii* und *M. maripaludis* kann Heterozygotie auch bei Cyanobakterien nur unter Selektionsdruck erzeugt und beibehalten werden (Labarre *et al.* 1989; Spence *et al.* 2004; Takahama *et al.* 2004). Auch das Riesenbakterium *Epulopiscium* mit zum Teil 200.000 Genomkopien homogenisiert - vermutlich über Genkonversion - sein Genom, sodass alle 200.000 Kopien identisch sind (Mendell *et al.* 2008). Im starken Gegensatz hierzu steht ein anderes Riesenbakterium, *A. oxaliferum*, das seine Genome nicht vereinheitlicht (Ionescu *et al.* 2017). Sein Genom enthält nur wenige identische Kopien und wird als so komplex beschrieben, als wäre die Diversität einer kompletten Zellgemeinschaft in einer einzigen Zelle. Warum es *A. oxaliferum* anders macht als bisher alle untersuchten polyploiden Prokaryoten und welchen Vorteil es daraus zieht, ist derzeit unklar.

Dass *H. volcanii* auch ohne Selektionsdruck Genkonversion betreibt, konnten Lange und Kollegen bereits zeigen. Interessant jedoch ist, dass nur ein sehr geringer

Anteil der Genkonversion das Ergebnis eines roten Klons bzw. des Gegenteils ohne Promotor und mit Deletion lieferte. Eine mögliche Ursache ist, dass die übertragene DNA-Sequenz, sogenannte Gene Conversion Tracts, länger ist als der Abstand zwischen Promotor und Deletion (626 bp) ist, sodass immer beides übertragen wird. Über die Länge von Gene Conversion Tracts bei Prokaryoten ist noch nichts bekannt - das liegt vor allem daran, dass Prokaryoten lange als monoploid galten und Genkonversion immer anhand von homologen Genen untersucht wurde, wo der Gene Conversion Tract mit Erreichen des Endes des homologen Bereichs (in diesen Fällen meistens des Gens) endet (Paulsson *et al.* 2017). In Säugetieren haben die Gene Conversion Tracts bei mitotischer Teilung meist eine Länge von 200 bp bis zu 1 kb, bei Hefe sind sie öfters länger als 4 kb (Chen *et al.* 2007). Dass *H. volcanii* kein Problem der Übertragung langer Sequenzen mittels homologer Rekombination hat, konnten die folgenden Beobachtungen zeigen. Nach dem Mating von *H. volcanii* mit *H. mediterranei* konnten Naor und Kollegen zeigen, dass ein Fragment der Größe von 310 bis 530 kb von *H. volcanii*'s Chromosom in das von *H. mediterranei* rekombiniert hatte (Naor *et al.* 2012). Die Deletion von *orc5* führte zur Aufteilung des Hauptchromosoms in zwei Chromosomen mit einer Größe von 2.696 kb und 787 kb und weitere genetische Manipulation provozierte zusätzliche Rearrangements (Ausiannikava *et al.* 2018). Darüber hinaus hat der in dieser Arbeit verwendete Stamm H26 das kleine Chromosom pHV4 mit einer Länge von 636 kb in sein Genom integriert (Hawkins *et al.* 2013). Um sowohl den Promotor als auch die 10 nt Deletion zu übertragen, muss der Gene Conversion Tract nur eine Länge von 626 bp betragen und es besteht die Möglichkeit, dass er in *H. volcanii* im Durchschnitt länger ist. Die roten Klone entstehen in diesem Fall nur, wenn der Anfang oder das Ende eines solchen Gene Conversion Tracts zwischen Promotor und *HVO\_2528*-ORF liegt. Dies würde die geringe Anzahl an roten Klonen bzw. ihrem „Gegensatz“ und der hohen Anzahl der homozygoten Ausgangsloci der Elternstämme erklären. Auch bei den nicht-selektierten Loci zeigt *H. volcanii* die schon bei selektierten Loci gezeigte Präferenz in Richtung Verinheitlichung seines Genoms: in der Hälfte der Fälle entstand homozygot Promotor mit zerstörtem Gen und in der anderen Hälfte homozygot nicht-exprimiertes intaktes Gen. Ob ein Allel exprimiert oder das exprimierte Protein funktional ist, spielt demnach keine Rolle bei der Wahl des Donorallels. Das erklärt auch, warum aus den roten Keilen zum Teil wieder weiße Keile heraus wuchsen. Wie anhand des roten Klon 1 gezeigt (siehe Abb. 37),

müssen die Loci des Promotors oder des Carotinoidbiosynthesegens nicht homozygot vorliegen, um eine sichtbare rote Farbe zu generieren. Aufgrund der fehlenden Richtung der Genkonversion in nicht selektierten Bereichen, kann sie aber auch wieder in die Richtung des fehlenden Promotors oder der 10 nt Deletion im ORF ablaufen, wodurch die Zellen wieder weiß werden. Bei Lange und Kollegen (2011) konnte bei fehlendem Selektionsdruck sehr wohl eine Richtung beobachtet werden, in Richtung des nativen *leuBs*, allerdings ist unklar, ob *H. volcanii* tatsächlich erkennen konnte, dass es sich bei dem *leuB*-Allel um das native Allel handelte und bei *leuB::trpA* um ein artifizielles Konstrukt oder ob die Übertragung von 53 bp im Vergleich zu 958 bp die ökonomischere Lösung war, die Genomkopien aneinander anzugleichen. Bei dem einzigen anderen untersuchten Archaeon, *Methanococcus maripaludis*, verhielt es sich ähnlich (Hildenbrand *et al.* 2011).

In dieser Arbeit ist das Proof-of-Principle dieses Experiments zur Untersuchung von Genkonversion gelungen und bietet nun eine Vielzahl von Möglichkeiten, Genkonversion in *Haloferax volcanii* weiter zu untersuchen und somit zu einem besseren Verständnis in Archaea, aber auch in den anderen Domänen, beizutragen.

## Literaturverzeichnis

- Albers, S. V. und K. F. Jarrell (2015). "The archaeellum: how Archaea swim." Front Microbiol **6**: 23.
- Albers, S. V. und B. H. Meyer (2011). "The archaeal cell envelope." Nat Rev Microbiol **9**(6): 414-426.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und P. Walter (2002). Molekularbiologie der Zelle. Weinheim, Deutschland, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Allers, T., S. Barak, S. Liddell, K. Wardell und M. Mevarech (2010). "Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii*." Appl Environ Microbiol **76**(6): 1759-1769.
- Allers, T. und H. P. Ngo (2003). "Genetic analysis of homologous recombination in Archaea: *Haloferax volcanii* as a model organism." Biochem Soc Trans **31**(Pt 3): 706-710.
- Allers, T., H. P. Ngo, M. Mevarech und R. G. Lloyd (2004). "Development of additional selectable markers for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* based on the *leuB* and *trpA* genes." Appl Environ Microbiol **70**(2): 943-953.
- Amunugama, R. und R. Fishel (2012). Homologous Recombination in Eukaryotes. Progress in Molecular Biology and Translational Science. P. W. Doetsch, Academic Press. **110**: 155-206.
- Angert, E. R. (2012). "DNA replication and genomic architecture of very large bacteria." Annual Review of Microbiology **66**: 197-212.
- Ausiannikava, D. und T. Allers (2017). "Diversity of DNA Replication in the Archaea." Genes (Basel) **8**(2).
- Ausiannikava, D., L. Mitchell, H. Marriott, V. Smith, M. Hawkins, K. S. Makarova, E. V. Koonin, C. A. Nieduszynski und T. Allers (2018). "Evolution of Genome Architecture in Archaea: Spontaneous Generation of a New Chromosome in *Haloferax volcanii*." Mol Biol Evol.
- Ausiannikava, D., C. A. Nieduszynski und T. Allers (2016). Investigating the regulatory circuits formed by archaeal origin recognition (ORC) proteins. Molecular Biology of Archaea, London.
- Babski, J., K. A. Haas, D. Nather-Schindler, F. Pfeiffer, K. U. Forstner, M. Hammelmann, R. Hilker, A. Becker, C. M. Sharma, A. Marchfelder und J. Soppa

- (2016). "Genome-wide identification of transcriptional start sites in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* based on differential RNA-Seq (dRNA-Seq)." BMC Genomics **17**(1): 629.
- Baker, B. J., L. R. Comolli, G. J. Dick, L. J. Hauser, D. Hyatt, B. D. Dill, M. L. Land, N. C. Verberkmoes, R. L. Hettich und J. F. Banfield (2010). "Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(19): 8806-8811.
- Baliga, N. S., R. Bonneau, M. T. Facciotti, M. Pan, G. Glusman, E. W. Deutsch, P. Shannon, Y. Chiu, R. S. Weng, R. R. Gan, P. Hung, S. V. Date, E. Marcotte, L. Hood und W. V. Ng (2004). "Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea." Genome Res **14**(11): 2221-2234.
- Barns, S. M., C. F. Delwiche, J. D. Palmer und N. R. Pace (1996). "Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(17): 9188-9193.
- Barry, E. R. und S. D. Bell (2006). "DNA replication in the archaea." Microbiol Mol Biol Rev **70**(4): 876-887.
- Barthelme, D. und R. T. Sauer (2012). "Identification of the Cdc48\*20S proteasome as an ancient AAA+ proteolytic machine." Science **337**(6096): 843-846.
- Bell, S. D. (2012). "Archaeal orc1/cdc6 proteins." Subcell Biochem **62**: 59-69.
- Berquist, B. R., P. DasSarma und S. DasSarma (2007). "Essential and non-essential DNA replication genes in the model halophilic Archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1." BMC Genet **8**: 31.
- Bitan-Banin, G., R. Ortenberg und M. Mevarech (2003). "Development of a Gene Knockout System for the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* by Use of the *pyrE* Gene." J Bacteriol **185**: 772-778.
- Bobay, L. M. und H. Ochman (2017). "Impact of Recombination on the Base Composition of Bacteria and Archaea." Mol Biol Evol **34**(10): 2627-2636.
- Böttinger, B., F. Semmler, K. Zerulla, K. Ludt und J. Soppa (2018). "Regulated ploidy of *Bacillus subtilis* and three new isolates of *Bacillus* and *Paenibacillus*." FEMS Microbiol Lett **365**(4).
- Breuert, S., T. Allers, G. Spohn und J. Soppa (2006). "Regulated polyploidy in halophilic archaea." PLoS One **1**: e92.

- Brochier-Armanet, C., B. Boussau, S. Gribaldo und P. Forterre (2008). "Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota." Nature reviews. Microbiology **6**(3): 245-252.
- Caetano-Anolles, G., A. Nasir, K. Zhou, D. Caetano-Anolles, J. E. Mittenthal, F. J. Sun und K. M. Kim (2014). "Archaea: the first domain of diversified life." Archaea **2014**: 590214.
- Caldecott, K. W. (2014). "DNA single-strand break repair." Exp Cell Res **329**(1): 2-8.
- Capes, M. D., J. A. Coker, R. Gessler, V. Grinblat-Huse, S. L. DasSarma, C. G. Jacob, J. M. Kim, P. DasSarma und S. DasSarma (2011). "The information transfer system of halophilic archaea." Plasmid **65**(2): 77-101.
- Cavicchioli, R., P. M. Curmi, N. Saunders und T. Thomas (2003). "Pathogenic archaea: do they exist?" BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology **25**(11): 1119-1128.
- Chao, D. Y., B. Dilkes, H. Luo, A. Douglas, E. Yakubova, B. Lahner und D. E. Salt (2013). "Polyploids exhibit higher potassium uptake and salinity tolerance in *Arabidopsis*." Science **341**(6146): 658-659.
- Chen, J. M., D. N. Cooper, N. Chuzhanova, C. Ferec und G. P. Patrinos (2007). "Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease." Nat Rev Genet **8**(10): 762-775.
- Chroňáková, A., J. Ascher, J. Jirout, M. T. Ceccherini, D. Elhottová, G. Pietramellara und M. Šimek (2013). "Cattle impact on composition of archaeal, bacterial, and fungal communities by comparative fingerprinting of total and extracellular DNA." Biology and Fertility of Soils(49): 351–361.
- Comai, L. (2005). "The advantages and disadvantages of being polyploid." Nat Rev Genet **6**(11): 836-846.
- Conway de Macario, E. und A. J. Macario (2009). "Methanogenic archaea in health and disease: a novel paradigm of microbial pathogenesis." International journal of medical microbiology : IJMM **299**(2): 99-108.
- Crow, J. F. (2005). "Timeline: Hermann Joseph Muller, evolutionist." Nat Rev Genet **6**(12): 941-945.
- Cubonova, L., T. Richardson, B. W. Burkhart, Z. Kelman, B. A. Connolly, J. N. Reeve und T. J. Santangelo (2013). "Archaeal DNA polymerase D but not DNA polymerase B is required for genome replication in *Thermococcus kodakarensis*." J Bacteriol **195**(10): 2322-2328.

- Delmas, S., L. Shunburne, H. P. Ngo und T. Allers (2009). "Mre11-Rad50 promotes rapid repair of DNA damage in the polyploid archaeon *Haloferax volcanii* by restraining homologous recombination." PLoS Genet **5**(7): e1000552.
- Dueber, E. L., J. E. Corn, S. D. Bell und J. M. Berger (2007). "Replication origin recognition and deformation by a heterodimeric archaeal Orc1 complex." Science **317**(5842): 1210-1213.
- Duggin, I. G., N. Dubarry und S. D. Bell (2011). "Replication termination and chromosome dimer resolution in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*." EMBO J **30**(1): 145-153.
- Egorova, K. und G. Antranikian (2007). Biotechnology. Archaea: Evolution, Physiology, and Molecular Biology. R. A. Garrett und H. Klenk. Victoria, Australia, Blackwell Publishing: 295-322.
- Eme, L. und W. F. Doolittle (2015). "Archaea." Curr Biol **25**(19): R851-855.
- Evrin, C., P. Clarke, J. Zech, R. Lurz, J. Sun, S. Uhle, H. Li, B. Stillman und C. Speck (2009). "A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(48): 20240-20245.
- Falb, M., F. Pfeiffer, P. Palm, K. Rodewald, V. Hickmann, J. Tittor und D. Oesterhelt (2005). "Living with two extremes: conclusions from the genome sequence of *Natronomonas pharaonis*." Genome Res **15**(10): 1336-1343.
- Fishelson, L., W. L. Montgomery und A. A. Myrberg (1985). "A unique symbiosis in the gut of tropical herbivorous surgeonfish (acanthuridae: teleostei) from the red sea." Science **229**(4708): 49-51.
- Forterre, P. (2013). "The common ancestor of archaea and eukarya was not an archaeon." Archaea **2013**: 372396.
- Fox, G. E., L. J. Magrum, W. E. Balch, R. S. Wolfe und C. R. Woese (1977). "Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **74**(10): 4537-4541.
- Frey, J. C., A. N. Pell, R. Berthiaume, H. Lapierre, S. Lee, J. K. Ha, J. E. Mendell und E. R. Angert (2010). "Comparative studies of microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows." Journal of applied microbiology **108**(6): 1982-1993.

- Galtier, N. und L. Duret (2007). "Adaptation or biased gene conversion? Extending the null hypothesis of molecular evolution." Trends Genet **23**(6): 273-277.
- Gaudier, M., B. S. Schuwirth, S. L. Westcott und D. B. Wigley (2007). "Structural basis of DNA replication origin recognition by an ORC protein." Science **317**(5842): 1213-1216.
- Gibson, D. G., L. Young, R. Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, 3rd und H. O. Smith (2009). "Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases." Nat Methods **6**(5): 343-345.
- Gietz, R. D. und R. H. Schiestl (2007). "Frozen competent yeast cells that can be transformed with high efficiency using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method." Nat Protoc **2**(1): 1-4.
- Grant, W. D., R. T. Gemmell und T. J. McGenity (1998). "Halobacteria: the evidence for longevity." Extremophiles **2**(3): 279-287.
- Griese, M., C. Lange und J. Soppa (2011). "Ploidy in cyanobacteria." FEMS Microbiol Lett **323**(2): 124-131.
- Hammelmann, M. und J. Soppa (2008). "Optimized generation of vectors for the construction of *Haloferax volcanii* deletion mutants." J Microbiol Methods **75**(2): 201-204.
- Hansen, M. T. (1978). "Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans*." J Bacteriol **134**(1): 71-75.
- Hanson, P. I. und S. W. Whiteheart (2005). "AAA+ proteins: have engine, will work." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(7): 519-529.
- Hartman, A. L., C. Norais, J. H. Badger, S. Delmas, S. Haldenby, R. Madupu, J. Robinson, H. Khouri, Q. Ren, T. M. Lowe, J. Maupin-Furlow, M. Pohlschroder, C. Daniels, F. Pfeiffer, T. Allers und J. A. Eisen (2010). "The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon." PLoS One **5**(3): e9605.
- Hastings, P. J. (2010). "Mechanisms of ectopic gene conversion." Genes (Basel) **1**(3): 427-439.
- Hawkins, M., S. Malla, M. J. Blythe, C. A. Nieduszynski und T. Allers (2013). "Accelerated growth in the absence of DNA replication origins." Nature **503**(7477): 544-547.
- Head, I. M., N. D. Gray, H. Babenzien und F. Oliver Glockner (2000). "Uncultured giant sulfur bacteria of the genus *Achromatium*." FEMS Microbiol Ecol **33**(3): 171-180.

- Hershberg, R. und D. A. Petrov (2010). "Evidence That Mutation Is Universally Biased towards AT in Bacteria." PLoS Genetics **6**.
- Hildenbrand, C., T. Stock, C. Lange, M. Rother und J. Soppa (2011). "Genome copy numbers and gene conversion in methanogenic archaea." J Bacteriol **193**(3): 734-743.
- Holliday, R. (1964). "A mechanism for gene conversion." Genetical Research **5**: 282-246.
- Hopkins, B. B. und T. T. Paull (2008). "The *P. furiosus* mre11/rad50 complex promotes 5' strand resection at a DNA double-strand break." Cell **135**(2): 250-260.
- Huber, H., M. J. Hohn, K. O. Stetter und R. Rachel (2003). "The phylum Nanoarchaeota: present knowledge and future perspectives of a unique form of life." Research in microbiology **154**(3): 165-171.
- Ionescu, D., M. Bizic-Ionescu, N. De Maio, H. Cypionka und H. P. Grossart (2017). "Community-like genome in single cells of the sulfur bacterium *Achromatium oxaliferum*." Nat Commun **8**(1): 455.
- Ishino, S., L. M. Kelman, Z. Kelman und Y. Ishino (2013). "The archaeal DNA replication machinery: past, present and future." Genes Genet Syst **88**(6): 315-319.
- Ishino, Y. und S. Ishino (2012). "Rapid progress of DNA replication studies in Archaea, the third domain of life." Sci China Life Sci **55**(5): 386-403.
- Jaakkola, S. T., K. Zerulla, Q. Guo, Y. Liu, H. Ma, C. Yang, D. H. Bamford, X. Chen, J. Soppa und H. M. Oksanen (2014). "Halophilic archaea cultivated from surface sterilized middle-late eocene rock salt are polyploid." PLoS One **9**(10): e110533.
- Janni re, L., D. Canceill, C. Suski, S. Kanga, B. Dalmais, R. Lestini, A.-F. Monnier, J. Chapuis, A. Bolotin, M. Titok, E. L. Chatelier und S. D. Ehrlich (2007). "Genetic Evidence for a Link Between Glycolysis and DNA Replication." PLoS ONE **2**.
- Jantzer, K., K. Zerulla und J. Soppa (2011). "Phenotyping in the archaea: optimization of growth parameters and analysis of mutants of *Haloferax volcanii*." FEMS Microbiol Lett **322**(2): 123-130.
- Kelman, L. M. und Z. Kelman (2003). "Archaea: an archetype for replication initiation studies?" Mol Microbiol **48**(3): 605-615.
- Khakhlova, O. und R. Bock (2006). "Elimination of deleterious mutations in plastid genomes by gene conversion." Plant J **46**(1): 85-94.

- Kish, A. und J. DiRuggiero (2008). "Rad50 is not essential for the Mre11-dependent repair of DNA double-strand breaks in *Halobacterium* sp. strain NRC-1." J Bacteriol **190**(15): 5210-5216.
- Klenk, H. (2007). Features of genomes. Archaea: Evolution, Physiology, and Molecular Biology. R. A. Garrett und H. Klenk. Victoria, Australia, Blackwell Publishing: 75-94.
- Komori, K., S. Sakae, H. Daiyasu, H. Toh, K. Morikawa, H. Shinagawa und Y. Ishino (2000). "Mutational analysis of the *Pyrococcus furiosus* holliday junction resolvase hjc revealed functionally important residues for dimer formation, junction DNA binding, and cleavage activities." J Biol Chem **275**(51): 40385-40391.
- Komori, K., S. Sakae, H. Shinagawa, K. Morikawa und Y. Ishino (1999). "A Holliday junction resolvase from *Pyrococcus furiosus*: functional similarity to Escherichia coli RuvC provides evidence for conserved mechanism of homologous recombination in Bacteria, Eukarya, and Archaea." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 8873-8878.
- Kottemann, M., A. Kish, C. Iloanusi, S. Bjork und J. DiRuggiero (2005). "Physiological responses of the halophilic archaeon *Halobacterium* sp. strain NRC1 to desiccation and gamma irradiation." Extremophiles **9**(3): 219-227.
- Labarre, J., F. Chauvat und P. Thuriaux (1989). "Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803." J Bacteriol **171**(6): 3449-3457.
- Lam, W. L. und W. F. Doolittle (1989). "Shuttle vectors for the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(14): 5478-5482.
- Lange, C., K. Zerulla, S. Breuert und J. Soppa (2011). "Gene conversion results in the equalization of genome copies in the polyploid haloarchaeon *Haloferax volcanii*." Mol Microbiol **80**(3): 666-677.
- Large, A., C. Stamme, C. Lange, Z. Duan, T. Allers, J. Soppa und P. A. Lund (2007). "Characterization of a tightly controlled promoter of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and its use in the analysis of the essential *cct1* gene." Mol Microbiol **66**(5): 1092-1106.
- Lassalle, F., S. Perian, T. Bataillon, X. Nesme, L. Duret und V. Daubin (2015). "GC-Content evolution in bacterial genomes: the biased gene conversion hypothesis expands." PLoS Genet **11**(2): e1004941.

- Lepp, P. W., M. M. Brinig, C. C. Ouverney, K. Palm, G. C. Armitage und D. A. Relman (2004). "Methanogenic Archaea and human periodontal disease." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(16): 6176-6181.
- Lestini, R., F. Delpech und H. Myllykallio (2015). "DNA replication restart and cellular dynamics of Hef helicase/nuclease protein in *Haloferax volcanii*." Biochimie **118**: 254-263.
- Lestini, R., Z. Duan und T. Allers (2010). "The archaeal Xpf/Mus81/FANCM homolog Hef and the Holliday junction resolvase Hjc define alternative pathways that are essential for cell viability in *Haloferax volcanii*." DNA Repair (Amst) **9**(9): 994-1002.
- Lestini, R., S. P. Laptinok, J. Kuhn, M. A. Hink, M. C. Schanne-Klein, U. Liebl und H. Myllykallio (2013). "Intracellular dynamics of archaeal FANCM homologue Hef in response to halted DNA replication." Nucleic Acids Res **41**(22): 10358-10370.
- Li, Z., T. J. Santangelo, L. Cubonova, J. N. Reeve und Z. Kelman (2010). "Affinity purification of an archaeal DNA replication protein network." MBio **1**(5).
- Lindås, A.-C. und R. Bernander (2013). "The cell cycle of archaea." Nature Reviews Microbiology **11**: 627-638.
- Lizier, M., A. Castelli, C. Montagna, F. Lucchini, P. Vezzone und F. Faggioli (2018). "Cell fusion in the liver, revisited." World J Hepatol **10**(2): 213-221.
- Lu, F., X. Wu, F. Yin, C. Chia-Fang Lee, M. Yu, I. S. Mihaylov, J. Yu, H. Sun und H. Zhang (2016). "Regulation of DNA replication and chromosomal polyploidy by the MLL-WDR5-RBBP5 methyltransferases." Biol Open **5**(10): 1449-1460.
- Lundgren, M., A. Andersson, L. Chen, P. Nilsson und R. Bernander (2004). "Three replication origins in *Sulfolobus* species: synchronous initiation of chromosome replication and asynchronous termination." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(18): 7046-7051.
- Mackwan, R. R., G. T. Carver, J. W. Drake und D. W. Grogan (2007). "An unusual pattern of spontaneous mutations recovered in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*." Genetics **176**(1): 697-702.
- Madigan, M. T. und J. M. Martinko (2009). Brock Mikrobiologie. München, Deutschland, Pearson Studium.
- Magnan, D. und D. Bates (2015). "Regulation of DNA Replication Initiation by Chromosome Structure." J Bacteriol **197**(21): 3370-3377.

- Makarova, K. S. und E. V. Koonin (2013). "Archaeology of eukaryotic DNA replication." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(11): a012963.
- Malandrin, L., H. Huber und R. Bernander (1999). "Nucleoid structure and partition in *Methanococcus jannaschii*: an archaeon with multiple copies of the chromosome." Genetics **152**(4): 1315-1323.
- Markov, A. V. und I. S. Kaznacheev (2016). "Evolutionary consequences of polyploidy in prokaryotes and the origin of mitosis and meiosis." Biol Direct **11**: 28.
- Matsunaga, F., A. Glatigny, M. H. Mucchielli-Giorgi, N. Agier, H. Delacroix, L. Marisa, P. Durosay, Y. Ishino, L. Aggerbeck und P. Forterre (2007). "Genomewide and biochemical analyses of DNA-binding activity of Cdc6/Orc1 and Mcm proteins in *Pyrococcus* sp." Nucleic Acids Res **35**(10): 3214-3222.
- Matsunaga, F., K. Takemura, M. Akita, A. Adachi, T. Yamagami und Y. Ishino (2010). "Localized melting of duplex DNA by Cdc6/Orc1 at the DNA replication origin in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*." Extremophiles **14**(1): 21-31.
- Mattimore, V. und J. R. Battista (1996). "Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation." J Bacteriol **178**(3): 633-637.
- Mattioli, F., S. Bhattacharyya, P. N. Dyer, A. E. White, K. Sandman, B. W. Burkhardt, K. R. Byrne, T. Lee, N. G. Ahn, T. J. Santangelo, J. N. Reeve und K. Luger (2017). "Structure of histone-based chromatin in Archaea." Science **357**(6351): 609-612.
- Maurer, S. (2015). Einfluss der oriC1- und oriC2-Regionen auf die Genomkopienzahlen-Regulation in *Haloferax volcanii*. Institut für Biowissenschaften. Frankfurt am Main, Johann Wolfgang von Goethe-Universität.  
**Master of Science.**
- Maurer, S., K. Ludt und J. Soppa (2018). "Characterization of Copy Number Control of Two *Haloferax volcanii* Replication Origins Using Deletion Mutants and Haloarchaeal Artificial Chromosomes." J Bacteriol **200**(1).
- Mendell, J. E., K. D. Clements, J. H. Choat und E. R. Angert (2008). "Extreme polyploidy in a large bacterium." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(18): 6730-6734.
- Meng, J., J. Xu, D. Qin, Y. He, X. Xiao und F. Wang (2014). "Genetic and functional properties of uncultivated MCG archaea assessed by metagenome and gene expression analyses." ISME J **8**(3): 650-659.
- Mevarech, M. und R. Werczberger (1985). "Genetic transfer in *Halobacterium volcanii*." J Bacteriol **162**(1): 461-462.

- Moghe, G. D. und S. H. Shiu (2014). "The causes and molecular consequences of polyploidy in flowering plants." Ann N Y Acad Sci **1320**: 16-34.
- Montgomery, W. L. und P. E. Pollak (1988). "*Epulopiscium fishelsoni* N. G., N. Sp., a Protist of Uncertain Taxonomic Affinities from the Gut of an Herbivorous Reef Fish1." The Journal of Protozoology **35**: 565-569.
- Moran-Reyna, A. und J. A. Coker (2014). "The effects of extremes of pH on the growth and transcriptomic profiles of three haloarchaea." F1000Res **3**: 168.
- Moretti, S., F. Armougom, I. M. Wallace, D. G. Higgins, C. V. Jongeneel und C. Notredame (2007). "The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W645-648.
- Mullakhanbhai, M. F. und H. Larsen (1975). "*Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement." Arch Microbiol **104**(3): 207-214.
- Myllykallio, H., P. Lopez, P. Lopez-Garcia, R. Heilig, W. Saurin, Y. Zivanovic, H. Philippe und P. Forterre (2000). "Bacterial mode of replication with eukaryotic-like machinery in a hyperthermophilic archaeon." Science **288**(5474): 2212-2215.
- Naor, A., P. Lapierre, M. Mevarech, R. T. Papke und U. Gophna (2012). "Low species barriers in halophilic archaea and the formation of recombinant hybrids." Curr Biol **22**(15): 1444-1448.
- Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge und E. V. Koonin (1999). "AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes." Genome Res **9**(1): 27-43.
- Norais, C., M. Hawkins, A. L. Hartman, J. A. Eisen, H. Myllykallio und T. Allers (2007). "Genetic and physical mapping of DNA replication origins in *Haloferax volcanii*." PLoS Genet **3**(5): e77.
- Nunoura, T., Y. Takaki, J. Kakuta, S. Nishi, J. Sugahara, H. Kazama, G. J. Chee, M. Hattori, A. Kanai, H. Atomi, K. Takai und H. Takami (2011). "Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group." Nucleic Acids Res **39**(8): 3204-3223.
- O'Donnell, M., L. Langston und B. Stillman (2013). "Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(7).

- Offre, P., A. Spang und C. Schleper (2013). "Archaea in biogeochemical cycles." Annu Rev Microbiol **67**: 437-457.
- Otto, S. P. (2007). "The evolutionary consequences of polyploidy." Cell **131**(3): 452-462.
- Papke, R. T., J. E. Koenig, F. Rodriguez-Valera und W. F. Doolittle (2004). "Frequent recombination in a saltern population of *Halorubrum*." Science **306**(5703): 1928-1929.
- Paulsson, J., M. El Karoui, M. Lindell und D. Hughes (2017). "The processive kinetics of gene conversion in bacteria." Mol Microbiol **104**(5): 752-760.
- Pecoraro, V., K. Zerulla, C. Lange und J. Soppa (2011). "Quantification of ploidy in proteobacteria revealed the existence of monoploid, (mero-)oligoploid and polyploid species." PLoS One **6**(1): e16392.
- Pelve, E. A., W. Martens-Habbena, D. A. Stahl und R. Bernander (2013). "Mapping of active replication origins in vivo in thaum- and euryarchaeal replicons." Mol Microbiol **90**(3): 538-550.
- Raymann, K., P. Forterre, C. Brochier-Armanet und S. Gribaldo (2014). "Global phylogenomic analysis disentangles the complex evolutionary history of DNA replication in archaea." Genome Biol Evol **6**(1): 192-212.
- Remus, D., F. Beuron, G. Tolun, J. D. Griffith, E. P. Morris und J. F. Diffley (2009). "Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing." Cell **139**(4): 719-730.
- Rinke, C., P. Schwientek, A. Sczyrba, N. N. Ivanova, I. J. Anderson, J. F. Cheng, A. Darling, S. Malfatti, B. K. Swan, E. A. Gies, J. A. Dodsworth, B. P. Hedlund, G. Tsiamis, S. M. Sievert, W. T. Liu, J. A. Eisen, S. J. Hallam, N. C. Kyrpides, R. Stepanauskas, E. M. Rubin, P. Hugenholtz und T. Woyke (2013). "Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter." Nature **499**(7459): 431-437.
- Robinson, N. P. und S. D. Bell (2007). "Extrachromosomal element capture and the evolution of multiple replication origins in archaeal chromosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 5806-5811.
- Robinson, N. P., I. Dionne, M. Lundgren, V. L. Marsh, R. Bernander und S. D. Bell (2004). "Identification of two origins of replication in the single chromosome of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*." Cell **116**(1): 25-38.

- Ronnekleiv, M. (1995). "Bacterial carotenoids 53\* C50-carotenoids 23; carotenoids of *Haloferax volcanii* versus other halophilic bacteria." Biochemical Systematics and Ecology **23**: 627-634.
- Rosenshine, I., R. Tchelet und M. Mevarech (1989). "The mechanism of DNA transfer in the mating system of an archaeobacterium." Science **245**(4924): 1387-1389.
- Rouillon, C. und M. F. White (2010). "The XBP-Bax1 helicase-nuclease complex unwinds and cleaves DNA: implications for eukaryal and archaeal nucleotide excision repair." J Biol Chem **285**(14): 11013-11022.
- Saccucci, M. J., R. D. Denton, M. L. Holding und H. L. Gibbs (2016). "Polyploid unisexual salamanders have higher tissue regeneration rates than diploid sexual relatives." Journal of Zoology **300**: 77-81.
- Samson, Rachel Y., Priyanka D. Abeyrathne und Stephen D. Bell (2016). "Mechanism of Archaeal MCM Helicase Recruitment to DNA Replication Origins." Molecular Cell **61**: 287-296.
- Samson, R. Y., Y. Xu, C. Gadelha, T. A. Stone, J. N. Faqiri, D. Li, N. Qin, F. Pu, Y. X. Liang, Q. She und S. D. Bell (2013). "Specificity and function of archaeal DNA replication initiator proteins." Cell Rep **3**(2): 485-496.
- Santos, T. M., R. V. Pereira, L. S. Caixeta, C. L. Guard und R. C. Bicalho (2012). "Microbial diversity in bovine papillomatous digital dermatitis in Holstein dairy cows from upstate New York." FEMS microbiology ecology **79**(2): 518-529.
- Santoyo, G. und D. Romero (2005). "Gene conversion and concerted evolution in bacterial genomes." FEMS Microbiol Rev **29**(2): 169-183.
- Sarmiento, F., J. Mrazek und W. B. Whitman (2013). "Genome-scale analysis of gene function in the hydrogenotrophic methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(12): 4726-4731.
- Schmitt, J. (2014). Translationsregulation des halophilen Archaeon *Haloferax volcanii*. Institut für Biowissenschaften. Frankfurt am Main, Johann Wolfgang Goethe-Universität. **Dr. rer. nat.**
- Schneider, D., E. Fuhrmann, I. Scholz, W. R. Hess und P. L. Graumann (2007). "Fluorescence staining of live cyanobacterial cells suggest non-stringent chromosome segregation and absence of a connection between cytoplasmic and thylakoid membranes." BMC Cell Biol **8**: 39.

- Skarstad, K., H. B. Steen und E. Boye (1983). "Cell cycle parameters of slowly growing *Escherichia coli* B/r studied by flow cytometry." J Bacteriol **154**(2): 656-662.
- Soppa, J. (2006). "From genomes to function: haloarchaea as model organisms." Microbiology **152**(Pt 3): 585-590.
- Soppa, J. (2011a). "Functional genomic and advanced genetic studies reveal novel insights into the metabolism, regulation, and biology of *Haloferax volcanii*." Archaea **2011**: 602408.
- Soppa, J. (2011b). "Ploidy and gene conversion in Archaea." Biochem Soc Trans **39**(1): 150-154.
- Soppa, J. (2013). "Evolutionary advantages of polyploidy in halophilic archaea." Biochem Soc Trans **41**(1): 339-343.
- Soppa, J. (2014). "Polyploidy in archaea and bacteria: about desiccation resistance, giant cell size, long-term survival, enforcement by a eukaryotic host and additional aspects." J Mol Microbiol Biotechnol **24**(5-6): 409-419.
- Soppa, J. (2017). "Polyploidy and community structure." Nat Microbiol **2**: 16261.
- Spaans, S. K., J. van der Oost und S. W. Kengen (2015). "The chromosome copy number of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1." Extremophiles **19**(4): 741-750.
- Spang, A., J. H. Saw, S. L. Jorgensen, K. Zaremba-Niedzwiedzka, J. Martijn, A. E. Lind, R. van Eijk, C. Schleper, L. Guy und T. J. G. Ettema (2015). "Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes." Nature **521**(7551): 173-179.
- Spence, E., S. Bailey, A. Nenninger, S. G. Moller und C. Robinson (2004). "A homolog of Albino3/Oxal is essential for thylakoid biogenesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803." J Biol Chem **279**(53): 55792-55800.
- Spies, M. und S. Kowalczykowski (2004). "Homologous recombination by RecBCD and RecF pathways." The Bacterial Chromosome **3**.
- Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein und F. W. Stahl (1983). "The double-strand-break repair model for recombination." Cell **33**(1): 25-35.
- Takahama, K., M. Matsuoka, K. Nagahama und T. Ogawa (2004). "High-frequency gene replacement in cyanobacteria using a heterologous *rps12* gene." Plant Cell Physiol **45**(3): 333-339.

- Tate, J. A., D. E. Soltis und P. S. Soltis (2005). Polyploidy in Plants. The Evolution of the Genome. T. R. Gregory. Burlington, Academic Press: 371-426.
- Tchelet, R. und M. Mevarech (1993). "Interspecies Genetic Transfer in Halophilic Archaeobacteria." Systematic and Applied Microbiology **16**: 578-581.
- Touchon, M., C. Hoede, O. Tenaillon, V. Barbe, S. Baeriswyl, P. Bidet, E. Bingen, S. Bonacorsi, C. Bouchier, O. Bouvet, A. Calteau, H. Chiapello, O. Clermont, S. Cruveiller, A. Danchin, M. Diard, C. Dossat, M. E. Karoui, E. Frapy, L. Garry, J. M. Ghigo, A. M. Gilles, J. Johnson, C. Le Bouguenec, M. Lescat, S. Mangenot, V. Martinez-Jehanne, I. Matic, X. Nassif, S. Oztas, M. A. Petit, C. Pichon, Z. Rouy, C. S. Ruf, D. Schneider, J. Tourret, B. Vacherie, D. Vallenet, C. Medigue, E. P. Rocha und E. Denamur (2009). "Organised genome dynamics in the Escherichia coli species results in highly diverse adaptive paths." PLoS Genet **5**(1): e1000344.
- Vos, M. und X. Didelot (2009). "A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea." ISME J **3**(2): 199-208.
- Vreeland, R. H., J. Jones, A. Monson, W. D. Rosenzweig, T. K. Lowenstein, M. Timofeeff, C. Satterfield, B. C. Cho, J. S. Park, A. Wallace und W. D. Grant (2007). "Isolation of Live Cretaceous (121–112 Million Years Old) Halophilic Archaea from Primary Salt Crystals." Geomicrobiology Journal **24**: 275-282.
- Wang, J. D., G. M. Sanders und A. D. Grossman (2007). "Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp." Cell **128**(5): 865-875.
- Watanabe, S., R. Ohbayashi, Y. Kanesaki, N. Saito, T. Chibazakura, T. Soga und H. Yoshikawa (2015). "Intensive DNA Replication and Metabolism during the Lag Phase in Cyanobacteria." PLoS One **10**(9): e0136800.
- Webb, C. D., P. L. Graumann, J. A. Kahana, A. A. Teleman, P. A. Silver und R. Losick (1998). "Use of time-lapse microscopy to visualize rapid movement of the replication origin region of the chromosome during the cell cycle in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **28**(5): 883-892.
- White, M. F. (2011). "Homologous recombination in the archaea: the means justify the ends." Biochem Soc Trans **39**(1): 15-19.
- Willey, J. M., L. M. Sherwood und C. J. Woolverton (2008). Prescott, Harley, and Klein's Microbiology, 7th Edition. New York City, USA, McGraw-Hill.
- Woese, C. R., O. Kandler und M. L. Wheelis (1990). "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya."

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87**(12): 4576-4579.
- Woods, W. G. und M. L. Dyll-Smith (1997). "Construction and analysis of a recombination-deficient (*radA*) mutant of *Haloferax volcanii*." Mol Microbiol **23**(4): 791-797.
- Wu, Z., J. Liu, H. Yang, H. Liu und H. Xiang (2014a). "Multiple replication origins with diverse control mechanisms in *Haloarcula hispanica*." Nucleic Acids Res **42**(4): 2282-2294.
- Wu, Z., J. Liu, H. Yang und H. Xiang (2014b). "DNA replication origins in archaea." Front Microbiol **5**: 179.
- Yanez-Cuna, F. O., M. Castellanos und D. Romero (2016). "Biased Gene Conversion in *Rhizobium etli* Is Caused by Preferential Double-Strand Breaks on One of the Recombining Homologs." J Bacteriol **198**(3): 591-599.
- Zahradka, K., D. Slade, A. Bailone, S. Sommer, D. Averbek, M. Petranovic, A. B. Lindner und M. Radman (2006). "Reassembly of shattered chromosomes in *Deinococcus radiodurans*." Nature **443**(7111): 569-573.
- Zerulla, K. (2014). Untersuchung der Polyploidie in Prokaryoten. Institut für Biowissenschaften. Frankfurt am Main, Johann Wolfgang Goethe-Universität. **Dr. rer. nat.**
- Zerulla, K., A. Baumann und J. Soppa (2014a). Cell Cycle and Polyploidy in Haloarchaea. Halophiles: Genetics and Genomes. R. Thane Papke und A. Oren. U.K., Caister Academic Press.
- Zerulla, K., S. Chimileski, D. Nather, U. Gophna, R. T. Papke und J. Soppa (2014b). "DNA as a phosphate storage polymer and the alternative advantages of polyploidy for growth or survival." PLoS One **9**(4): e94819.
- Zerulla, K., K. Ludt und J. Soppa (2016). "The ploidy level of *Synechocystis* sp. PCC 6803 is highly variable and is influenced by growth phase and by chemical and physical external parameters." Microbiology **162**(5): 730-739.
- Zhou, G., D. Kowalczyk, M. A. Humbard, S. Rohatgi und J. A. Maupin-Furlow (2008). "Proteasomal components required for cell growth and stress responses in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*." J Bacteriol **190**(24): 8096-8105.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jörg Soppa für die Möglichkeit bedanken, an diesem interessanten Thema zu arbeiten, und für die Bereitstellung aller notwendigen Einrichtungen und Materialien. Darüber hinaus möchte ich mich für die vielen Ideen bedanken, die Geduld, wenn es im Labor nicht so lief wie es sollte und für die Begeisterung für mein Thema.

Herrn Prof. Dr. Eckhard Boles danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Erlaubnis, die Protokolle für das Gibson-Assembly und das Gap Repair Cloning mit *S. cerevisiae* von Ihrer Arbeitsgruppe übernehmen zu dürfen.

Ein weiterer Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Soppa, für lehrreiche Jahre und viele lustige Gespräche. Mein Dank gilt insbesondere Mathias Hammelmann, für Tipps und Tricks zu Methoden aller Art und die gemeinsamen Abende in getrennten Laboren mit Konstrastmusik. Bei Margo Genzmer möchte ich mich für die bürokratische Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken und dafür, dass Sie nie ein Blatt vor den Mund nehmen. Herzlicher Dank geht auch an meine Mitstreiter Matthias Lehr, Marco Griese, Katharina Jaschinski, Jana Kliemt, Franziska Schmid, Sebastian Zahn und Madeleine Huber sowie unsere Post-Docs Sebastian Laaß und Julia Babski – ohne euch wäre der Laboralltag trist, grau und einsam gewesen. Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Studenten bedanken, die alle ihren Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei Sandy Maurer und Florian Semmler.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Boles bedanken, insbesondere bei Thomas Thomik, Manuela Gottardi, Stefan Bruder, Wesley Cardoso Generoso, Sebastian Tamayo Rojas und Mara Reifenrath, für die Beantwortung aller Fragen rund um's Gibson-Assembly und Gap Repair Cloning, eure Hilfe, wann immer es Probleme gab und die vielen außeruniversitären Aktivitäten, die in der Regel leckeres Essen involvierten.

Als nächstes möchte mich bei meiner Familie bedanken, für das Interesse an meiner Arbeit und dafür, dass sie mich während dieser Zeit unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Mein letzter Dank gilt Thomas – für alles.

## **Curriculum Vitae**

### **Persönliche Daten**

---

Name Anna Katharina Ludt  
Geburtsdaten 25.06.1989 in Herrenberg

### **Schulbildung**

---

09/1999 – 07/2005 Realschule Renningen  
  
09/2005 – 07/2008 Mildred-Scheel-Schule, Böblingen  
(Biotechnologisches Gymnasium)  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

### **Studium**

---

09/2008 – 08/2011 Studium der Molekularen Biotechnologie, B.Sc. an der  
Technischen Universität München  
Bachelor's Thesis: „Nachweis und Diversität von *Listeria* in  
stehenden Gewässern“  
  
09/2011 – 03/2014 Studium der Molekularen Biotechnologie, M.Sc. an der  
Technischen Universität München  
Master's Thesis: „Entwicklung einer PCR-SSCP Methode  
zum Nachweis von Archaea-Gemeinschaften in der Milch  
von an Mastitis erkrankten Milchkühen“

### **Promotion**

---

04/2014 – 04/2018 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Molekulare  
Biowissenschaften an der Johann Wolfgang Goethe-  
Universität Frankfurt am Main, Prof. Dr. Jörg Soppa

## Publikationen

**Zerulla, K., K. Ludt und J. Soppa (2016).** "The ploidy level of *Synechocystis* sp. PCC 6803 is highly variable and is influenced by growth phase and by chemical and physical external parameters." *Microbiology* 162(5): 730-739.

**Böttinger, B., F. Semmler, K. Zerulla, K. Ludt und J. Soppa (2018).** "Regulated ploidy of *Bacillus subtilis* and three new isolates of *Bacillus* and *Paenibacillus*." *FEMS Microbiol Lett* 365(4).

**Maurer, S., K. Ludt und J. Soppa (2018).** "Characterization of Copy Number Control of Two *Haloferax volcanii* Replication Origins Using Deletion Mutants and Haloarchaeal Artificial Chromosomes." *J Bacteriol* 200(1).

**Ludt, K. und J. Soppa (akzeptiert).** "The influence of Origin Recognition Complex (ORC) proteins on the copy numbers of three chromosomes in *Haloferax volcanii*." *J Bacteriol*.

## Vorträge und Posterpräsentationen auf internationalen Konferenzen

**Ludt, K., K. Zerulla, S. Chimileski, S. Breuert, T. Allers, G. Spohn, J. Soppa (2014).** „Polyploidie in Haloarchaea“. Jahrestagung des ehemaligen Schwerpunktprogramms „SPP1122: Genomfunktion und Genregulation Archaea“, Schmitten, 15. – 16.09.2014 [Vortrag]

**Maurer, S., F. Weipert, K. Zerulla, K. Ludt, J. Soppa (2015).** „Influence of oriC1- and oriC2-regions on genome copy number regulation in *Haloferax volcanii*“. Jahrestagung des ehemaligen Schwerpunktprogramms „SPP1122: Genomfunktion und Genregulation Archaea“, Schmitten, 07. – 08.09.2015 [Vortrag]

**Zerulla, K., K. Ludt, J. Soppa (2015).** „The manifold functions of genomic DNA in polyploid species as genetic material, structural material, nutrient, and phosphate storage polymer“. Tagung der “Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie” (VAAM), Marburg, 01. – 04.03.2015 [Posterpräsentation]

**Maurer, S., K. Ludt, K. Zerulla, F. Weipert, J. Soppa (2015).** „Molecular Analysis of oriC1 und oriC2 in *Haloferax volcanii*“ Tagung der “Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie” (VAAM), Marburg, 01. – 04.03.2015 [Posterpräsentation]

**Ludt, K. und J. Soppa (2017).** „The importance of 10 paralogs of Origin Recognition Complex (ORC1) proteins für chromosome copy number regulation and fitness“ Tagung der “Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie” (VAAM) / 69. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Würzburg, 05. – 08.03.2017 [Posterpräsentation]

## Anhang

### Oligonukleotide

Überhänge: unterstrichen; Schnittstellen: **fett**

Name	5' → 3' Sequenz	Beschreibung
M13-20	GGAAACAGCTATGACCATG	Sequenzierung von pMH101, pTA929 und pTA929_M2-18 Plasmiden
rev_T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	
pyrE Seq for	GTGCCACCTAAATTGTAAGC	Sequenzierung von <i>pyrE2</i>
pyrE Seq rev	ACAACACTCAACCCTATCTC	
HIS3	AGCGATTGGCATTATCAC	Sequenzierung von <i>HIS3</i>
Sequenzierung		
CHR_St_for	CTGAGGAAATCGTCGTCATC	Amplifikation des qPCR-Standards des Hauptchromosoms
CHR_St_rev	CAGAGTCGGTCGAGAATC	
CHR_A_for4	GCGAGACGGACGGTCGCTTCC	Amplifikation des qPCR-Analysefragments des Hauptchromosoms
CHR_A_rev4	CGAGCAGCATCGCCGCGGACAG	
pHV1_St_for	CGGGAGATACCCGAGACGACGAGATGCAACAGC	Amplifikation des qPCR-Standards von pHV1
pHV1_St_rev	GCGATTTTATCCCGTCCACGTCAGACCGAAGC	
pHV1_A_for1	CCAGCACAATACGGGGTATCAGCTCACCCGC	Amplifikation des qPCR-Analysefragments von pHV1
pHV1_A_rev1	GGTTCGAGGTGTAAGCGTCGAACTTCACCGTCC	
pHV3_St_for	CGCGACCCGCTGTTCCGCTATGACCAACC	Amplifikation des qPCR-Standards von pHV3
pHV3_St_rev	GGTCGTCGGCGACGGTGAGATACTGTCCG	
pHV3_A_for1	GCACACCGAGGCCTCGGTCATCAAGACGC	Amplifikation des qPCR-Analysefragments von pHV3
pHV3_A_rev1	GCGTCGTACGACGGGAAGACGAGTTCGTG	
pMH101 for	CTGACTCGCTGCGCTCGGTCCG	Konstruktion des Suicide-Halo-Hefe- <i>E.coli</i> -Plasmids (S-HHC)
pMH101 rev	CCAATACGCAAACCGCCTCTCCC	
p423hxt7 for	<u>CGGGGAGAGGCGGTTTGC</u> GATATTGG <b>GCATGCT</b> AGAT CCGTTCGAGTTCAAGAG	<i>PaeI</i> Schnittstelle
p423hxt7 rev	<u>CGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAG</u> <b>GCATGCA</b> ACGA AGCATCTGTGCTTC	<i>PaeI</i> Schnittstelle
GA pMH101 for	CCACTAGTTCTAGAGCGGCC	Amplifikation des pMH101-Plasmidrückrads für Gibson-Assembly
GA pMH101 rev	CGGTACCCAATTGCGCCT	
M2-18 for	<u>ACCGACCCGATTCGACCCGGTACC</u> GGGCATGCCGTG GATAAAAC	Konstruktion von pTA929_M2-18
M2-18 rev	<u>CGATATCAAGCTTATCGACATATGCC</u> ACTGCAGAGTTC GGCTTC	
pTA929-M2-18 T1 for	<u>ATCAACGAAGCCGA</u> ACTCTGCAGTGGCATATGTCGAT AAGCTTGATATCGAATTCC	Konstruktion von pTA929_M2-18
Gib TA929 T1 rev	<u>CTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCT</u> CACATGAGCTTCTT TGATTCGAGCCATTTG	
Gib TA929 T2 for	<u>TGGCTCGAATCAAAGAAGCTCATGTG</u> GAGCAAAAGGCC AGCAAAAGG	

pTA929-M2-18	<u>CGAGGGGTTTTATCCACGGCATGCCCGGTACCGGT</u>	
T2 rev	CGAATCGG	
Gib TA929 T1	<u>AACGCCGCCTGCGCCACCACCACCACCACCTGA</u>	
for	GGCCGCACCTCTGGACCATC	
Gib TA929 T1	<u>CTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTC</u> ACATGAGCTTCTT	Amplifikation des pTA929- Plasmidrückrads für Gibson- Assembly
rev	TGATTGAGCCATTTG	
Gib TA929 T2	<u>TGGCTCGAATCAAAGAAGCTCATGTGAGCAAAAGGCC</u>	
for	AGCAAAAGG	
Gib TA929 T2	TGCGCAATAGGTCCGCGAATG	
rev		
0001 P1	CTCGGTCTCCGACACCCATCC	
0001 P2	<u>TCGAACCGCGCCTGCACGAATCGCGGATTCTTCTCCTCG</u>	Deletion von <i>HVO_0001</i> ( <i>orc1</i> )
0001 P3	<u>ACGAGAAAAATCCGCGATCGTCAGGCGCGTTTCGAC</u>	
0001 P4 neu	GAGAACTGGTACGACCGGGCGAA	
0001 N for NdeI	<u>CACCTACATATGCACCACCACCACCACGACGAGG</u>	Überexpression von <i>HVO_0001</i> in pTA929_M2-18, N-terminaler His-Tag, Kloniert über <i>NdeI</i> & <i>HindIII</i>
	AAGAGAATCCG	
0001 N rev	<u>CACCTAAAGCTT</u> TCAGTTGTGCAACCGC	
HindIII		
0194 P1	CGAGTTCCCACCGAACCGTGCG	
0194 P2	<u>AGGCGGTCCAAGTCGGGGTCCTCCCTCATCGAGTAAA</u>	Deletion von <i>HVO_0194</i> ( <i>orc9</i> )
0194 P3	<u>GGAGGACCCCGACTTGACCGCCTCTGAGGGCGTCT</u>	
0194 P4	CGCCGAGGTCCGAGACGCCCG	
0194 PO rev	CGCGCAGCAGCGAGTAGAGCGTGTC	Detektion von Pop-Out Klonen (zusammen mit 0194 P1)
0194 St for	GGGACGAGACGGTGTTCC	Verifizierung der Deletionsmutante $\Delta 0194$ mittels qPCR
0194 St rev	GTAGGCGAGCGAGATGG	
0194 A for	CCACCGCGAGAGCCAACTGC	
0194 A rev	CGAGCGCGACGACGAGCACC	
P1 HVO_0634	CACAGACACCACCGTTGCAC	
P2 HVO_0634	<u>AATCTCGTCGAGGAACCGGCGCATTAGCGTCG</u>	Deletion von <i>HVO_0634</i> ( <i>orc2</i> )
neu		
P3 HVO_0634	<u>ATGCGCCGGTTCTCGACGAGATTCGGAAGACC</u>	
neu		
P4 HVO_0634	CAGTTCGGTCGTCGTGGATTTCC	
0634 PO rev	CTTCGAGCTTGCCGTTTCGAG	Detektion von Pop-Out Klonen (zusammen mit P1 <i>HVO_0634</i> )
0634 St for	AGCCGAACAACGTCTTCC	Verifizierung der Deletionsmutante $\Delta 0634$ mittels qPCR
0634 St rev	CGAGCGCGTAGCTGTAATAG	
0634 A for	CCGCCCGGTGCGGTGATTAG	
0634 A rev	TCTGCGATGGCGACCTCAGC	
HVO_1537 P1	CGGCGTCTTGATGTGGTAGGC	Deletion von <i>HVO_1537</i> ( <i>orc15</i> )

HVO_1537 P2	<u>CCATGCGCCTCGAAGACAGAACTTCTCGACGCTGGC</u> GTTC	
HVO_1537 P3	<u>AACGCCAGCGTTCGAGAAGTTTCTGTCTTCGAGGCGCA</u> TGGC	
HVO_1537 P4	CACTCCTTGGCGGACGGCTG	
1725_fwd1	GTATATTCGTGTTAACGACCATTGATACACTCGTGAAG	
1725_rev2	<u>TCAAGAGTCCG</u> TGGCGTTAGGCATGTTTCGCAACACAC	Deletion von <i>HVO_1725</i> ( <i>orc5</i> )
1725_fwd3	<u>ATGCCTAACGCCACGGACTCTTGATTGGAGAATCGAA</u> CTCTC	
1725_rev4	CGAAGCGGTGCTGGGAGAAGATAC	
1725 N for NdeI	<u>CACCTACATATGCACCACCACCACCACCACC</u> CCCTAACG CCAGCGACG	Überexpression von <i>HVO_1725</i> in pTA929_M2-18, N-terminaler His-Tag, Kloniert über <i>NdeI</i> & <i>HindIII</i>
1725 N rev HindIII	<u>CACCTAAAGCTT</u> TCAAGAGTCCGTGTTCTCG	
HVO_2042 P1	CGTGGGGGTCAGATTTTCGTCCCGG	
HVO_2042 P2	<u>CTGCTCCGAGCACTCGAAGGATCCCATACGTGTTGCA</u> GACCTG	Deletion von <i>HVO_2042</i> ( <i>orc4</i> )
HVO_2042 P3	<u>GGATCCTTCGAGT</u> GCTCGGAGCAGTAACCCACAGAAC AGATG	
HVO_2042 P4	CGTAACCGCGCCGTCGAACGAGC	
HVO_2133 P1 for	<u>TCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGCTCATACGCGG</u> ACTAGC	
HVO_2133 P2 rev	<u>ACTACGTGGGAACAGATTACTGCGCCGCTTCGATGTC</u> CATGTC	Deletion von <i>HVO_2133</i> ( <i>orc16</i> )
HVO_2133 P3 for	<u>CCACTACGACATGGACATCGAAGCGGCGCAGTAATCT</u> GTTCCC	
HVO_2133 P4 rev	<u>GTGGCGGCCGCTCTAGAAGTAGTGGCTGGTTCGAATCC</u> TCAGTC	
2133 N for NdeI	<u>CACCTACATATGCACCACCACCACCACCACG</u> ACATCG AAGCGAGGATCC	Überexpression von <i>HVO_2133</i> in pTA929_M2-18, N-terminaler His-Tag, Kloniert über <i>NdeI</i> & <i>HindIII</i>
2133 N rev HindIII	<u>CACCTAAAGCTT</u> TACTGCGCGGCGAAC	
orc14 P1 F	TGTAAGTCCAGCAGTTGATG	
orc14 P2 F	<u>CTACTGTAGGCCGGTATCGTTGGCGAGTTCATAC</u>	Deletion von <i>HVO_2292</i> ( <i>orc14</i> )
orc14 P3 F	<u>GAACTCGCCAACGATACCGGCCCTACAGTAGGTCAG</u>	
orc14 P4 F	AGGATGAGGTCGAGGGTTTG	
orc14 PO rev	GGTTCGAATCCGATTCTCTG	Sondengeneration für Southern-Blot
2292 Sonde for	ACTCGCCAACGATGAAATAC	
2293-P1 M	GAGGTGTGGTGGCCGGTTC	
2293-P2 M	GTTTACACCTTGTCTGCCGCTACCAGATTCCGAAGTC	Deletion von <i>HVO_2293</i> ( <i>orc11</i> )
2293-P3 M	GAATCTGGTAGCGGCAGACAAGGTGTAACAGTGTTG GCG	
2293-P4 M	GGGTGATGTGCGGGTAAAGGC	
HVO_A0001 P1	TGTGACGACCCGCGTCGACGAGC	
HVO_A0001 P2	<u>TACCTACTGCTCGATGAACTCGAATAGGGGCATACTA</u> CCACGGTTTCGACC	Deletion von <i>HVO_A0001</i> ( <i>orc13</i> )

HVO_A0001 P3	<u>AGTATGCCCTATTTCGAGTTCATCGAGCAGTAGGTAG</u> GTCGACGCTCAGTACC	
HVO_A0001 P4	GCGCTGGAAGAGACAGTAAAACCGTTCCGG	
orc13 P1 F	AACGAGCTTCACCAACCATC	
orc13 P2 F	<u>TTAGTTCTTGCTCCGTCCCTCTCGTCCCATTATGAAC</u>	Deletion von <i>HVO_A0064</i>
orc13 P3 F	<u>ATGGGACGAGAGGGACGGAGCAAGAACTAATCTCGC</u>	( <i>orc13</i> )
orc13 P4 F	ACCTTCCGACGGAAATCAAC	
orc13 PO rev	CAGCTCGATCTGCAGTCTTC	Detektion von Pop-Out Klonen (zusammen mit <i>orc13 P1 F</i> )
A0064 Sonde for	CGCCTTCAAGCCAGAATC	Sondengeneration für
A0064 Sonde rev	CCTCGGAGAGGGAGAAATAC	Southern-Blot
A0072 P1 B	TCGATGCCGTAATCTC	
A0072 P2 B	<u>TTACTGCATCGGCGAAGCATCGGAATCATCTATATC</u>	Deletion von <i>HVO_A0072</i>
A0072 P3 B	<u>ATGATTCGCGATGCTTCGCCGATGCAGTAACG</u>	( <i>orc12</i> )
A0072 P4 B	CCCTCGTCAGGGTTCTAC	
A0072 PO rev	CACGAGGCGATCATCGAC	Sondengeneration für Southern-Blot (zusammen mit A0072 P1 B)
HVO_A0257 P1 for	<u>TCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGTGGGTGGGTGTC</u> TTTACG	
HVO_A0257 P2 rev	<u>GGGAAAACGGAGATTACGCGAGATCGAGTTGCGACG</u> GGTCATC	Deletion von <i>HVO_A0257</i>
HVO_A0257 P3 for	<u>GATGGCTGATGACCCGTCGCAACTCGATCTCGCGTAA</u> TCTCCG	( <i>orc7</i> )
HVO_A0257 P4 rev	<u>GTGGCGGCCGCTCTAGAAGTGGTTGGCCGAACA</u> CAAGGAG	
A0257 N for NdeI	<u>CACCTACATATGCACCACCACCACCACCACGCTGATG</u> ACCCGTCGC	Überexpression von <i>HVO_A0257</i> in pTA929_M2-
A0257 N rev HindIII	<u>CACCTAAAGCTT</u> TTACGCGAGATCTTCCAGTC	18, N-terminaler His-Tag, Kloniert über <i>NdeI</i> & <i>HindIII</i>
HVO_B0001 P1	CCATCTGTCCTCGGGAACACACAC	
HVO_B0001 P2	<u>CGTGGAGATACGGCTCTCGCTCTCGTCCGATGTCATG</u> TG	Deletion von <i>HVO_B0001</i>
HVO_B0001 P3	<u>TCGGACGAGAGCGAGAGCCGTATCTCCACGCTCGAAT</u> AG	( <i>orc6</i> )
HVO_B0001 P4	ACTCGAACGCGTCGGCGAAC	
HVO_C0001 P1	CGTGGTTGACCCGACCCACTC	
HVO_C0001 P2	<u>ATCCTCATGCGGTGCGCGGAATACCTGTGTCTCTGTG</u> TC	Deletion von <i>HVO_C0001</i>
HVO_C0001 P3	<u>ACACAGGTATTCCGCGCACCGCATGAGGATTTGGTGT</u> C	( <i>orc10</i> )
HVO_C0001 P4	CGCGAGTATGTGCGAGGTCGGATTC	

HVO_C0057	CCGGTGTGCACGACGATCTCAGAAAGTCTTC	
P1		
HVO_C0057	<u>CTATTTTCGAGACGTCCATGTCTGTACGTCCTCACGG</u>	
P2	GAAGG	Deletion von <i>HVO_C0057</i>
HVO_C0057	<u>GTGACAGACATGGACGTCTCGAAATAGCAGCCCACCC</u>	( <i>orc8</i> )
P3	AC	
HVO_C0057	GTGGTTATATATTCCTGTGCGAGTGGGGACGGACC	
P4		
HVO_2380 P1	<u>TCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGTGCTGATGGCT</u>	
for	GTGTTC	
HVO_2380 P2	<u>GGTCTTGGATGTCCTCGTAGTAGCGCGCCACTTCGAG</u>	
rev	TTGGAC	Deletion von <i>HVO_2380</i>
HVO_2380 P3	<u>GAACGAAGTCCAACCTCGAAGTGGCGCGCTACTACGAG</u>	( <i>cdc48a</i> )
for	GACATC	
HVO_2380 P4	<u>GTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGTTCGCGGAAGT</u>	
rev	CGACATC	
HVO_1723 P1	<u>TCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGTGA</u> CTCCC GGTC	
	AGGTTC	
HVO_1723 P2	<u>AGCGCCCGACGACGGGTGATTACTCCTCGGCAGTCAT</u>	
	CGAAGC	Deletion von <i>HVO_1723</i>
HVO_1723 P3	<u>GTATTCGGCTTCGATGACTGCCGAGGAGTAATCACCC</u>	( <i>rad25d</i> )
	GTCGTC	
HVO_1723 P4	<u>GTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGCCGCTAACTGTC</u>	
	GAACTG	
1723 PO rev	GTACTGGGTCGGGTTGTC	Detektion von Pop-Out Klonen (zusammen von 1723 PO rev)
HVO_1724 for	<u>TTCACATTTCGCGGACCTATTGCGCAATGCGTGCGCTC</u>	
(Hfx) neu	AGTCGCTTG	Überexpression von
HVO_1724 rev	<u>GGTGGTGGTGGGCGCAGGCCGGCGTTCGAGGCCGAG</u>	<i>HVO_1724</i> in pTA929, C-
(Hfx) neu	<u>GCTCGGGACGTGCTCGACC</u>	terminaler His-Tag
HVO_3010 P1	<u>CGGGGAGAGGCCGTTTGCCTATTGGCAACGACCAGT</u>	
for	TCGAGAG	
HVO_3010 P2	<u>GGACCTCCTTGAGGTCCTCCTCGTTTCGACATCGGTGA</u>	
rev	CGATTG	Deletion von <i>HVO_3010 (hef)</i>
HVO_3010 P3	<u>GGGCGAGCAATCGTCACCGATGTCGAACGAGGAGGA</u>	
for	CCTCAAG	
HVO_3010 P4	<u>CGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGCTCGACTTCGC</u>	
rev	CATCGAG	
3010 PO rev	TAGCGCTCTGCGATGTAG	Deletion von Pop-Out Klonen (zusammen mit <i>HVO_3010 P1</i> for)
HVO_3012 P1	<u>TCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGCACCATGCCTGA</u>	
for	AGCAAC	Deletion von <i>HVO_3012</i>
HVO_3012 P2	<u>TGTCCGGAACCTTCGATGACGTACCGGCATTGATGTGG</u>	( <i>oapC</i> )
rev	CATTGG	

HVO_3012 P3 for	<u>ACATCCACCAATGCCACATCAATGCCGGTACGTCATC</u> GAAGTTC	
HVO_3012 P4 rev	<u>GTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGGCGAGGCGAAT</u> CTGATAG	
HVO_3012 for (Hfx) neu	<u>TTCACATTGCGGGACCTATTGCGCAATGCCACATCAAT</u> GCACCACG	Überexpression von <i>HVO_3012</i> in pTA929, C- terminaler His-Tag
HVO_3012 rev (Hfx) neu	<u>GGTGGTGGTGGGCGCAGGCCGGCGTTCGAGGCCGAG</u> <u>GCGTCCTCGCGGTTGCC</u>	
HVO_3013 for (Hfx) neu	<u>TTCACATTGCGGGACCTATTGCGCAATGCCTGAAGCA</u> ACCGCCTCC	Überexpression von <i>HVO_3013</i> in pTA929, C- terminaler His-Tag
HVO_3013 rev (Hfx) neu	<u>GGTGGTGGTGGGCGCAGGCCGGCGTTCGAGGCCGAG</u> <u>GCCTTTCGCGAGACGAGCGC</u>	
HVO_3014 for (Hfx) neu	<u>TTCACATTGCGGGACCTATTGCGCAATGGGACTGCTC</u> ACAGATTTAAGAGAC	Überexpression von <i>HVO_3014</i> in pTA929, C- terminaler His-Tag
HVO_3014 rev (Hfx) neu	<u>GGTGGTGGTGGGCGCAGGCCGGCGTTCGAGGCCGAG</u> <u>GCCGCGAAGTACTTCGCGATT</u>	
HVO_3012 Sonde for	GCGGCAACAAGTTTCAGTTC	Sondengeneration zur Detektion des Transkripts von <i>HVO_3012</i>
HVO_3012 Sonde rev	GAGTTGTCTTCGTCCGTCTC	
HVO_3013 Sonde for	GGGTCCAGATAGACCTCTTC	Sondengeneration zur Detektion des Transkripts von <i>HVO_3013</i>
HVO_3013 Sonde rev	ATGAGATTCTCGTCCTTGTG	
HVO_3014 Sonde for	GAAGACGACTCTCGCAAATC	Sondengeneration zur Detektion des Transkripts von <i>HVO_3014</i>
HVO_3014 Sonde rev	GCTGACAACTCGACTGTTTC	
HVO_2918 P1 for	<u>CGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGAGGTGGTCGT</u> CCTTGTG	Deletion von <i>HVO_2918</i> ( <i>thyA</i> )
HVO_2918 P2 rev	<u>CCGGGTCGTAGTCGCGGAGGACGATATATTGGCGCAT</u> GAGAGG	
HVO_2918 P3 for	<u>CAGGGCACCTCTCATGCGCCAATATATCGTCCCTCCGC</u> GACTAC	
HVO_2918 P4 rev	<u>CGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGCCGAGGAACTG</u> CTCGTAG	
1752/lrp (pKS13) P1	<u>TCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGACGGCGAAGAC</u> GGTTAG	Erweiterung der zu <i>HVO_1752</i> homologen Bereiche im Plasmid pKS13
1752/lrp (pKS13) P2	<u>AGTCGAGAGCCGAGACAGAATTCATAACTCCCGAAAG</u> GACAATC	
pKS13 for	ATGAATTCTGTCTCGGCTC	
pKS13 rev	TCATCTCGGTCTTCGG	
1752/lrp (pKS13) P3	<u>GGAGATGGCCGAAGACGCGAGATGAGATACGACCGC</u> CTCGAAG	
1752/lrp (pKS13) P4	<u>GTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGGGTGGCGAAGT</u> TGACCTC	

pKL3 1752 P2	<u>CGAGGGGTTTTATCCACGGCATGCCAACTCCCGAAAG</u> GACAATC	Generierung des Plasmids pMH101_Δ1752::P <sub>fdx</sub> -2528mut
Mut_2528_for	CCTCACCGACTACATGTGTTTCGGTACTCG	Einbringung einer 10 nt langen
Mut_2528_rev	CGAGTACCGAAACACATGTAGTCGGTGAGG	Deletion in <i>HVO_2528</i>
Ana -fdx for	CAGTGTTTCGCAGGTCATTC	Analyseprimer zur Detektion
Ana fdx rev	CGCGTCAGTTCGTAGTAGTC	des <i>fdx</i> -Promotors
Ana 10nt Del for neu	CGGCCCTCACCGACTAC	Analyseprimer zur Detektion
Ana 10nt Del rev neu	TCGACGTGGTCCTGCATC	der 10 nt langen Deletion
trpA for	TACGTCGTGGTCAACGTTTC	Analyseprimer zur Detektion
trpA rev	GCCGACGTTGATATGGAAGG	des <i>trpA</i> -Gens vs. Deletion

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit allein und nur mit Benutzung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die aus Veröffentlichungen entnommen worden sind, sind als solche gekennzeichnet.

Frankfurt am Main, den 27. Juni 2018

---

Anna Katharina Ludt