

Entwicklung eines *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektors
basierend auf dem Plasmid pRN1

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von
Silvia Berkner

Bayreuth 2007

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Tag der Einreichung der Arbeit: 04.07.2007

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 19.10.07

Prüfungsausschuss:

PD Dr. Georg Lipps (Erstgutachter)

Prof. Dr. Wolfgang Schumann (Zweitgutachter)

Prof. Dr. Carlo Unverzagt (Vorsitzender)

Prof. Dr. Franz-Xaver Schmid

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Kurzfassung	ii
Summary	iv
1 Einleitung	1
1.1 Archaea	1
1.2 Ähnlichkeiten der Archaea zu Bakterien und Eukaryonten	2
1.3 Die Gattung <i>Sulfolobus</i>	3
1.4 Das Plasmid pRN1	5
1.5 <i>Sulfolobus-E. coli</i> Shuttle-Vektoren.....	7
1.6 Zielsetzung	8
2 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse.....	9
2.1 Überblick über die verschiedenen Arbeitsschritte zur Entwicklung eines <i>Sulfolobus-E. coli</i> Shuttle-Vektorsystems	9
2.2 Test und Bewertung bereits publizierter <i>Sulfolobus-E. coli</i> Shuttle-Vektoren	12
2.3 Charakterisierung des Plasmides pRN1	16
2.4 Selektive Marker	26
2.5 Rezipienten.....	35
2.6 Identifizierung, Charakterisierung und Validierung erfolgreicher Shuttle-Vektorkonstrukte.....	40
2.7 Anwendung der Shuttle-Vektoren.....	44
3 Abkürzungsverzeichnis	50
4 Literaturverzeichnis.....	51
5 Publikationsliste	60
6 Darstellung des Eigenanteils	61
7 Teilarbeiten	63
7.1 Teilarbeit A	63
7.2 Teilarbeit B.....	77
7.3 Teilarbeit C.....	85
7.4 Teilarbeit D	93
7.5 Teilarbeit E.....	107
Danksagung.....	131
Erklärung.....	133

Kurzfassung

Sulfolobus spp., ein Vertreter der thermoacidophilen Crenarchaeota, ist auf dem Weg sich als wichtiger archaealer Modellorganismus zu etablieren. Er wurde bereits in einer Vielzahl von grundlegenden biochemischen und molekularbiologischen Studien eingesetzt, wobei die dabei gewonnenen Erkenntnisse über die phylogenetische Gruppe der Archaea hinaus von Bedeutung sind. Proteine, die an informationsverarbeitenden Prozessen wie Replikation oder Transkription beteiligt sind, zeigen eine Konservierung zwischen Archaeen und Eukaryonten. Auch sind diese fundamentalen Prozesse ähnlich organisiert, wobei in Archaeen eine einfachere Organisation mit weniger Einzelkomponenten als in Eukaryonten vorliegt. Daher können Archaea als Modellsystem zur Untersuchung komplexer eukaryontischer Prozesse dienen. Aufgrund seiner Wachstumsbedingungen von 75-80 °C bei pH 3-3,5 ist *Sulfolobus* biotechnologisch ebenfalls von hoher Bedeutung, da seine Enzyme thermostabil und, im Fall von sekretierten Enzymen, auch säurestabil sind. Diese Eigenschaften machen die Enzyme für eine Reihe von industriellen Anwendungen interessant.

Bisher waren jedoch *in vivo*-Experimente in *Sulfolobus* nur schwierig durchzuführen, da trotz jahrelanger Bemühungen nur wenige genetische Systeme zur Verfügung standen, die außerdem Probleme hinsichtlich ihrer reproduzierbaren Anwendbarkeit aufwiesen. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, einen kleinen, episomalen, einfach zu handhabenden *Sulfolobus-Escherichia coli* Shuttle-Vektor zu entwickeln. Zur Konstruktion eines *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektors wird ein *E. coli*-Replikon mit selektivem Marker, ein *Sulfolobus*-Replikon und ein selektiver Marker für *Sulfolobus* benötigt. Weiterhin war eine reproduzierbare Transformationsmethode eine Voraussetzung, um potentielle Shuttle-Konstrukte in geeignete Wirtsstämme zu transformieren. Zu Beginn der Arbeiten unklar war, welcher Faktor entscheidend für die Etablierung verlässlicher Vektoren sein würde. Daher wurden, ausgehend von einer breiten, gut charakterisierten Auswahl verschiedener Shuttle-Konstrukte, möglicher selektiver Marker und potentieller Rezipientenstämme, optimale Kombinationen identifiziert.

Als *Sulfolobus*-Replikon wurde das kryptische Plasmid pRN1 aus *Sulfolobus islandicus* REN1H1 gewählt, da es eine geringe Größe von 5,4 kb und eine geeignete Kopienzahl von 2-23 Plasmiden pro Zelle aufweist, sowie das am besten untersuchte crenarchaeale Plasmid ist. Auf dem Plasmid befinden sich drei konservierte offene Leseraster, die für das multifunktionelle Replikationsprotein Orf904 und die zwei sequenzspezifisch DNA-bindenden Proteine Orf56 und Orf80 codieren. Über den Replikationsmechanismus oder den Replikationsursprung des Plasmides ist jedoch nichts bekannt. Um die Funktionsweise des Plasmides pRN1 besser zu verstehen, wurde die Transkription des Plasmides untersucht. Dadurch sollten auch Hinweise auf essentielle Regionen bzw. mögliche Unterbrechungsstellen zur Shuttle-Vektorkonstruktion gewonnen werden. Es wurden fünf Transkripte im Bereich der offenen Leseraster kartiert. Die offenen Leseraster *orf56* und *orf904* werden von einem gemeinsamen Promotor aus kotranskribiert und bilden das Replikationsoperon des Plasmides. Der dritte konservierte offene Leseraster *orf80* wird ebenfalls transkribiert. Zusätzlich wurden drei Transkripte in *antisense*-Richtung detektiert, die teilweise mit den *sense*-Transkripten überlappen. Erste Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen zur Kopienzahlkontrolle von pRN1 wurden durch die

quantitative Bestimmung des Verlaufs der Transkriptanzahlen pro Zelle während verschiedener Wachstumsphasen und die Untersuchung der Stabilität der Transkripte gewonnen. In *in vivo*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Protein Orf56 als Transkriptionsrepressor wirkt und somit die Transkription des Replikationsoperons reguliert. Das Replikationsoperon *orf56/orf904* wurde als essentiell zur Shuttle-Vektorkonstruktion eingestuft. Um möglichst viele gleichmäßig über den restlichen Teil des Plasmides verteilte Unterbrechungsstellen zur Vektorkonstruktion zu erhalten, wurde eine Transposon-basierte Bibliothek erstellt, aus der 13 Konstrukte ausgewählt wurden.

Verschiedene selektive Marker wurden auf ihre Eignung zur effizienten Selektion getestet. Selektionsverfahren basierend auf Antibiotika in Verbindung mit resistenzvermittelnden Enzymen konnten aufgrund von Stabilitätsproblemen der Antibiotika unter den Wachstumsbedingungen von *Sulfolobus* nicht effektiv eingesetzt werden. Daher wurden zwei Selektionsverfahren basierend auf metabolisch defizienten Rezipientenstämmen getestet. Eine effiziente Selektion wurde durch die Verwendung uracilauxotropher, *pyrEF*-defizienter Mutanten erreicht. Daher wurden uracilauxotrophe Mutanten als potentielle Rezipientenstämmen isoliert und phänotypisch, genotypisch und hinsichtlich ihrer Reversionsfrequenzen untersucht. Die funktionsfähigen *pyrEF*-Gene aus *Sulfolobus solfataricus* P2, codierend für Enzyme des Uridinmonophosphat-Syntheseweges, wurden als selektiver Marker zur Uracil-Selektion in die 13 verschiedenen pRN1-Unterbrechungskonstrukte integriert.

Da eine erfolgreiche Etablierung eines Shuttle-Vektors durch ein Restriktionssystem im Rezipientenstamm verhindert werden kann, wurden Tests auf Restriktionsaktivität vorgenommen. Für Stämme, die Restriktionsaktivität zeigten, wurde mit Hilfe einer geeigneten Methylase versucht, zu transformierende DNA zu schützen. Es sollten möglichst genetisch stabile Wirtsstämme verwendet werden, da für einige gut charakterisierte *Sulfolobus*-Stämme genomische Instabilität aufgrund hoher Insertionselementaktivität ein Problem darstellt. Deshalb wurde für potentielle Rezipientenstämmen die spontane Mutationsfrequenz und der Anteil an Insertionselementmutanten bestimmt.

Die verschiedenen potentiellen Shuttle-Vektorkonstrukte wurden in die zur sechs zur Verfügung stehenden uracilauxotrophen Rezipienten transformiert. 11 der 13 Vektorkonstrukte replizierten stabil in der *Sulfolobus acidocaldarius pyrE*-Deletionsmutante MR31 unter Uracil-Selektion. Die Vektoren zeigten Kopienzahlen von 2-8 Plasmiden pro Zelle in *Sulfolobus*, rekombinierten nicht und integrierten auch nicht in das Wirtschromosom. Sie waren in *E. coli* stabil und erlaubten eine einfache Klonierung zusätzlicher DNA-Sequenzen. Mit Hilfe der verschiedenen Unterbrechungskonstrukte und weiterer Deletionskonstrukte konnten erste Informationen zur Funktion des konservierten Leserasters *orf80* erhalten und das minimale Replikon von pRN1 eingegrenzt werden. Außerdem wurde die Eignung der Shuttle-Konstrukte für Reporterexperimente und zur Expression von Proteinen in *Sulfolobus* demonstriert. Weiterhin konnte mittels Lactose-Selektion das Wirtsspektrum der Shuttle-Konstrukte auf *S. solfataricus* ausgedehnt werden. Als Schlüsselfaktor zur erfolgreichen Etablierung der Shuttle-Vektoren konnte hoher Selektionsdruck, der nur mittels Deletionsmutanten erreicht werden kann, identifiziert werden. Die Identifizierung dieses kritischen Faktors wird die Entwicklung weiterer genetischer Systeme für *Sulfolobus* erleichtern.

Summary

Sulfolobus spp., a thermoacidophilic crenarchaeot, is developing into an important archaeal model organism that is increasingly being used in biochemical and molecular biology studies. The results have implications exceeding the limits of the phylogenetic group of the archaea, as information processing systems show similarities between archaea and eukaryotes. Especially for the elucidation of the processes of transcription and replication, archaea can serve as simplified model for complex eukaryotic processes. Furthermore, *Sulfolobus* is interesting from a biotechnological point of view. Because of its growth conditions (75-80 °C and pH 3-3,5) enzymes of this organism are thermostable and, if secreted, also acid-resistant and may have potential for industrial applications.

So far, *in vivo* experiments in *Sulfolobus* were hampered by the poor reproducibility of the few described genetic systems. Therefore, it was the aim of this work to develop a *Sulfolobus*-*Escherichia coli* shuttle vector. The construct should meet the needs for a small, episomal, easy to handle multicopy vector. The different components required to construct a *Sulfolobus*-*E. coli* shuttle vector are an *E. coli* replicon with a selectable marker for *E. coli*, a *Sulfolobus* replicon, and a selectable marker for *Sulfolobus*. Furthermore, a reproducible transformation method was a prerequisite to transform potential shuttle constructs into suitable recipient strains. The strategy to establish a successful shuttle vector system was to identify optimal combinations of vectors, selectable markers, and recipient strains from a variety of well characterized potential shuttle constructs, possible selectable markers and potential recipient strains. This strategy was chosen, because in the beginning of the work no information was available concerning the crucial factors to obtain reliable shuttle vectors.

The cryptic plasmid pRN1 was chosen as *Sulfolobus* replicon because of its relatively small size of 5.4 kb, suitable copy numbers in the range of 2-23 copies per cell, and its being the best studied crenarchaeal plasmid. pRN1 contains three conserved open reading frames coding for the multifunctional replication protein Orf904 and for the two sequence specific DNA-binding proteins Orf56 and Orf80. No information regarding the mode of replication or the origin of replication of pRN1 is available.

To deepen the functional understanding of the plasmid pRN1 and to obtain information on essential regions and suitable interruption sites for the vector construction, the transcription of the plasmid was studied, revealing five transcription units within the regions of the open reading frames. The open reading frames *orf56* and *orf904* are cotranscribed from a common promoter and form the replication operon of the plasmid. The third conserved open reading frame *orf80* is also transcribed. Additionally three antisense transcripts were detected, partly overlapping with the sense transcripts. Quantitative examination of the time course of the transcript abundance in different growth phases in combination with transcript stability measurements yielded first suggestions for possible regulatory mechanisms. *In vivo* experiments revealed that the protein Orf56 acts as transcriptional repressor and controls the transcription of the replication operon. The region of the replication operon was classified as essential for the shuttle vector construction. To obtain a variety of different interruption sites within the remaining region of

pRN1, a transposon based library was generated and 13 constructs with equally distributed interruption sites were chosen.

Different selectable markers for *Sulfolobus* were tested. Stability problems due to the growth conditions of *Sulfolobus* restricted the use of antibiotics in combination with resistance conferring enzymes. For that reason selection methods relying on metabolically deficient recipient strains were tested. Efficient selection could be achieved by complementing uracil auxotrophic *pyrEF* deficient recipient strains with the intact *pyrEF* genes from *Sulfolobus solfataricus* P2 as selectable marker. Different *pyrEF* mutant strains were isolated and characterized with regard to their phenotype, genotype and reversion frequency.

Restriction activity in recipient strains can interfere with the successful replication of shuttle constructs. Therefore the different recipient strains were assayed for restriction activity. In case restriction activity was observed, methylases were tested in order to protect the shuttle vectors from restriction. As genomic instabilities due to high activity of insertion sequences had been observed in well characterized *Sulfolobus* strains, it was attempted to find genetically more stable recipient strains. For that reason the spontaneous mutation frequency and the fraction of insertion element mutants for different *Sulfolobus* strains were determined.

The potential shuttle vector constructs were transformed into six different uracil auxotrophic recipient strains. 11 out of 13 constructs replicated stably in the *pyrE* deletion mutant *Sulfolobus acidocaldarius* MR31 showing copy numbers of 2-8 vectors per cell without rearranging or integrating into the genome. The shuttle vectors were found to be stable in *E. coli* and to be suitable for cloning of additional DNA sequences. By analyzing the replication ability of the different interruption constructs and additional deletion constructs information on the functional role of the conserved open reading frame *orf80* was obtained and the minimal replicon of pRN1 could be narrowed down. Furthermore, the suitability of the vector constructs for reporter gene experiments and for the expression of proteins in *Sulfolobus* was demonstrated. Using lactose selection, the host range of the shuttle vectors could be extended to *S. solfataricus*. The key factor for the successful establishment of the shuttle vectors was identified to be high selective pressure, that can only be obtained with deletion mutants. This finding will facilitate the development of further genetic systems for *Sulfolobus*.

1 Einleitung

1.1 Archaea

Sulfolobus spp. ist ein Vertreter der dritten Domäne des Lebens, der Archaea. Zur Zeit der ersten Beschreibung eines Vertreters der Gattung *Sulfolobus* (Brock *et al.*, 1972) war noch nicht bekannt, dass neben den Bakterien eine weitere prokaryontische phylogenetische Gruppe existiert, die sich von den Bakterien in vielerlei Hinsicht grundlegend unterscheidet. Woese und Fox (1977) beschrieben, basierend auf dem Vergleich von 16S rRNA-Sequenzen, die spezielle Stellung einiger Mikroorganismen und nannten sie „Archaeobakterien“. 1990 publizierten Woese *et al.* den Vorschlag, den jetzt Archaea genannten Organismen den Rang einer Domäne und damit dieselbe phylogenetische Stellung zuzuweisen, wie Bakterien und Eukaryonten (Abbildung 1). Trotz anfänglicher Widerstände ist diese Einteilung heute weitgehend akzeptiert und wurde durch eine Vielzahl weiterer Befunde untermauert.

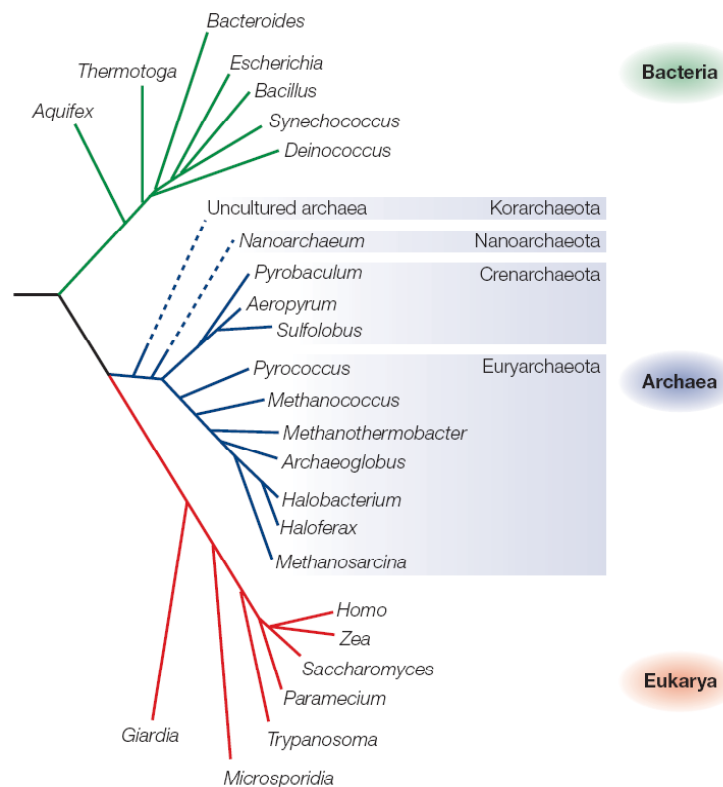


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum (aus Allers und Mevarech, 2005).

Die ersten bekannten Vertreter der Archaeen waren durchwegs halophile, methanogene oder hyperthermophile Organismen, so dass für sie auch der Name „Extremophile“ geprägt wurde. So sind unter den prokaryontischen Organismen mit den höchsten Wachstumstemperaturen, die zur Zeit bekannt sind, vor allem Archaeen zu finden (Stetter, 1999). Der Wachstumstemperrcord wird von dem Archaeon *Pyrolobus fumarii* mit 113 °C gehalten (Blöchl *et al.*, 1999). Das Vorkommen von Archaeen ist jedoch nicht auf einige Nischen beschränkt. Sie wurden mittlerweile auch in vielen meso- oder psychrophilen Lebensräumen nachgewiesen (Olsen, 1994, Stein und Simon, 1996, Pace, 1997, Cavicchiolo, 2006) und übertreffen in

manchen Bereichen Bakterien sogar zahlenmäßig (Karner *et al.*, 2001, Leininger *et al.*, 2006). Innerhalb der Archaea unterscheidet man die Phyla Euryarchaeota und Crenarchaeota (Garrity *et al.*, 2004), zu denen *Sulfolobus* gehört. Daneben wurden die Korarchaeota postuliert, für das jedoch bis jetzt nur unkultivierbare Vertreter beschrieben sind (Barns *et al.*, 1996). Die Nanoarchaeota haben zur Zeit nur einen bekannten Vertreter, *Nanoarchaeum equitans*, ein Organismus, der vergesellschaftet mit einem anderen Archaeon, *Ignicoccus spp.*, vorkommt (Huber *et al.*, 2002).

1.2 Ähnlichkeiten der Archaea zu Bakterien und Eukaryonten

Archaea weisen eine prokaryontische Morphologie und Zellorganisation auf. Sie haben keinen Zellkern und meist ein ringförmiges Chromosom. Für halophile Archaea wurden jedoch bis zu 18 Kopien eines Chromosoms pro Zelle beschrieben (Breuert *et al.*, 2006) und *Haloferax volcanii* besitzt neben seinem Hauptchromosom noch drei weitere Chromosomen (Norais *et al.*, 2007). Für *Sulfolobus solfataricus* und *Sulfolobus acidocaldarius* konnte gezeigt werden, dass ihr Zellzyklus eine ausgedehnte G2-Phase aufweist, in der zwei Chromosomen pro Zelle vorliegen (Bernander und Poplawski, 1997, Hjort und Bernander, 2001). Ähnlich zu Bakterien ist die genetische Information in Operons organisiert. Wie in Bakterien ist eine Shine-Dalgarno-Sequenz nötig, damit die Translation offener Leseraster erfolgen kann, die nicht am Anfang eines Operons liegen (Condo *et al.*, 1999). Anders als bei Bakterien findet man jedoch für den ersten offenen Leseraster eines Operons meist keine Ribosomenbindungsstelle (Tolstrup *et al.*, 2000). Archaea weisen im Vergleich zu Bakterien einen hohen Anteil an *leaderless*-Transkripten auf (Torarinsson *et al.*, 2005), d.h. die Transkription startet direkt am Translationsinitiationscodon oder nur wenige Nukleotide davor (Londei, 2005). Für die Initiation der Translation ist in diesem Falle ein spezieller Mechanismus verantwortlich (Condo *et al.*, 1999, Sartorius-Neef und Pfeifer, 2004).

Einige Prozesse der Informationsverarbeitung zeigen in Archaeen jedoch stärkere Ähnlichkeiten zu den Eukaryonten als zu den Bakterien. So weisen Proteine, die an der Replikation, Transkription, Translation und Reparatur beteiligt sind (Edgell und Doolittle, 1997, Bell und Jackson, 1998, Bernander 1998, Kelman und White, 2005, Duggin und Bell, 2006), höhere Ähnlichkeit zu eukaryontischen als zu bakteriellen Proteinen auf. Hinzu kommt, dass insbesondere die Prozesse der Replikation und Transkription in Archaeen ähnlich zu denen in Eukaryonten organisiert sind. Daher ist es attraktiv, komplexe eukaryontische Prozesse mit Hilfe von archaealen Modellsystemen zu untersuchen, da diese meist aus einer geringeren Zahl an Einzelkomponenten aufgebaut sind.

Die Transkriptionsinitiation ist ein Beispiel dafür (Reiter *et al.*, 1990). Zur Transkriptionsinitiation werden in Archaeen nur drei verschiedene Proteine unbedingt benötigt: das *TATA-box binding protein* (TBP) und der *transcription factor B* (TFB, homolog zum eukaryontischen TFIIB) binden an die TATA-Box und das *transcription factor B responsive element* (BRE) und vermitteln so die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA im Bereich der Transkriptstartposition (Qureshi *et al.*, 1997, Bell und Jackson, 1998). Die Bindung von TFB an das BRE bestimmt dabei die Polarität der Transkription (Bell *et al.*, 1999a, Littlefield *et al.*, 1999). Archaeale RNA-Polymerasen weisen sowohl in der Sequenz als auch bezüglich der

Quartärstruktur Ähnlichkeiten zur eukaryontischen RNA-Polymerase II auf (Langer *et al.*, 1995).

Der Prozess der Replikation in *Sulfolobus* kann ebenfalls als Modellsystem für den eukaryontischen Prozess dienen (Barry and Bell, 2006). So konnte gezeigt werden, dass *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* jeweils drei chromosomale Replikationsursprünge besitzen (Robinson *et al.*, 2004, Lundgren *et al.*, 2004). Die Replikationsgabel bewegt sich bidirektional mit einer Geschwindigkeit, die etwa eine Größenordnung unter der für *E. coli* bestimmten Replikationsrate liegt, und damit im selben Bereich der für Eukaryonten gemessenen Werte (Lundgren *et al.*, 2004).

1.3 Die Gattung *Sulfolobus*

Die Gattung *Sulfolobus* wurde 1972 durch Brock *et al.* eingeführt. Der Typstamm der Gattung ist *S. acidocaldarius* 98-3 (DSMZ 639). Dieser Stamm wurde aus der Locomotive Spring des Yellowstone Nationalparks isoliert und seine Genomsequenz wurde 2005 veröffentlicht (Chen *et al.*, 2005). Verschiedene Stämme von *S. solfataricus* wurden aus den Solfataren bei Pisciarelli in der Nähe von Neapel isoliert (DeRosa *et al.*, 1975, Zillig *et al.*, 1980), darunter auch der am häufigsten verwendete Stamm *S. solfataricus* P2 (DSMZ 1617), dessen Genomsequenz 2001 als erste der Gattung *Sulfolobus* veröffentlicht wurde (She *et al.*, 2001), sowie *S. solfataricus* P1 (DSMZ1616). Die Art *S. islandicus* war bis zur Fertigstellung dieser Arbeit nicht offiziell beschrieben. Die Artbeschreibung soll nach Abschluss der Genomsequenzierung zusammen mit der Sequenz veröffentlicht werden (David Prangishvili, persönliche Mitteilung). Eine Vielzahl von *S. islandicus* Stämmen wurde durch Zillig *et al.* (1994) aus verschiedenen geothermalen Gebieten auf Island isoliert. Ein Großteil aller bis heute isolierten, beschriebenen und sequenzierten extrachromosomalen Elemente stammt aus *S. islandicus* Stämmen. Besonders hervorzuheben sind die Stämme REN1H1, der die beiden Plasmide pRN1 und pRN2 enthält (Keeling *et al.*, 1996, Keeling *et al.*, 1998), REN2H1 und LAL14/1, die erfolgreich als Wirt für verschiedene Viren eingesetzt wurden (Peng *et al.*, 2004), REY15/4, der das Plasmid/Virus-Hybrid pSSVx sowie den Virus SSV2 enthält (Arnold *et al.*, 1999) und HVE10/4, dessen Genom zur Zeit sequenziert wird. Weiterhin ist *Sulfolobus shibatae* B12 (DSMZ 5389) erwähnenswert, der aus Beppu in Japan stammt und der ursprüngliche Wirt des Virus SSV1 (*Sulfolobus shibatae virus* 1) ist (Yeats *et al.*, 1982, Grogan *et al.*, 1990). Eine Reihe weiterer Arten wurde isoliert und beschrieben, darunter *Sulfolobus tokodaii* 7 (DSMZ 16993) aus Beppu in Japan (Suzuki *et al.*, 2002), dessen Genomsequenz ebenfalls verfügbar ist, *Sulfolobus metallicus* (DSMZ 6482) aus Island (Huber und Stetter, 1991), *Sulfolobus tengchongensis* (Xiang *et al.*, 2003) und *Sulfolobus yangmingensis* (Jan *et al.*, 1999) aus China. Für letztgenannte Arten liegen sehr wenige Erwähnungen in der Literatur vor. Die bestuntersuchten und am häufigsten verwendeten Spezies sind *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius*.

Sulfolobus-Zellen zeigen eine kokkenartige Morphologie, die insbesondere im Falle von *S. acidocaldarius* durch unregelmäßige lappenartige Ausbuchtungen („lobes“, Brock *et al.*, 1972, zweiter Bestandteil des Namens *Sulfolobus*) gekennzeichnet sind.

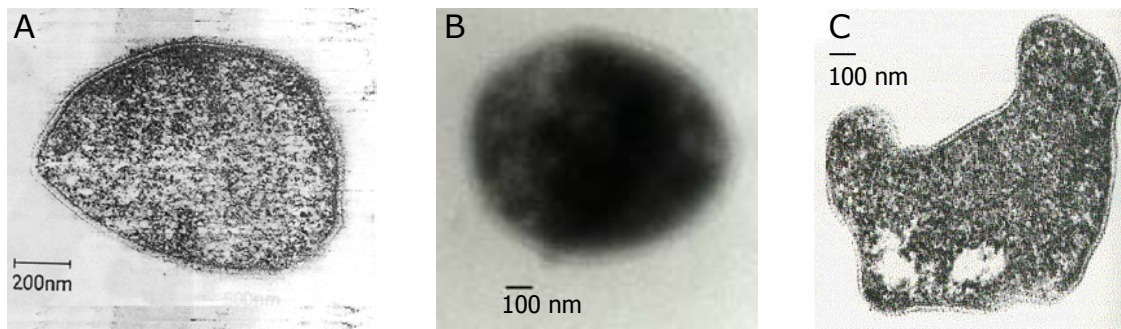


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einzelner Zellen verschiedener *Sulfolobus* Arten. A: *S. solfataricus* (Labor von Wolfram Zillig), B: *S. islandicus* (eigene Aufnahme), C: *S. acidocaldarius* (aus Madigan *et al.*, 2001).

Die Zellen haben Durchmesser von etwa 1 μm und sind von einer quasikristallinen Proteinhülle, dem S-Layer, umgeben (Weiss, 1974). Diese ca. 10 nm dicke Schicht aus regelmäßig angeordneten Glycoproteineinheiten mit etwa 5 nm messenden Öffnungen an der Oberfläche, umschließt den periplasmatischen Raum (ca. 20 nm Dicke) zwischen S-Layer und Zellmembran und ist in letzterer verankert (Prüschenk *et al.*, 1987). Die Zellmembran von *Sulfolobus* besteht aus archaeentypischen Glyceroletherlipiden (Tornabene und Langworthy, 1979). Wie in anderen (hyper)thermophilen Archaeen, weist die Membran von *Sulfolobus* bipolare Tetraetherlipide auf. Diese Lipide durchspannen die gesamte Membran und bilden daher keine Lipiddoppelschicht, sondern eine Monoschicht aus (Gulik *et al.*, 1988).

Sulfolobus ist ein Vertreter der thermoacidophilen Archaea. Teilweise wird *Sulfolobus* auch als hyperthermophil eingestuft. Die Untergrenze für Hyperthermophilie wird je nach Autor unterschiedlich bei 75-80 $^{\circ}\text{C}$ definiert. Die optimalen Wachstumstemperaturen der meisten *Sulfolobus*-Isolate liegen genau in diesem Bereich (Wachstum im Bereich 65-88 $^{\circ}\text{C}$ (Grogan, 1989), optimale Temperaturen von 75-85 $^{\circ}\text{C}$ (Huber und Prangishvili, 2006)), so dass eine Einteilung sowohl als hyperthermophil als auch als extrem thermophil (Madigan *et al.*, 2001) gerechtfertigt erscheint. Zusätzlich zu hohen Temperaturen ist *Sulfolobus* auch an ein saures Wachstumsmilieu (pH 2-5,5) (Grogan, 1989) angepasst. Der intrazelluläre pH-Wert liegt jedoch im neutralen Bereich bei pH 7 (Moll und Schäfer, 1988).

Eine Besonderheit hyperthermophiler Archaea, die auch bei *Sulfolobus* zu finden ist, ist das Enzym Reverse Gyrase, das die DNA des Organismus in eine positiv superspiralisierte Form überführt (Nadal *et al.*, 1988, Lopéz-García und Forterre, 2000). Reverse Gyrase ist das einzige Enzym, das ausschließlich für Hyperthermophile typisch ist (Forterre, 2002).

Der erste Teil des Gattungsnamens „*Sulfolobus*“ leitet sich von der Fähigkeit ab, Energie durch Oxidation elementaren Schwefels oder sulfidischer Erze zu gewinnen (Huber und Prangishvili, 2006). Die heute routinemäßig verwendeten Laborstämme, wie *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* haben jedoch diese Fähigkeit zu chemolithoautotrophem Wachstum verloren (Huber und Prangishvili, 2006) und wachsen auf komplexen organischen Nährmedien zu relativ hohen Zelldichten heran (Grogan, 1989). Verdopplungszeiten liegen im Bereich von 3 h bis 11 h, je nach Spezies und Wachstumstemperatur. Da alle Vertreter der Gattung *Sulfolobus* aerob sind (Huber und Prangishvili, 2006), sind sie unter relativ einfachen Bedingungen

(Thermoschüttler und Verdunstungsschutz an Kulturgefäßen) im Labor kultivierbar. Sie sind ebenfalls mit hohen Effizienzen auf Gelrite-Platten plattierbar (Grogan, 1989).

1.4 Das Plasmid pRN1

Das Plasmid pRN1 umfasst 5350 bp und wurde im Zuge einer Probenahmekampagne in geothermal geprägten Gebieten Islands (Zillig *et al.*, 1994) isoliert. Es kommt in seinem natürlichen Wirtstamm *S. islandicus* REN1H1 zusammen mit dem Plasmid pRN2 vor (Zillig *et al.*, 1994, Zillig *et al.*, 1996). Purschke und Schäfer (2001) konnten jedoch zeigen, dass pRN1 und pRN2 unabhängig voneinander replizieren, und isolierten *S. islandicus* Stämme, die entweder nur pRN1 oder nur pRN2 enthalten.

pRN1 wird zur pRN-Plasmidfamilie gezählt. Diese Plasmidfamilie umfasst neben pRN1 die Plasmide pRN2, pHEN7, pDL10 und das Plasmid-Virus-Hybrid pSSVx (Keeling *et al.*, 1996, Keeling *et al.*, 1998, Kletzlin *et al.*, 1999, Arnold *et al.*, 1999, Peng *et al.*, 2000). Grundlage für diese Eingruppierung sind Bereiche hoher Sequenzähnlichkeit, die in allen fünf Elementen vorhanden sind. In diesen Bereichen finden sich in allen Plasmiden drei konservierte offene Leseraster. Jedes der Plasmide weist darüber hinaus auch eine variable Region auf, die ebenfalls offene Leseraster enthält, allerdings ohne Ähnlichkeit zu bisher bekannten offenen Leserastern.

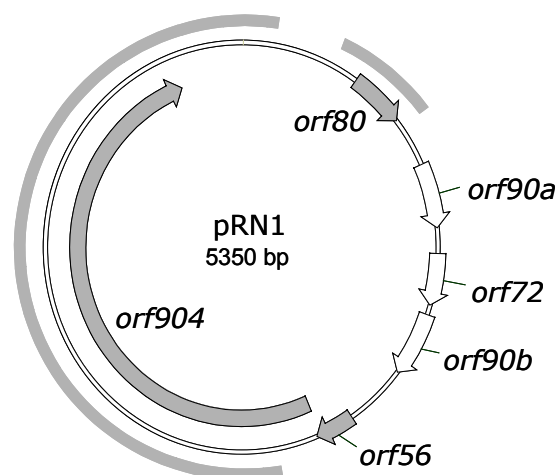


Abbildung 3: Karte des Plasmides pRN1. Sechs von Keeling *et al.* (1996) identifizierte offene Leseraster sind eingezeichnet. Die innerhalb der pRN-Familie konservierten offenen Leseraster *orf56*, *orf904* und *orf80* sind als graue, die nicht konservierten *orf90a*, *orf72* und *orf90b* als weiße Pfeile dargestellt. Innerhalb der pRN-Familie auf Nukleotidebene konservierte Regionen sind in grau gekennzeichnet.

Keeling *et al.* (1996) stellten für Orf56 schwache Sequenzähnlichkeiten zu bakteriellen Plasmidkopienzahl-Regulationsproteinen (*copy number control proteins*) fest. Im Bereich des langen offenen Leserasters *orf904* wurden Sequenzbereiche mit Ähnlichkeiten zu Helikase-Domänen von Bakteriophagen-Proteinen gefunden (Keeling *et al.*, 1996).

Die Aktivitäten von Orf56, Orf904 und Orf80 wurden anhand von heterolog in *E. coli* überexprimierten Proteinen charakterisiert. Orf56 ist ein sequenzspezifisch DNA-bindendes Protein, das als Tetramer an eine 25 bp umfassende palindromische Sequenz (12 bp pro Halbseite) unmittelbar vor Beginn seines eigenen offenen Leserasters bindet (Lipps *et al.*, 2001a). Orf904 ist ein multifunktionelles Enzym, das Primase-, Polymerase- und Helikaseaktivität zeigt (Lipps *et al.*, 2003). Die Struktur der Prim/Pol-Domäne von Orf904

konnte gelöst werden und zeigt Ähnlichkeit zur Struktur der Primase aus *Pyrococcus furiosus* (Lipps *et al.*, 2004). Orf80 ist ebenfalls ein sequenzspezifisch DNA-bindendes Protein, das an die Sequenz TTAAN₇TTAA bindet, die zweimal im Abstand von 65 bp vor Beginn von *orf80* vorkommt und einmal innerhalb von *orf904* (Lipps *et al.*, 2001b, Lysetskaya *et al.*, 2005).

Basierend auf den verschiedenen Aktivitäten der Proteine wurde ein Modell für die Replikation bzw. Regulation der Replikation von pRN1 vorgestellt (Lipps, 2004): Wenn *orf56* und *orf904* kotranskribiert würden, könnte Orf56 durch Bindung an die palindromische Sequenz vor Beginn des offenen Leserasters *orf56* die Transkription seines eigenen und des offenen Leserasters *orf904* regulieren. Orf904 ist das Replikationsprotein des Plasmides pRN1 und wahrscheinlich in die Initiation der Plasmidreplikation involviert. Die Funktion von Orf80 ist unklar. Da dieses Protein jedoch auf allen bisher charakterisierten Plasmiden aus *Sulfolobus* mit Ausnahme von pORA1 (Greve *et al.*, 2005) und pIT3 (Prato *et al.*, 2006) konserviert ist (Garrett, 2004), wurde vermutet, dass es eine wichtige regulatorische Funktion hat (Kletzin *et al.*, 1999, Lipps *et al.*, 2001b, Greve *et al.*, 2005) oder an der Replikationsinitiation des Plasmides beteiligt ist (Lipps *et al.*, 2001b, Lipps, 2006).

Die Organisation der offenen Leseraster von *orf56* und *orf904*, die sich unmittelbar hintereinander befinden, bzw. je nach tatsächlichem Startcodon von Orf904 sogar überlappen, erinnert an das bakterielle Plasmid pLS1, dessen CopG-Protein Ähnlichkeiten zu Orf56 zeigt. Das Replikationsoperon von pLS1 besteht aus den kotranskribierten offenen Leserastern *copG* und *repB*, wobei *repB* für das Plasmidreplikationsprotein codiert. CopG bindet wie Orf56 an eine palindromische Sequenz im Bereich der -35-Box des gemeinsamen *copG/repB*-Promotors und wirkt als Transkriptionsrepressor (del Solar und Espinosa, 1992). CopG ist jedoch nur eine Komponente der Kopienzahlkontrolle des Plasmides pLS1. Das *antisense*-Transkript RNAII, das die Shine-Dalgarno-Sequenz von *repB* blockiert und damit die Translation des Replikationsproteins verhindert, ist die zweite Komponente dieses Regulationssystems (del Solar and Espinosa 1992, del Solar and Espinosa 1997, del Solar and Espinosa 2000, Brantl, 2004).

Aufgrund bioinformatischer Vorhersagen von Sekundärstrukturelementen innerhalb der Plasmidsequenzen von pRN1, pRN2 und pDL10, die Ähnlichkeit zu Einzelstrang- (*single strand origin*) und Doppelstrangreplikationsursprüngen (*double strand origin*) bakterieller Plasmide mit *rolling circle*-Replikation zeigen, vermuteten Kletzin *et al.* (1999), dass auch die Plasmide der pRN-Familie nach diesem Mechanismus repliziert würden. Durch die Aufklärung der verschiedenen Funktionen des Replikationsproteins Orf904 erscheint dieser Replikationsmechanismus jedoch sehr unwahrscheinlich. Für bakterielle Plasmide ist neben der *rolling circle*-Replikation der Theta-Mechanismus beschrieben, bei dem das Plasmid analog zur Replikation eines zirkulären bakteriellen Genoms repliziert wird. Ein weiterer Mechanismus ist die *strand displacement*-Replikation, die durch die Ausbildung eines *D-Loops* gekennzeichnet ist. Für pDL10 wurden einzelsträngige Replikationsintermediate nachgewiesen (Kletzin *et al.*, 1999). Dieser Befund könnte, im Gegensatz zur Interpretation der Autoren, die dies als einen Hinweis für *rolling circle*-Replikation werteten, auch auf eine *strand displacement*-Replikation hindeuten. Bei der Ausbildung eines *D-Loops* entstehen ebenfalls längere Regionen

einzelsträngiger DNA, wie für das bakterielle Plasmid RSF1010 beschrieben (Honda et al., 1991, Scherzinger *et al.*, 1991).

Über den tatsächlichen Replikationsmechanismus von pRN1 lagen keine definitiven Informationen vor, ebenso wenig über den Replikationsursprung oder ein minimales Replikon. Auch die Transkription des Plasmides pRN1 war bisher nicht untersucht worden.

1.5 *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektoren

Als Shuttle-Vektor wird ein Vektor definiert, der in mindestens zwei verschiedenen Organismen replizieren kann. Als einer der Organismen wird in aller Regel *E. coli* gewählt, da in diesem Organismus die Techniken zur Herstellung rekombinanter DNA-Sequenzen am weitesten perfektioniert sind. Der andere Organismus ist der Zielorganismus, in diesem Falle *Sulfolobus*. Im Zielorganismus kann der Shuttle-Vektor entweder in einer oder in mehreren Kopien episomal vorliegen oder in einer oder mehreren Kopien in das Wirtschromosom integriert werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden Shuttle-Vektoren als Vektoren definiert, die in extrachromosomaler Form im Rezipient vorliegen und daher notwendigerweise ein *Sulfolobus*-Replikon enthalten müssen.

Als Grundlage für einen *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektor wird dabei meist ein komplettes extrachromosomales Element aus *Sulfolobus* verwendet, da so die Replikationsfähigkeit im Zielorganismus sichergestellt werden kann, sofern keine essentiellen Regionen des Elements unterbrochen wurden. Im Prinzip kann schon eine Fusion aus einem *E. coli*-Vektor und einem extrachromosomalen Element aus *Sulfolobus* einen Shuttle-Vektor ergeben. Da jedoch die Transformation von *Sulfolobus*-Zellen nur mit geringer Effizienz möglich ist (Cannio *et al.*, 2001, Aucelli *et al.*, 2006), ist es erforderlich die nicht transformierten Zellen durch einen Selektionsmechanismus von den Transformanten abzutrennen. Ist eine effiziente Selektionsmethode vorhanden, stellt eine niedrige Transformationseffizienz kein Hindernis bei der Gewinnung von Einzeltransformanten aus der Primärtransformationsmischung dar.

Für die zu den Euryarchaeota gehörenden halophilen, methanogenen und hyperthermophilen Archaeen wurden bereits in den 1990er Jahren verschiedene Shuttle-Vektoren entwickelt (Charlebois *et al.*, 1987, Holmes und Dyall-Smith, 1990, Nieuwlandt und Daniels, 1990, Holmes *et al.*, 1991, Cline und Doolittle, 1992, Holmes *et al.*, 1994, Tumbula *et al.*, 1997, Gardner und Whitman, 1999, Lucas *et al.*, 2002, Sato *et al.*, 2005), und seitdem in zahlreichen genetischen Studien und zur Proteinexpression eingesetzt (für eine Zusammenfassung siehe Allers und Mevarech, 2005). Für die Crenarchaeota und ihren bestuntersuchten Vertreter *Sulfolobus* gelang es bisher jedoch nicht, einfach handhabbare Shuttle-Vektoren zu entwickeln. Zwar wurde an dieser Aufgabe seit Entdeckung der ersten extrachromosomalen Elemente aus *Sulfolobus* in vielen Labors gearbeitet (Kletzin *et al.*, 1999, Stedman *et al.*, 2000, Allers und Mevarech, 2005), jedoch mit geringem Erfolg. So hat sich keines der bisher publizierten Shuttle-Vektorsysteme als ein in vielen Laboren verwendetes Standardsystem etablieren können, da die wenigen publizierten Konstrukte große Probleme bei der Anwendbarkeit aufwiesen (Lipps, 2006).

1.6 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Entwicklung eines *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektors basierend auf dem Plasmid pRN1 und die weitergehende Charakterisierung dieses Plasmides. Dazu sollte die Kopienzahl und die Transkription des Plasmides untersucht, und das Verständnis der Replikation und Regulation der Kopienzahl des Plasmides pRN1 vertieft werden. Aufbauend auf diesen Untersuchungen sollten Hinweise auf besonders geeignete Unterbrechungsstellen für die Shuttle-Vektorkonstruktion gefunden bzw. essentielle Regionen abgegrenzt werden. Da *Sulfolobus* nur mit niedriger Effizienz transformiert werden kann, wurde großer Wert auf die Entwicklung einer effektiven Selektion gelegt. Es sollten sowohl Selektionsverfahren mittels Antibiotika in Kombination mit resistenzvermittelnden Enzymen als auch Verfahren basierend auf auxotrophen oder metabolisch defizienten Mutanten getestet werden. Um letztere Selektionsverfahren einsetzen zu können war es notwendig Mutanten zu isolieren und zu charakterisieren, sofern nicht bereits entsprechende Mutanten verfügbar waren. Schließlich sollten aus einer Reihe verschiedener *Sulfolobus* Stämmen die am besten geeigneten Wirtsstämme identifiziert werden. Dazu wurden verschiedene Stämme auf Restriktionsaktivität untersucht. Um restriktionsaktive Stämme dennoch als Rezipienten einsetzen zu können, wurde durch Methylierung der Shuttle-Vektoren versucht einen Schutz vor dem Restriktionssystem zu erzielen. Weiterhin sollte ein genetisch möglichst stabiler Rezipientenstamm mit geringer Transposonaktivität gefunden werden.

Ausgehend von den Ergebnissen der Tests bereits verfügbarer, jedoch schwer handhabbarer Virus-basierter Shuttle-Vektoren wurden wichtige Anforderungen an das zu entwickelnde *Sulfolobus-E. coli*-Shuttle-Vektorsystem definiert:

- Stabilität in *E. coli*
- Stabilität in *Sulfolobus* unter selektiven Wachstumsbedingungen
- ausschließlich episomales Vorliegen des Vektors, keine unerwünschte Integration in das Wirtschromosom
- einfache Handhabung (effizientes Klonieren möglich, möglichst kurze Zeit zur Gewinnung von Einzeltransformanten, Plattierung nach der Transformation möglich)
- relativ kleine Größe, zur Aufnahme längerer DNA-Sequenzen geeignet
- möglichst breites Wirtsspektrum (in verschiedenen *Sulfolobus*-Isolaten einsetzbar)

Der Vektor sollte zum einen als Werkzeug für weitergehende genetische Untersuchungen des Plasmides pRN1 dienen. Zum anderen wäre ein plasmidbasierter, nicht integrativer Multikopienvektor relativ kleiner Größe natürlich auch von hohem allgemeinen Interesse zur homologen Proteinexpression in *Sulfolobus* oder zur Behandlung genetischer Fragestellungen, da ein solcher Vektor trotz langjähriger Bemühungen bisher nicht zur Verfügung stand. Ein solcher Vektor würde dazu beitragen, die Nachteile für molekularbiologische, genetische und biochemische *in vivo*-Arbeiten innerhalb der Crenarchaeota zu beseitigen.

2 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

2.1 Überblick über die verschiedenen Arbeitsschritte zur Entwicklung eines *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektorsystems

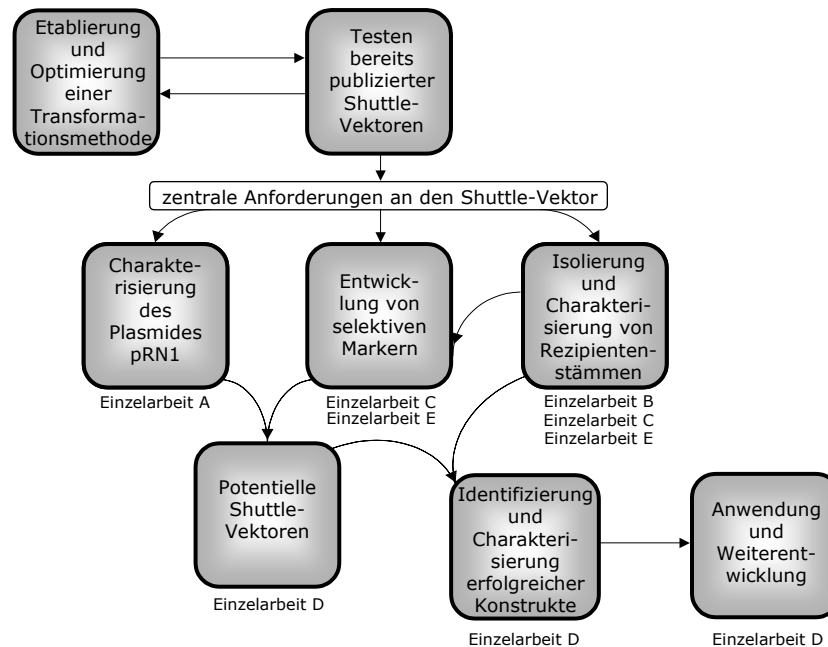


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Entwicklung eines *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektorsystems. Die Einzelarbeiten, die die Grundlage dieser Arbeit bilden, sind den jeweiligen Arbeitsschritten zugeordnet.

Der erste Schritt bei der Entwicklung eines *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektorsystems war die Etablierung einer Transformationsmethode für *Sulfolobus*. Die Transformationsbedingungen wurden zunächst mit Hilfe eines bereits publizierten Virus-basierten Shuttle-Vektors etabliert und unter den gegebenen Laborbedingungen optimiert. Da sich in weiteren Tests alle erhältlichen, bereits publizierten Shuttle-Vektoren als gar nicht oder nur eingeschränkt nutzbar erwiesen, war es notwendig, ein eigenes Shuttle-Vektorsystem zu entwickeln. Um die Probleme bestehender Systeme zu vermeiden, wurde eine Reihe von Anforderungen definiert, die das zu entwickelnde Vektorsystem erfüllen sollte (Kapitel 1.6 Zielsetzung). Die Arbeiten zur Entwicklung des Shuttle-Vektors teilten sich auf die drei Bereiche Charakterisierung des Plasmides pRN1, Test und Entwicklung selektiver Marker und Isolierung und Charakterisierung von Rezipientenstämmen auf. Verschiedene potentielle Shuttle-Vektorkonstrukte, basierend auf Konstrukten mit verschiedenen Unterbrechungsstellen in pRN1 und dem selektiven Marker, der sich im Verlauf der Versuche als am effektivsten herausstellte, wurden dann in die verschiedenen zur Verfügung stehenden Rezipientenstämmen transformiert und auf ihre erfolgreiche Replikation in den Rezipientenstämmen hin untersucht. Erfolgreiche Konstrukte wurden detailliert charakterisiert und hinsichtlich der anfänglich an das zu entwickelnde Vektorsystem gestellten Anforderungen bewertet. Konstrukte, die die Anforderungen erfüllten, wurden für weitergehende Anwendungen eingesetzt.

Im folgenden werden grundlegende Überlegungen zu einzelnen Komponenten des Shuttle-Vektorsystems näher erläutert.

2.1.1 Transformationsmethode

Die Transformationsmethode sollte eine möglichst hohe Transformationseffizienz besitzen, d. h. pro eingesetzter Menge an DNA sollten möglichst viele Transformanten erhalten werden. Auch eine möglichst hohe Transformationsfrequenz ist erwünscht. Diese bezeichnet das Verhältnis der in der Transformation eingesetzten Zellen zu den tatsächlich transformierten Zellen. Erreicht man mit einer Transformationsmethode eine hohe Transformationseffizienz und -frequenz, so ist eine Detektion von erfolgreichen Transformanten auch ohne bzw. mit einem wenig stringenten selektivem Marker möglich. Ist jedoch die Transformationseffizienz und -frequenz niedrig, so bedarf es einer effizienten Selektion, um die wenigen tatsächlich transformierten Zellen von der sie um Größenordnungen übersteigenden Zahl untransformierter Zellen zu trennen.

Es war bekannt, dass *Sulfolobus* mittels Elektroporation transformiert werden kann (Schleper, 1992). Die Elektroporation stellt eine universelle Transformationsmethode dar. Zellen werden in einem Medium hohen elektrischen Widerstandes für sehr kurze Zeit (Millisekundenbereich) einem starken externen elektrischen Feld ausgesetzt. Dadurch kommt es für sehr kurze Zeiträume zu einem starken Anstieg der Leitfähigkeit und Permeabilität der Membran der Zellen (Genco *et al.*, 1993). Um die ursprünglich beschriebene Methode erfolgreich und reproduzierbar auch unter anderen Laborbedingungen und für andere *Sulfolobus* Arten einsetzen zu können, war eine Optimierung bzw. Anpassung der Methode nötig. Der Erfolg einer Elektroporation ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Ein integriertes Maß für den Einfluss dieser Faktoren ist die Zeitkonstante. Sie gibt die Zeitspanne an, die vergeht bis die angelegte Spannung auf die Hälfte des anfänglichen Wertes abgesunken ist. Faktoren, die sich auf die Zeitkonstante auswirken sind das Elektroporatormodell, das Alter der Elektroden, die Küvettegeometrie und die Anzahl der bereits mit dieser Küvette durchgeführten Elektroporationen, die Leitfähigkeit des zur Präparation der Zellen eingesetzten Wassers, sowie der Salzgehalt der eingesetzten DNA-Präparation. Weitere Einflussfaktoren, die die Transformationseffizienz oder die Reproduzierbarkeit beeinflussen, sind die Regenerationsmethode mit der die Zellen direkt nach der Elektroporation behandelt werden, sowie die Vorbehandlung bei der Präparation kompetenter Zellen (Wachstumsphase, Kultivierung der Zellen).

Nach Optimierung der Elektroporationsbedingungen konnte eine Erfolgsquote bei der Elektroporation von 98% ($n = 44$) bei Transformationseffizienzen im Bereich von $1 \cdot 10^2$ - $1 \cdot 10^4$ Transformanten pro μg Plasmid erhalten werden. Die ermittelten Transformationseffizienzen liegen im selben Bereich wie Werte, die für *Sulfolobus* veröffentlicht wurden (Cannio *et al.*, 2001, Kurosawa und Grogan, 2005).

2.1.2 *Sulfolobus*-Replikon

Die Wahl des Plasmides pRN1 als Basis für den Shuttle-Vektor erfolgte aufgrund seiner geringen Größe und der Tatsache, dass es sich um das bisher am besten untersuchte

crenarchaeale Plasmid handelt. In Voruntersuchungen wurde außerdem ermittelt, dass das native Plasmid über viele Generationen (>120) in seinem natürlichen Wirt unter verschiedenen Wachstumsbedingungen stabil repliziert, eine geeignete Kopienzahl (2-23 Plasmide pro Zelle) aufweist und keine Belastung für die Wirtszellen darstellt (Einzelarbeit A).

Zur Konstruktion eines erfolgreichen Shuttle-Vektors mussten geeignete Unterbrechungsstellen innerhalb von pRN1 gefunden werden, die weder die Replikation noch die Stabilität des Plasmides beeinträchtigen. Eine Strategie dazu ist, das Plasmid gezielt an einer nicht essentiellen Stelle zu unterbrechen, die unter Berücksichtigung konservierter Sequenzelemente und eventuell zusätzlich vorhandener funktioneller Informationen ausgewählt wird. Diese Vorgehensweise ist jedoch wenig fundiert, wenn kaum Informationen zum Replikationsmechanismus vorliegen. Eine andere Strategie besteht darin, eine Bibliothek mit vielen unterschiedlichen, zufällig verteilten Unterbrechungsstellen durch ein geeignetes Verfahren zu erstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Strategien kombiniert. Es wurde eine Transposon-basierte umfangreiche Plasmidbibliothek mit zufällig verteilten Unterbrechungsstellen erstellt. Aus dieser Bibliothek wurden dann in einem zweiten Schritt gezielt verschiedene Plasmide ausgewählt und optimiert.

2.1.3 Selektiver Marker für *Sulfolobus*

Da *Sulfolobus* nur mit relativ geringer Effizienz und Frequenz transformiert werden kann, ist eine effiziente Selektion bei Verwendung eines nicht selbst verbreitenden *Sulfolobus*-Replikons eine entscheidende Voraussetzung für eine erfolgreiche Etablierung des Vektors.

Geläufig durch ihren weitverbreiteten Einsatz in Bakterien ist die Verwendung von Antibiotika in Verbindung mit resistenzvermittelnden Enzymen. Das Gen, das für ein solches Enzym codiert, wird als Marker in einen Vektor eingefügt. In Medium, das eine Konzentration des Antibiotikums oberhalb der minimalen Hemmkonzentration (MHK) der Wildtypzellen jedoch unterhalb der MHK der Zellen mit Vektor enthält, können nur transformierte Zellen wachsen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die als Rezipienten in Frage kommenden *Sulfolobus* Stämme auf ihre Sensitivität gegenüber verschiedenen Antibiotika untersucht. Geeignet erscheinende Antibiotika wurden anschließend auf ihre Stabilität unter den Wachstumsbedingungen von *Sulfolobus* getestet. Für relativ stabile Antibiotika wurden thermostabile Varianten resistenzvermittelnder Enzyme auf ihre Wirksamkeit getestet.

Eine andere Form der Selektion beruht auf der Nutzung von metabolisch defizienten Mutanten. In diesen Mutanten ist ein Gen inaktiviert, das für ein Protein eines Stoffwechselweges codiert. Die als Rezipient verwendete Mutante kann nur auf einem speziellen, nicht-selektivem Medium wachsen, dem das Endprodukt des unterbrochenen Stoffwechselweges zugesetzt wird, oder - bei einem anderen Typ der Selektion - eine alternative Kohlenstoff- bzw. Energiequelle enthält. Als selektiven Marker bringt man das intakte, funktionsfähige Gen in einen Vektor ein. Mutanten, die mit diesem Vektor transformiert werden, können dann im Gegensatz zu den untransformierten Mutanten in selektivem Medium wachsen.

Sofern keine geeigneten Mutanten bereits publiziert und erhältlich waren, wurden Mutanten isoliert und phänotypisch, genotypisch und hinsichtlich ihrer Reversionsfrequenz charakterisiert.

2.1.4 Rezipienten

Als Rezipient eines *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektors kam im Prinzip jeder Stamm der bislang isolierten und beschriebenen *Sulfolobus* Arten in Frage.

Rezipientenstämme für einen Shuttle-Vektor sollten verschiedene Anforderungen erfüllen. Zum ersten muss das extrachromosomale Element aus *Sulfolobus*, das als Basis für den Vektor dient, in dem Stamm replizierbar sein. Dies kann strenggenommen nur für den ursprünglichen Wirtstamm angenommen werden. Da Plasmide der pRN-Familie aber in verschiedenen *S. islandicus* Stämmen (Peng *et al.*, 2000) und auch in dem entfernt verwandten crenarchaealen Organismus *Acidianus ambivalens* (pDL10, Kletzin *et al.*, 1999) gefunden wurden, bestand Grund zur Annahme, dass es sich um ein Plasmid mit breitem Wirtsspektrum handeln könnte.

Die Verwendung von nahe verwandten Rezipienten mit hoher Sequenzähnlichkeit auf DNA-Ebene birgt jedoch die Gefahr einer ungewollten homologen Rekombination von Vektorsequenzen mit dem Wirtsgenom, sofern der Vektor als selektiven Marker Gene aus dem Rezipient enthält. Dies führt zu einer in diesem Falle unerwünschten Integration des Vektors ins Wirtsgenom.

Weiterhin sollte der Rezipient keine Restriktions-/Modifikationsbarriere besitzen, oder zumindest sollte diese charakterisiert und überwindbar sein. Zu Beginn dieser Arbeiten war nur für *S. acidocaldarius* bekannt, dass er die Restriktionsendonuclease *SuaI* enthält (Prangishvili *et al.*, 1985). Für *S. solfataricus* P1 und P2 wurde bisher keine Restriktionsaktivität beschrieben. Verschiedene *S. islandicus* Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit auf das Vorhandensein von Restriktions-/ Modifikationsaktivität untersucht.

Eine weitere Anforderung an den Rezipienten ist genetische Stabilität. Der am häufigsten verwendete *S. solfataricus* P2 enthält von allen sequenzierten prokaryontischen Organismen die höchste Zahl an Insertionselementen (Redder und Garrett, 2006). Während der Kultivierung im Labor verlor dieser Stamm 124 kb seines Chromosoms und ein 25 kb-Segment wurde invertiert (Redder und Garrett, 2006). In den Stämmen *S. solfataricus* P1 und P2 wurde eine sehr hohe Transposonaktivität und eine hohe spontane Mutationsrate der *pyrEF*-Gene beobachtet (Schleper *et al.*, 1994, Martusewitsch *et al.*, 2000, Redder und Garrett, 2006). Aufgrund dieses Vorwissens sollte möglichst ein genetisch stabilerer Stamm als Rezipient gefunden werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Stämme auf ihre Mutationsraten getestet und der Anteil der Insertionselementmutanten bestimmt.

2.2 Test und Bewertung bereits publizierter *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektoren

2.2.1 Übersicht über veröffentlichte Shuttle-Vektoren

Zu Beginn der Arbeiten lagen Publikationen zu *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektoren aus drei verschiedenen Arbeitsgruppen vor. Der erste *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektor wurde 1996 von Aagaard *et al.* beschrieben. Für diesen Vektor pDMI1 wurde ein mobiles rDNA Intron des Archaeons *Desulfurococcus mobilis* (Aagaard *et al.*, 1995) mit dem *E. coli*-Vektor pUC18 kombiniert. Ein weiterer Vektor dieser Gruppe, pCSV1, basiert auf dem Plasmid pGT5 aus

Pyrococcus abyssi, das in den *E. coli*-Vektor pUC19 kloniert wurde. Dieses Konstrukt wurde von Aravalli und Garrett (1997) weiterentwickelt. Um die hohe Instabilität in *E. coli* zu verringern wurde das *rom/rop*-Gen zur Reduzierung der Kopienzahl in *E. coli* eingefügt und ein Konstrukt mit einer Alkoholdehydrogenase als selektivem Marker versehen.

Die zweite Arbeitsgruppe konstruierte den Shuttle-Vektor pEXSs (Cannio *et al.*, 1998) auf Basis einer Deletionsform des Virus SSV1 (*Sulfolobus shibatae virus 1*) und des *E. coli*-Vektors pGEM5Zf(-). In diesem Konstrukt wurde erstmalig ein heterologer selektiver Marker für *Sulfolobus* beschrieben. Es handelt sich um eine thermostabilisierte Variante der Hygromycin Phosphotransferase aus *E. coli* (Cannio *et al.*, 2001). Dieser Vektor wurde von derselben Arbeitsgruppe genutzt, um eine Alkoholdehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus* zu exprimieren (Contursi *et al.*, 2003). Außerdem wurde eine *lacS*-Deletionsmutante des Stammes *S. solfataricus* G0 mittels der Gene *lacTr* und *lacS*, codierend für einen Laktosetransporter und eine β -Glykosidase, komplementiert (Bartolucci *et al.*, 2003).

Die dritte Arbeitsgruppe nutzte das komplette Genom des Virus SSV1 als Grundgerüst für einen Shuttle-Vektor. Stedman *et al.* (1999) identifizierten Regionen des Virus, die die Insertion des *E. coli*-Vektors pBluescript dulden, ohne die Infektiosität oder die Replikation von SSV1 zu unterbinden. Aufbauend auf einem dieser Konstrukte wurden zusätzlich die *pyrEF*-Gene codierend für die Orotatphosphoribosyltransferase und die Orotidin-5'-monophosphatdecarboxylase als selektiver Marker eingefügt. Sie erlauben eine Komplementierung uracilaxotropher Mutanten zur Uracilprototrophie. Weiterhin wurde das *lacS*-Gen (β -Glykosidase) als phänotypischer Marker hinzugefügt. Der resultierende Shuttle-Vektor pMJ03 (Jonuscheit *et al.*, 2003) lag in der Primärtransformationsmischung in sehr hoher Kopienzahl extrachromosomal vor. Nach der Plattierung und Isolierung von Einzeltransformanten war er, wie auch der Wildtyp SSV1-Virus, in einer Kopie spezifisch in ein Arginyl-tRNA-Gen des Wirtschromosoms integriert (Schleper *et al.*, 1992). Als Rezipient wurde die *pyrEF/lacS*-Doppelmutante PH1-16 (Martusewitsch *et al.*, 2000) abgeleitet von *S. solfataricus* P1 verwendet. Albers *et al.* (2006) entwickelten den Vektor weiter. Eine Reihe von Vorassemblierungsvektoren wurde erstellt, mit deren Hilfe das Klonieren von anderen Sequenzen in den sehr großen, leicht rekombinierenden pMJ-Vektor erst ermöglicht wurde. Ein induzierbarer Promoter, der *araS*-Promoter (Promoter des Arabinosetransportoperons, Lubelska *et al.*, 2006) aus *S. solfataricus* P2, ermöglichte erstmalig eine induzierbare Expression von Proteinen in *Sulfolobus*.

Gegen Ende der hier beschriebenen Arbeiten wurde von der zweiten Arbeitsgruppe ein weiteres Shuttle-Vektorsystem veröffentlicht (Aucelli *et al.*, 2006). Es baut auf dem Plasmid-Virus-Hybrid pSSVx und dessen Helfervirus SSV2 auf (Arnold *et al.*, 1999). Das Plasmid pSSVx enthält neben der konservierten Region der Plasmide der pRN-Familie zusätzlich zwei offene Leseraster mit sehr hoher Ähnlichkeit zu viralen Sequenzen. Zusätzlich zu SSV2-haltigen Viruspartikeln werden in einer mit pSSVx und SSV2 kotransformierten bzw. kotransfizierten Kultur auch Viruspartikel detektiert, die das Plasmid pSSVx enthalten. Auf diese Weise wird das Plasmid effizient in einer Kultur durch den Helfervirus SSV2 verbreitet. Der Shuttle-Vektor pMSSV wurde durch Einfügen des *E. coli*-Vektors pUC19 erhalten. Ein selektiver Marker ist nicht zur stabilen Replikation in *Sulfolobus* nötig. Es wurde jedoch gezeigt, dass das Konstrukt pMSSV*lacS*, das zusätzlich das *lacS*-Gen (codierend für eine β -Glykosidase) enthält, die

Komplementation einer *lacS*-Deletionsmutante erlaubt. Eine Zusammenfassung und eine Übersicht über bestehende Shuttle-Vektorsysteme gibt folgende Tabelle.

Tabelle 1: Übersicht über alle bisher beschriebenen *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektoren in chronologischer Reihenfolge. Abkömmlinge vorhergehender Konstrukte sind nicht durch eine horizontale Linie abgetrennt.

Name des Konstrukts	Größe (kb)	<i>E. coli</i> -Vektoranteil	<i>Sulfolobus</i> -replikon	selbstverbreitend ja/nein	selektiver (s)/ phänotypischer (p) Marker für <i>Sulfolobus</i>	Lokalisation (Kopienzahl)	Rezipient ^{a)}	Literatur
pDMI1	3,7	pUC18	rDNA intron	ja	-	integriert (1)	<i>S. ac.</i>	Aagaard <i>et al.</i> , 1996
pCSV1	6,1	pUC19	pGT5	nein	-	episomal (nb)	<i>S. ac.</i>	Aagaard <i>et al.</i> , 1996
pAG1	4,7	pUC19	pGT5	nein	-	episomal (nb)	<i>S. ac.</i>	Aravalli und Garrett, 1997
pAG2	5,3	pUC19 + <i>rom/rop</i>						
pAG21	6,5	pUC19 + <i>rom/rop</i>			<i>adh^{b)}</i> -Gen <i>S.so.</i> P2 (s)			
pEXSs	6,4	pGEM5Zf(-)	SSV1 (Deletionsderivat)	nein	<i>hph^{c)}</i> -Gen <i>E. coli</i> (s)	episomal (1-2)	<i>S. so.</i> G0	Cannio <i>et al.</i> , 1998
pKMSD	18,5	pBluescriptII SK+	SSV1 (komplett)	ja	-	integriert (1) episomal (20-40)	<i>S. so.</i> P1 <i>S. so.</i> PH1 <i>S. so.</i> P2 <i>S. so.</i> G0	Stedman <i>et al.</i> , 1999
pMJ03 pMJ05	21,8	pUC18	SSV1 (komplett)	ja	<i>pyrEF^{d)}</i> -Gene (s) <i>lacS^{e)}</i> -Gen (p) beide <i>S. so.</i> P2	Einzeltransformanten: 1 (integriert) + ev. wenige episomal ^{f)}	<i>S. so.</i> PH1-16	Jonuscheit <i>et al.</i> , 2003, Albers <i>et al.</i> , 2006
pSSVrt	8,4	pUC19			-			
pMSSV	7,6	pUC18 –	pSSVx/	ja	-	episomal (<1-130)	<i>S. so.</i> G0W <i>S. so.</i> P2	Aucelli <i>et al.</i> , 2006
pMSSV _{lacS}	9,6	Deletionsderivat	SSV2		<i>lacS^{e)}</i> -Gen (s und p) <i>S. so.</i> P2			

a) *S. ac.* = *S. acidocaldarius*, *S. so.* = *S. solfataricus*, b) codiert für Alkoholdehydrogenase, Selektion mit Butanol oder Benzylalkohol, c) codiert für Hygromycin Phosphotransferase, thermostabilisiertes Enzym aus *E. coli* das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, d) codieren für Orotatphosphoribosyltransferase und Orotidin-5'-monophosphatdecarboxylase, verhelfen Mutanten zu Uracilprototrophie, e) codiert für β -Glycosidase mit β -Galaktosidaseaktivität, f) in Originalpublikation nur 1 Kopie, in eigenen Tests jedoch zusätzlich 2-3 episomale Kopien (Teilarbeit A), nb = nicht bestimmt.

2.2.2 Bewertung bereits publizierter Shuttle-Konstrukte anhand von Literaturangaben und eigenen Tests

Die Shuttle-Vektoren pDMI1, pCSV1 sowie die verschiedenen pAG-Konstrukte auf Basis des pGT5-Plasmides wurden außer ihrer ersten Erwähnung nie für genetische Experimente in *Sulfolobus* eingesetzt. Ein großer Nachteil dieser Konstrukte ist die Instabilität in *E. coli* (Aravalli und Garrett, 1997). Zwar wurde durch eine Senkung der Kopienzahl in *E. coli* eine verbesserte Stabilität erreicht, jedoch findet sich danach in der Literatur keine weitere Erwähnung dieser Vektoren.

Der Vektor pEXSs wurde zwar innerhalb derselben Arbeitsgruppe in weiteren Studien verwendet, jedoch konnten andere Arbeitsgruppen diese Experimente nicht reproduzieren (K. Stedman, persönliche Mitteilung). pEXSs wurde auch im Rahmen dieser Arbeit getestet, jedoch ohne Erfolg. Unter den von Cannio *et al.* (1998) beschriebenen Bedingungen war keine Selektion möglich. Nakamura *et al.* (2005) zeigten außerdem, dass das von Cannio *et al.* (1998) verwendete resistenzvermittelnde Enzym Hygromycin Phosphotransferase (Cannio *et al.*, 2001) keine Thermostabilität bei 55 °C in *Thermus thermophilus* zeigte, was deutlich unter der

Wachstumstemperatur von 75-80 °C von *Sulfolobus* liegt. Der Vektor pEXSs konnte aufgrund der geschilderten Probleme nicht eingesetzt werden.

Dieselbe Arbeitsgruppe entwickelte weiterhin eine Reihe neuer Shuttle-Vektoren (pSSVrt und verwandte Konstrukte) (Aucelli, 2006). Da die Veröffentlichung erst kürzlich erfolgte, sind noch keine weiteren Studien zu erwarten. Der Vorteil des Shuttle-Vektors pSSVrt ist seine hohe Kopienzahl und die Selbstverbreitung in *Sulfolobus*, was eine niedrige Transformationseffizienz zu umgehen hilft. Probleme mit der Stabilität in *E. coli* konnten durch die Deletion nicht essentieller Regionen des pUC18 *E. coli*-Vektoranteils verbessert werden. Der Vektor ist stabil in *Sulfolobus* und rekombiniert nicht mit dem Wirtsgenom. Nachteile sind das Kontaminationsrisiko durch Aerosole bei Verwendung eines intakten Virus. Weiterhin beschreiben die Autoren eine Größenlimitierung aufgrund der Verpackung des Shuttle-Plasmides in einen Viruspartikel. Nur Fragmente bis zu einer maximalen Größe von ca. 1,3 kb (Aucelli *et al.*, 2006) können zusätzlich in den Vektor eingebracht werden. Diese Größenlimitierung verhindert die Klonierung größerer offener Leseraster oder die Untersuchung ganzer Operons. Weiterhin ist unklar, ob der Vektor aufgrund fehlender Selektion zur Expression von sich auf das Wachstumsverhalten nachteilig auswirkenden Proteinen geeignet ist. Hinzu kommt, dass nur Rezipienten in Frage kommen, die stabil mit dem Virus SSV2 infiziert werden können, was bisher nur für *S. solfataricus* Stämme möglich war (Aucelli *et al.*, 2006, Arnold *et al.*, 1999).

Der Vektor pMJ03 (und dessen Nachfolger pMJ05) war der erste *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektor, der nach seiner Veröffentlichung in anderen Laboren Anwendung fand (Albers *et al.*, 2006, Einzelarbeit A). Vorteile dieses Systems sind die Selbstverbreitung in der Kultur sowie die Integration in das Wirtschromosom, weshalb die Selektion für diesen Shuttle-Vektor nur bis zur Gewinnung integrierter Einzeltransformanten von Bedeutung ist. Bei der Anwendung des Systems traten aber auch Nachteile zu Tage. Durch die Größe von fast 22 kb war der Vektor schwer handhabbar. Es gab nicht genügend nur einmal vorkommende Restriktionsschnittstellen, um den Austausch von Promotor- und Gensequenzen direkt in einem Klonierungsschritt vornehmen zu können. Eine Zwischenklonierung über Vorassemblierungskonstrukte war zwingend notwendig. Weiterhin erwies sich der Vektor pMJ05 nur in einem speziellen *E. coli*-Stamm und auch nur unter besonderen Wachstumsbedingungen als stabil. Klonierungen in diesen Vektor waren nur unter speziellen Bedingungen erfolgreich und nur mit geringer Ausbeute. Weiterhin wirkte sich die Präsenz des virusbasierten Vektors negativ auf die Wirtszellen aus. In allen im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und getesteten Konstrukten wurde, im Vergleich zum untransformierten Wildtyp, eine verlängerte lag-Phase und ein früheres Eintreten in die stationäre Phase beobachtet. Hinzu kommt, dass in Verbindung mit dem Rezipientenstamm *S. solfataricus* PH1-16 der Selektionsdruck durch die Uracil-Selektion häufig nicht ausreichend war, um eine Integration ins Chromosom zu erzwingen. Von 11 getesteten Konstrukten konnten nur in 5 Fällen Einzeltransformanten mit chromosomal integriertem Vektor gewonnen werden. Einzeltransformanten ohne Integration erwiesen sich als instabil und verloren den Vektor innerhalb weniger Generationen. Ebenfalls abweichend von der Originalbeschreibung des Vektors pMJ03 wurden neben der ins Chromosom integrierten Kopie auch immer freie Kopien detektiert (Einzelarbeit A, Abbildung 9A).

Das pMJ-Shuttle-Vektorsystem war das einzige funktionsfähige System, das während der Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung stand, und wurde in Ermangelung einer Alternative trotz der geschilderten Probleme verwendet. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit zu Reporter-genuntersuchungen des Replikationsoperons des Plasmides pRN1 (Einzelarbeit A) sowie zum Testen zweier thermostabiler, resistenzvermittelnder Enzyme in *Sulfolobus* eingesetzt (Kapitel 2.4 Selektive Marker). Weitere Anwendungen, die ebenfalls geplant waren, konnten aufgrund der geschilderten Probleme mit diesem Vektor nicht umgesetzt werden. Dies unterstrich die Notwendigkeit der Entwicklung eines stabileren, einfach zu handhabenden, nicht-viralen Shuttle-Vektorsystems mit effizienter Selektion.

Alle publizierten, erfolgreichen Shuttle-Vektoren, die während der Entstehung dieser Arbeit beschrieben waren, sind virusbasiert. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass für *Sulfolobus*-Viren (insbesondere SSV1) bereits zu einem früheren Zeitpunkt molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Transkription, Ausbreitung, Wirtsspektrum, Stabilität und Transformierbarkeit durchgeführt wurden als für Plasmide (Yeats *et al.*, 1982, Reiter *et al.*, 1988, Grogan *et al.*, 1990, Schleper *et al.*, 1992, Muskhelishvili *et al.*, 1993, einen Überblick geben Prangishvili und Garrett, 2005). Zum anderen werden diese selbstverbreitenden Systeme eingesetzt, weil die Transformationseffizienz in *Sulfolobus* niedrig ist und keine hochstringente Selektionsmethode für *Sulfolobus* vorhanden war (siehe auch Kapitel 2.6, Diskussion).

2.3 Charakterisierung des Plasmides pRN1

Um das Verständnis der Stabilität, Replikation und Regulation des Plasmides pRN1 zu vertiefen wurden *in vivo*-Untersuchungen zur Stabilität, Retention, Kopienzahl, Transkription und Regulation im natürlichen Wirtstamm durchgeführt. Diese Experimente sollten zum einen der Untersuchung des Plasmides pRN1 an sich dienen. Zum anderen wurden diese Experimente aber auch durchgeführt, um Informationen für die Konstruktion von Shuttle-Vektoren basierend auf dem Plasmid pRN1 zu gewinnen.

Das Plasmid pRN1 kommt natürlicherweise zusammen mit dem Plasmid pRN2 in seinem Wirtstamm *S. islandicus* REN1H1 vor (REN1H1 pRN1/2, Zillig *et al.*, 1994). Purschke und Schäfer (2001) konnten zeigen, dass pRN1 und pRN2 jedoch auch alleine in der Lage sind sich zu replizieren. Im Zuge dieser Experimente wurden *S. islandicus* REN1H1 Stämme isoliert, die entweder beide Plasmide verloren hatten (REN1H1), nur pRN1 (REN1H1 pRN1) oder nur pRN2 (REN1H1 pRN2) enthielten. Für alle Experimente zur Charakterisierung des Plasmides pRN1 wurde der Originalstamm REN1H1 pRN1/2 verwendet.

2.3.1 Kopienzahl des Plasmides pRN1 im Originalstamm REN1H1 pRN1/2 in verschiedenen Wachstumsphasen

Die Plasmidkopienzahl wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt, um eine Basis für die Bewertung der Analyse der Transkription in verschiedenen Wachstumsphasen zu erhalten.

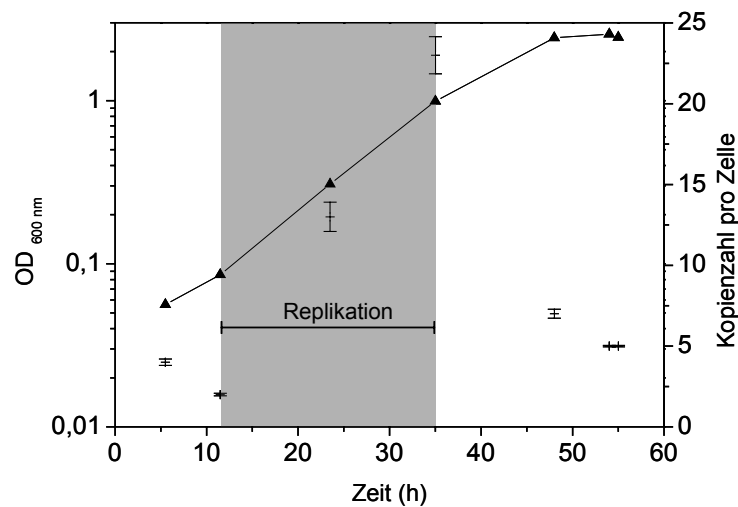


Abbildung 5: pRN1 Kopienzahl pro Zelle während einer Batch-Fermentation in einem 1,5 L-Fermenter in Vollmedium. Die Wachstumskurve (durch Linie verbundene Dreiecke) ist auf der linken Y-Achse dargestellt, die Plasmidkopienzahl (Kreuze mit Fehlerbalken) auf einer zweiten Y-Achse (rechts). Die Fehlerbalken der Kopienzahl entsprechen einer Standardabweichung ermittelt aus drei Parallelproben und -messungen.

Die Kopienzahl von pRN1 zeigte einen sehr dynamischen Verlauf während verschiedener Wachstumsphasen. In der lag-Phase war die Kopienanzahl mit 2-4 Plasmiden pro Zelle gering. Während der log-Phase der Kultur nahm die Kopienzahl stetig bis auf 23 zu, um in der stationären Phase und Absterbephase schnell auf das Ausgangsniveau abzusinken. Die Replikation des Plasmides beginnt also zu Anfang der log-Phase und stoppt mit deren Ende. Die Abnahme der Plasmidkopienzahl in der lag-Phase ist höchstwahrscheinlich auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen, da Zellteilung stattfindet, die Plasmidreplikation jedoch noch nicht oder nur in sehr eingeschränktem Maße begonnen hat. Zu Beginn der stationären Phase sinkt die Plasmidkopienzahl ebenfalls durch den Verdünnungseffekt ab.

Die in diesem Experiment bestimmte maximale Kopienzahl von 23 Plasmiden pro Zelle stimmt gut mit dem Wert von 20 Plasmiden pro Zelle überein, der in der Originalbeschreibung von pRN1 genannt wird (Zillig *et al.*, 1994).

2.3.2 Analyse der Transkription im Bereich offener Leseraster

Mit der Untersuchung der Transkription des Plasmides pRN1 sollten Informationen zu folgenden Fragestellungen gewonnen werden:

- welche der sechs offenen Leseraster werden transkribiert
- sind offene Leseraster in Operons organisiert
- genauere Charakterisierung der Transkripte hinsichtlich 5'- und 3'-Ende, Abundanz, zeitlichem Verlauf der Transkriptzahl pro Zelle und Stabilität
- gibt es Hinweise auf weitere Transkripte, eventuell regulatorischer Art
- welche Regionen des Plasmides können mit hoher Wahrscheinlichkeit als Unterbrechungsstellen für die Konstruktion eines *Sulfolobus-E. coli* Shuttle-Vektors

dienen bzw. welche sind mit hoher Wahrscheinlichkeit essentiell und sollten nicht unterbrochen werden.

Da es mittels Northern Blots, auch mit intern radioaktiv ^{32}P -markierten einzelsträngigen RNA-Sonden und intensiver Kontrolle und Optimierung jedes Einzelschritts aufgrund zu geringer Sensitivität nicht gelang, Transkripte des Plasmids pRN1 zu detektieren, wurde die sehr sensitive Technik der *quantitative real time reverse transcription PCR* (qRT-PCR) genutzt. Mit dieser Methode ist neben einer strangspezifischen Identifizierung von Transkripten auch deren exakte Quantifizierung möglich. Die qRT-PCR hat gegenüber Northern Blots jedoch den Nachteil, nur für den tatsächlich beprobten Bereich eine Aussage treffen zu können. Die tatsächliche Länge eines Transkripts, das mit dieser Methode detektiert wurde, musste daher durch die Kombination weiterer Verfahren genauer bestimmt werden. Zur Kartierung der Transkriptstartpunkte stand mit der Primer-Extension-Analyse eine ebenfalls sehr sensitive Methode zur Verfügung. Transkriptenden werden normalerweise mittels S1-Nukleaseverdau-Experimenten bestimmt. Diese Methode ist jedoch nicht für Transkripte mit geringen Kopienzahlen geeignet und erbrachte für die pRN1-Transkripte keine Ergebnisse (Strößenreuther, 2003). Daher wurde zur ungefähren Bestimmung der Transkriptenden eine abgewandelte Form der RT-PCR verwendet. Zum einen wurde aufgrund von Problemen mit residualen Plasmidrückständen in RNA Präparationen eine Adapter-RT-PCR-Methode etabliert. Zum anderen wurden zur Kartierung der ungefähren Endpunkte Primer mit gestaffelten Bindungsstellen im Bereich des erwarteten Transkriptendes eingesetzt. Um sicherzugehen, dass zwischen dem kartierten 5'- und 3'-Ende auch tatsächlich ein durchgehendes Transkript besteht, wurde ebenfalls die Adapter RT-PCR eingesetzt (Einzelarbeit A).

Es konnte gezeigt werden, dass die konservierten offenen Leseraster *orf56*, *orf904* und *orf80* transkribiert werden, während für die nicht konservierten offenen Leseraster *orf90a*, *orf72* und *orf90b* nur sehr schwache Transkription (2-3 Größenordnungen niedriger als für die konservierten Leseraster) detektiert werden konnte. *orf56* und *orf904* sind in einem Operon organisiert und werden von einem gemeinsamen Promotor aus kotranskribiert. Es konnten keine Hinweise für ein Transkript gefunden werden, das nur *orf904* umfasst. Die Transkripte *orf56/orf904* und *orf80* sind beide als *leaderless* einzustufen, da sie nur 9 bzw. 10 nt vor dem ATG-Startcodon beginnen, wobei für *orf80* ein späteres Startcodon ermittelt wurde, als bisher vermutet (Einzelarbeit A). Beide starten jeweils mit einem G-Nukleotid. Durch bioinformatische Analysen wurde für *Sulfolobus* eine hohe Zahl an *leaderless*-Transkripten vorhergesagt (Tolstrup *et al.*, 2000, Torarinsson, 2005). Die Ergebnisse stimmen ebenfalls mit der bisher einzigen Untersuchung der Transkripte eines *Sulfolobus*-Plasmids überein. Im Plasmid pIT3 (Prato *et al.*, 2006) ist das *orf57/orf80* Kotranskript ebenfalls *leaderless* und startet mit einem G-Nukleotid. Das Kotranskript weist keine 3'UTR (*3' untranslated region*) auf und endet innerhalb der nächsten 60 nt nach dem Stopcodon von *orf904*. Im Gegensatz dazu hat das Transkript *orf80* eine etwa 200 nt lange 3'UTR. Diese Region, sowie ein Teil von *orf80* werden von dem *antisense*-Transkript *ctorf90a* überlappt. Das *antisense*-Transkript *ctorf904* reicht bis in die Anfangsregion von *orf56* hinein, und endet im Bereich der ersten 60 bp von *orf56*. *ctorf904* überlappt also auch den Bereich, in dem sich die verschiedenen möglichen Startcodons und Shine-Dalgarno-Sequenzen von *orf904* befinden.

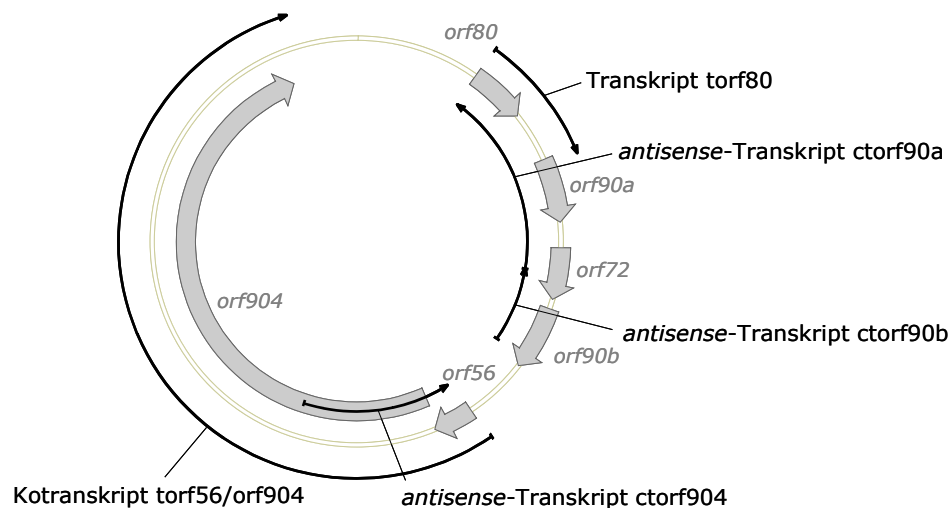


Abbildung 6: Transkriptkarte von pRN1 basierend auf den Informationen aus den Primer-Extension-Experimenten für die Startpunkte und aus den Adapter-RT-PCR-Experimenten für die Endpunkte. Es wurde jeweils der letztmögliche Endpunkt für jedes Transkript eingezeichnet.

2.3.3 Quantitative Untersuchung der Transkripte in verschiedenen Wachstumsphasen

Um eine eventuell stattfindende Regulation auf Transkriptionsebene im Verlauf der verschiedenen Wachstumsphasen zu untersuchen, wurden die Transkriptzahlen pro Zelle zu drei verschiedenen Zeitpunkten während einer Batch-Fermentation bestimmt. Aufgrund der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Plasmidkopienzahl während einer Fermentation wurden die Probenahmezeitpunkte zu Beginn der log-Phase (OD 0,3), gegen Ende der log-Phase (OD 1,2) und in der stationären Phase (OD 2,2) gewählt. Eine noch frühere Probenahme wäre wünschenswert gewesen, war jedoch aufgrund der sehr geringen Zelldichte nicht möglich.

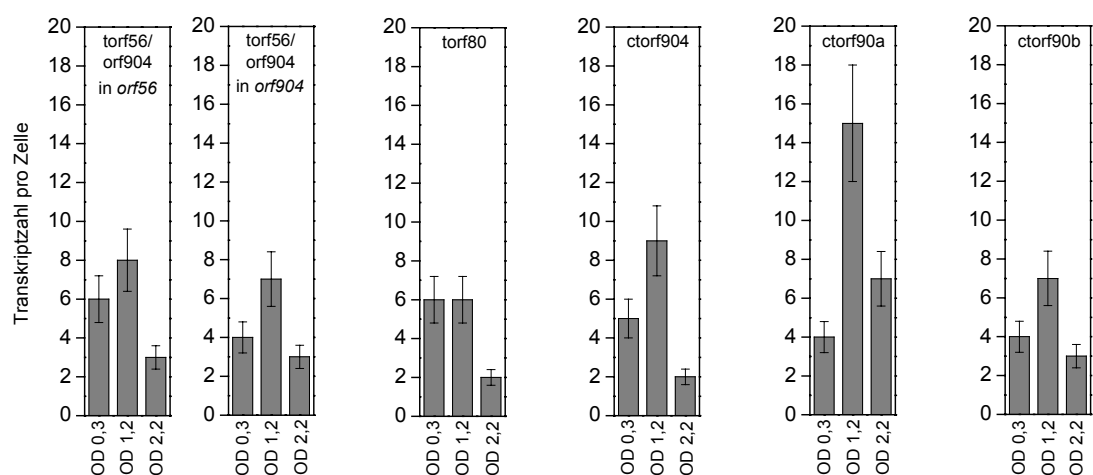


Abbildung 7: Transkriptzahlen pro Zelle in verschiedenen Wachstumsphasen. Die Fehlerbalken geben den kombinierten Fehler der qRT-PCR-Bestimmung und der Zellzahlbestimmung (20 %) an.

Das Kotranskript wurde an zwei Stellen beprobt, einmal innerhalb von *orf56* und einmal zu Beginn von *orf904*. Für beide beprobte Bereiche wurden sehr ähnliche Werte im Bereich von 3-8 Transkripten pro Zelle gemessen. Das Transkript *torf80* wies konstante Werte von

6 Transkripten pro Zelle während der frühen und späten log-Phase auf. Die *antisense*-Transkripte zeigen eine Zunahme der Transkriptzahl von der frühen zur späten log-Phase, im Falle von *ctorf90a* um etwa Faktor 4. Die Kopienzahl dieses Transkripts weist das dynamischste Verhalten auf und erreicht mit 15 Kopien pro Zelle in der späten log-Phase auch die höchste Transkriptzahl. Für alle Transkripte wurde eine Abnahme der Kopienzahl um mindestens 50 % von der log-Phase zur stationären Phase beobachtet.

Diskussion

Die gemessenen Transkriptzahlen waren mit wenigen Transkripten pro Zelle niedrig. Dieser Befund erklärte auch, warum die Transkripte nicht mittels Northern Blot detektiert werden konnten. Ebenfalls fiel auf, dass keine hohen Schwankungen in der Transkriptzahl zu beobachten waren. Alle gemessenen Werte bewegten sich innerhalb einer Größenordnung. Die auffälligste Änderung der Transkriptzahl, die für alle Transkripte beobachtet wurde, ist die Abnahme beim Übergang in die stationäre Phase. Diese Abnahme ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Einstellung der Transkription in den Zellen und den anschließenden Zerfall und eventuell auch Abbau der Transkripte zurückzuführen. Die Einstellung der Transkription fällt in den selben Zeitbereich, für den auch das Ende der Replikation für das Plasmid pRN1 ermittelt wurde (Abbildung 5).

Für alle Transkripte außer *torf80* wurde eine geringe Zunahme der Transkriptzahl vom Beginn zum Ende der log-Phase beobachtet. Der Unterschied überschreitet für *torf56/orf904*, gemessen innerhalb von *orf56*, jedoch nicht die Fehlergrenzen. Eine Zunahme der Transkriptanzahl pro Zelle von der frühen zur späten log-Phase ist aufgrund der Zunahme der Kopienzahl des Plasmides pRN1 zu erwarten, da eine höhere Zahl an Plasmiden, ohne Eingriff eines Regulationsmechanismus, auch mehr Transkripte produzieren sollte. Ein solcher Gendosierungseffekt wurde für den virusbasierten Shuttle-Vektor pMJ03 in *Sulfolobus* beobachtet (Jonuscheit *et al.*, 2003) und auch für einen pRN1 basierten Shuttle-Vektor nachgewiesen (Einzelarbeit D, Abbildung 5E). In dem Bereich von OD 0,3 bis OD 1,2 ist ungefähr von einer Verdoppelung der Plasmidkopienzahl auszugehen. Daher sollte man auch eine Verdoppelung der Transkriptanzahl erwarten, wenn nicht durch andere Prozesse eine Regulation der Transkriptanzahl erfolgen würde. Aufgrund dieser Überlegungen fielen besonders die Transkripte *torf80* und *ctorf90a* ins Auge. Ersteres, weil es eine vollkommen konstante Transkriptanzahl zeigte, und letzteres, weil es einen stärkeren Anstieg um etwa den Faktor 4 aufwies. Für das Transkript *torf80* wurde für insgesamt drei verschiedene Fermentationen und in zwei verschiedenen Regionen (innerhalb von *orf80* und in der 3'UTR) stets eine völlig konstante Transkriptanzahl vor Erreichen der stationären Phase gemessen. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Transkriptanzahl von *torf80* genau reguliert wird. In Gegenrichtung zu *torf80* wurde das *antisense*-Transkript *ctorf90a* nachgewiesen, das mit der 3'UTR des Transkriptes *torf80* überlappt. Da *orf80* der am besten konservierte offene Leseraster in Plasmiden aus *Sulfolobus* ist (Garrett *et al.*, 2004), wurde überprüft, ob *torf80* auch in einem anderen Vertreter der pRN-Plasmidfamilie eine 3'UTR aufweist und in Gegenrichtung dazu auch ein Transkript vorhanden ist. Zu diesem Zweck wurden qRT-PCR Experimente mit für pRN2 spezifischen Primern in der entsprechenden Region durchgeführt. Diese ergaben, dass auch in pRN2 ein Transkript im Bereich von *orf80* (= *orf81* in pRN2) und im Anschluss daran

vorhanden ist. In einer überlappenden Region in *antisense*-Richtung konnte ebenfalls ein Transkript analog zu *ctorf90a* detektiert werden. Es war jedoch nicht klar, welche Rolle Orf80 für die Replikation oder Stabilität von pRN1 spielt. Auch ist es fraglich, ob das detektierte *antisense* Transkript eine Funktion hat. Erste Hinweise auf die Funktion von Orf80 konnten erst in Versuchen erhalten werden, die mit den pRN1-basierten Shuttle-Vektoren durchgeführt wurden.

2.3.4 Stabilität der Transkripte

Um die Ergebnisse des wachstumsphasenabhängigen Verlaufs der Transkriptanzahlen besser interpretieren zu können, wurde zusätzlich die Stabilität der Transkripte untersucht. Dazu wurde eine Kultur geteilt und in einer der beiden Kulturen die Transkription mit Hilfe des Antibiotikums Actinomycin D unterbunden, wie von Bini *et al.* (2002) für *Sulfolobus* beschrieben. Dann wurden in regelmäßigen Abständen (0 min, 15 min, 30 min) Proben aus der behandelten und der unbehandelten Kontrollkultur entnommen. Transkriptmengen der behandelten Kultur wurden für jeden Probenahmezeitpunkt auf die Transkriptmengen der unbehandelten Kultur normiert und so die relative Transkriptanzahl erhalten. Aus diesen Daten wurde eine Abschätzung der Halbwertszeiten der Transkripte vorgenommen (Einzelarbeit A, Abbildung 8).

Die Halbwertszeit von *torf80* lag im Bereich von etwa 15 min. Die Anzahl der drei *antisense*-Transkripte nahm nur langsam ab. Ihre Halbwertszeit lag im Bereich um 1 h. Die höchste Stabilität zeigte das Kotranskript. Im betrachteten Zeitraum wurde eine Abnahme um 10% registriert. Bei Extrapolation der Abbaurate ergab sich eine sehr lange Halbwertszeit von über 2 h. Die Transkripte sind also bis auf *torf80* als sehr stabil einzustufen. Die ermittelten Halbwertszeiten liegen im Vergleich zu bereits bekannten Werten für *Sulfolobus* im oberen Bereich. Bini *et al.* (2002) fanden Halbwertszeiten von wenigen Minuten bis zu über 2 h. Eine genomweite Untersuchung der Transkriptstabilität in *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* (Andersson *et al.*, 2006) ergab als Median der Häufigkeitsverteilung der Transkripthalbwertszeiten einen Wert von 5 min. Transkripte mit einer Halbwertszeit von länger als 20 min wurden in dieser Untersuchung jedoch nicht berücksichtigt, und ihre Halbwertszeit gleich 20 min gesetzt. Andersson *et al.* (2006) konnten eine negative Korrelation zwischen Halbwertszeit und Transkriptanzahl feststellen. Für pRN1 wurden, in Übereinstimmung mit diesem Ergebnis, niedrige Transkriptanzahlen pro Zelle bei langen Halbwertszeiten ermittelt.

Die Halbwertszeiten sind nur als eine Abschätzung anzusehen, da insbesondere für die stabilen Transkripte eine Interpolation der gemessenen Abnahme über einen sehr weiten Zeitbereich erfolgen muss. Deutlich wurde jedoch, dass die pRN1 Transkripte überdurchschnittlich stabil sind, und nur für *torf80* eine schnellere Abnahme beobachtet wurde.

Diskussion

Die nur geringen Schwankungen in der Transkriptanzahl im Verlauf einer Fermentation zusammen mit der sehr hohen Stabilität der Transkripte lassen eine Regulation auf Transkriptionsebene für die vier langlebigen Transkripte als eher unwahrscheinlich erscheinen. Bini *et al.* (2002) schlussfolgerten aus den hohen Halbwertszeiten, die sie für einige *Sulfolobus*-Transkripte ermittelten, dass eine Regulation auf Translationsebene stattfinden könnte. Für eine

Reihe von gut untersuchten bakteriellen Plasmiden spielt eine Regulation auf Ebene der Translation durch *antisense* RNAs eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Plasmidkopienzahl. Im Fall des Plasmides pLS1 blockiert die 50 nt lange *antisense* RNA RNAII die Shine-Dalgarno-Sequenz von *repB*, das für das Plasmidreplikationsprotein codiert (del Solar *et al.*, 1995, del Solar *et al.*, 1997). Auch für pRN1 konnte ein *antisense*-Transkript im Bereich der Anfangsregion des für das Plasmidreplikationsprotein codierenden *orf904* identifiziert werden. Ctorf904 überlappt den gesamten Bereich, in dem die verschiedenen, potentiellen Shine-Dalgarno-Sequenzen vor den möglichen Startcodons von Orf904 liegen (Abbildung 8). Ctorf904 ist jedoch mit ca. 730 nt wesentlich länger als die in den genannten Beispielen der bakteriellen Plasmidkopienzahlregulation agierenden *antisense* RNAs (38 nt bis ca. 140 nt, Brantl, 2004). Aufgrund der Methodik der Ermittlung der Länge von ctorf904 kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass im selben Bereich auch kürzere RNAs vorhanden sind oder eventuell eine Prozessierung von Vorläufertranskripten stattfindet. Eine Regulation auf Transkriptionsebene durch ctorf904 durch Transkriptionsattenuation kann ebenfalls nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Aufbauend auf dem momentanen Kenntnisstand war es nicht möglich, definitive Aussagen zu Zweck oder Funktion von ctorf904 zu treffen. Prinzipiell ist neben einer Regulation auf Transkriptions- oder Translationsebene natürlich auch eine Regulation der Plasmidkopienzahl auf posttranslationaler Ebene, etwa durch Modifikation des Replikationsproteins, denkbar.

2.3.5 Regulation der Kopienzahl - Untersuchung der Repressorfunktion von Orf56 *in vivo*

Es konnte gezeigt werden, dass *orf56* und *orf904* in einem Operon organisiert sind, und von einem gemeinsamen Promotor aus kotranskribiert werden. Orf56 zeigt schwache Sequenzähnlichkeit zu CopG, einem Kopienzahlregulationsprotein des Plasmides pLS1 aus *Streptococcus agalactiae* (Keeling *et al.*, 1996). Die biochemische Charakterisierung von heterolog in *E. coli* überexprimiertem Orf56 ergab, dass Orf56 als Dimer vorliegt und zwei Dimere sequenzspezifisch an eine 25 bp lange palindromische Sequenz direkt vor dem ATG-Startcodon von *orf56* binden (Lipps *et al.*, 2001a). Die Situation in pRN1 ist vergleichbar mit dem Plasmid pLS1: *copG* und *repB* sind ebenfalls in einem kotranskribierten Operon organisiert und CopG bindet an ein Palindrom im Bereich der Promotorregion des Kotranskripts (-35 Box). Es wurde gezeigt, dass CopG, neben dem *antisense*-Transkript RNAII, eine Komponente des Kopienzahlregulationssystems von pLS1 darstellt. CopG verringert als Autorepressor die Transkription des *copG/repB*-Operons und damit die Menge des gebildeten Replikationsproteins RepB (del Solar und Espinosa, 1992).

Die Frage war daher, ob Orf56 analog zu CopG auch *in vivo* die Transkription des Kotranskripts reprimiert. Diese Frage wurde mit Hilfe des pMJ Shuttle-Vektorsystems (Jonuscheit 2003, Albers, 2006) untersucht. Es wurden zwei Reportergenkonstrukte hergestellt. Als Reportergen wurde das *lacS*-Gen codierend für eine β -Glykosidase verwendet. Zum einen wurde das *lacS*-Gen unter Kontrolle des Promotors des Kotranskripts kloniert (pProm, kein Orf56 vorhanden), zum anderen wurde dieselbe Promotorregion zusammen mit dem *orf56*-Gen mit dem *lacS*-Gen fusioniert (pPromOrf56, Orf56 wird exprimiert). Da das tatsächlich verwendete Startcodon von

orf904 nicht bekannt ist, wurde das *lacS*-Gen mit dem letzten der vier möglichen Startcodons fusioniert.

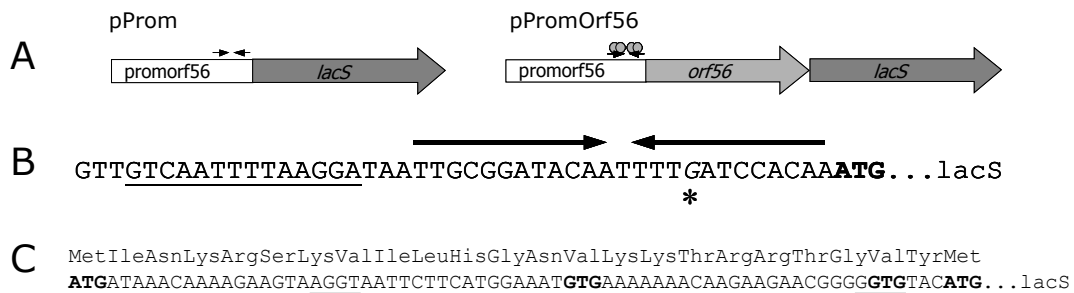


Abbildung 8: A: Schematische Darstellung der Reportergenkonstrukte pProm und pPromOrf56. Die Region promorf56 umfasst 270 bp, *orf56* 171 bp und das *lacS*-Gen 2657 bp. B: Detailansicht der *orf56/orf904*-Promotorregion. BRE und TATA-Box sind unterstrichen, die zwei Hälften der palindromischen Sequenz sind durch Pfeile markiert, der Transkriptstart des Kotranskripts ist durch einen Stern markiert und das Orf56 Startcodon ist fett gedruckt. C: Detailansicht des Beginns von Orf904. Mögliche Startcodons sind fett gedruckt, mögliche Shine-Dalgarno-Sequenzen sind unterstrichen.

Die Auswirkungen der Präsenz oder Absenz von Orf56 auf die Transkriptanzahl, die ausgehend vom *orf56/orf904*-Promotor gebildet wurde, wurde zum einen indirekt über die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Um einen Einfluss von Faktoren auf Translationsebene auf das Ergebnis ausschließen zu können, wurde jedoch auch direkt die Transkriptanzahl des Reporter gens *lacS* mittels qRT-PCR bestimmt. Es wurde eine Quantifizierung der Kopienzahl der Vektorkonstrukte in denselben Kulturen vorgenommen, aus denen auch die Transkriptzahlbestimmungen durchgeführt wurden um einem Gendosierungseffekt durch eventuell verschiedene Kopienzahlen der beiden Konstrukte Rechnung zu tragen (Einzelarbeit A, Abbildung 9). Die gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten und die Transkriptanzahlen wurden auf die jeweilige Kopienzahl des Konstruktes (integrierte + freie Kopien) normiert.

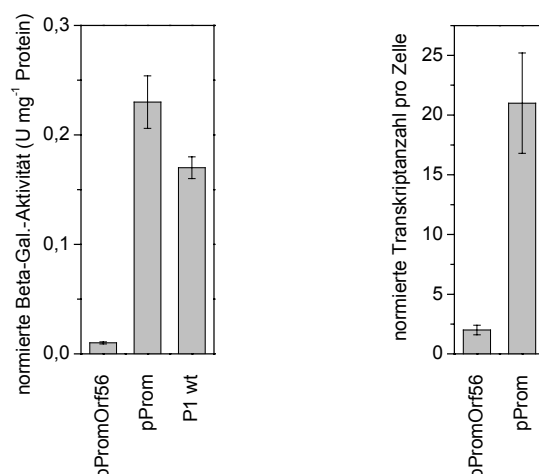


Abbildung 9: Auf die Vektorkopienzahl normierte β -Galaktosidaseaktivität und Transkriptanzahlen pro Zelle für die beiden Reporter genkonstrukte pProm und pPromOrf56. Zum Vergleich ist die β -Galaktosidaseaktivität des Wildtypstammes *S. solfataricus* P1 angegeben, von dem die als Rezipient für die Shuttle-Konstrukte genutzte Doppelmutante PH1-16 abstammt.

Auf Ebene der Transkription wurde eine Abnahme der Transkriptmenge für das Konstrukt pPromOrf56, das Orf56 exprimiert, im Vergleich zu dem Konstrukt pProm, das die Transkriptmenge repräsentiert, die ohne Präsenz eines Repressors synthetisiert wird, um den Faktor 11 gemessen. Im β -Galaktosidasetest wurde eine Abnahme um das 23-fache gemessen. Die Repression der Transkription durch die Präsenz von Orf56 zeigte, dass Orf56 analog zu CopG als Transkriptionsrepressor wirkt.

Diskussion

Die Unterschiede in der Höhe der Repression ermittelt durch die Reportergenaktivität im Vergleich zur direkten Transkriptzahlbestimmung lassen vermuten, dass auf Ebene der Translation weitere Faktoren eine Rolle spielen. Die apparent höhere Repression könnte zum einen auf einen Prozess zurückzuführen sein, der die Translationseffizienz des Reportergens in pPromOrf56 verringert oder sie in pProm erhöht. Ein Prozess der letzteres bewirkt, ist die Verbesserung der Translationseffizienz eines *leaderless*-Transkriptes (*lacS* in pProm) gegenüber der Effizienz der Translationsinitiation an einer Shine-Dalgarno-Sequenz (*lacS* in pPromOrf56). Unterschiede dieser Form wurden für *Halobacterium salinarum* in *in vivo*-Tests bestimmt (Sartorius-Neef und Pfeifer, 2004) und auch für ein *Sulfolobus in vitro*-Translationssystem gefunden (Condo *et al.*, 1999). Die indirekte Bestimmung der Repression über die β -Galaktosidaseaktivität ist aufgrund weiterer Einflussfaktoren nur als unterstützende Untersuchung anzusehen. Der Nachweis einer Repression auf Transkriptionsebene ist jedoch auch alleine durch Bestimmung der Transkriptzahlen möglich.

Die 11-fache Repression auf Transkriptionsebene liegt im Bereich der 10- bis 20-fachen Repression, die für den Transkriptionsrepressor CopR des Plasmides pIP501 bestimmt wurde (Brantl, 2004). Dessen Kopienzahl wird durch ein Repressorprotein und eine *antisense* RNA reguliert. Wie im Falle von CopR (pIP501) und CopG (pLS1) wird die Transkription des Kotranskriptes nicht vollständig blockiert.

Die Bindungsstelle von Orf56 (Position -1 bis -25 vor dem Startcodon von Orf56) überlappt nicht mit BRE oder TATA-Box (Position -29 bis -42) und kann daher nicht die Bindung von TFB oder TBP beeinflussen (Littlefield *et al.*, 1999). Die palindromische Sequenz, an die Orf56 bindet, liegt jedoch im Bereich des Transkriptstartpunkts (Position -9). Folglich könnte die Bindung der RNA-Polymerase in diesem Bereich verhindert werden. Dieser in Bakterien häufig vorkommende Mechanismus wurde bereits für die archaealen Organismen *Archaeoglobus* (MDR-Repressor) und *Pyrococcus* (LrpA, PhrA) beschrieben (Bell *et al.*, 1999b, Dahlke und Thomm, 2002, Vierke *et al.*, 2003). In *Sulfolobus* kann Repression der Transkription auch durch Blockierung der Bindungsstellen von TBP und TFB erfolgen (Bell und Jackson, 2000). Die Derepression kann im Falle einer Blockierung der Bindungsstelle der RNA-Polymerase schneller erfolgen, da TBP und TFB an der Promotorregion gebunden bleiben können. Um einen Verlust des Plasmides pRN1 im Falle des Absinkens der Kopienzahl zu verhindern, ist es wichtig, dass die Repression der Transkription des Replikationsoperons schnell aufgehoben werden kann.

2.3.6 Geeignete Unterbrechungsstellen in pRN1

Es konnte gezeigt werden, dass *orf904* und *orf56* in einem Operon organisiert sind. Aufgrund der Funktionen der beiden codierten Proteine konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um das Replikationsoperon des Plasmides pRN1 handelt und dass dieses Operon für die Replikation des Plasmides essentiell ist. Inwieweit andere Bereiche des Plasmides besonders zur Unterbrechung geeignet sind, konnte aufgrund der Dichte von konservierten Bereichen und Transkripten nicht abgeleitet werden (Einzelarbeit D, Abbildung 1).

Eine Methode, die eine Unterbrechung des Plasmides pRN1 an vielen verschiedenen, möglichst gleichmäßig über die gesamte Sequenz verteilten Stellen erlaubt, ist der Einsatz eines Transposons. Das Transposon sollte keine starke Sequenzspezifität bei der Wahl seiner Insertionsstellen besitzen, sondern sich möglichst gleichmäßig verteilt an verschiedenen Stellen in das Plasmid pRN1 integrieren. Ein sehr gut untersuchtes bakterielles Transposon ist Tn5 (Reznikoff, 2003). Für dieses Transposon wurden künstlich modifizierte Enderkennungssequenzen generiert (*mosaic ends*), die eine Erhöhung der Transpositionsfrequenz hervorrufen (Zhou *et al.*, 1998). Zusätzlich ist eine ebenfalls genetisch veränderte Transposase beschrieben, mit deren Hilfe die Transpositionsreaktion *in vitro* durchgeführt werden kann (Goryshin und Reznikoff, 1998, Agron *et al.*, 2002).

Aus einer optimierten Transpositionsreaktion eines Tn5-Derivats in pRN1 wurden 400 Klone erhalten. Aus allen Kolonien wurde Plasmid präpariert und mittels Restriktionsanalyse überprüft, ob die vollständige Transposon- und pRN1-Sequenz vorhanden war. In 20 % der untersuchten Kolonien wurde eine erfolgreiche Transposition beobachtet. Für 68 der Konstrukte, die sowohl die komplette pRN1- als auch die komplette Transposonsequenz enthielten, wurde eine detaillierte Restriktionskartierung durchgeführt. Aufgrund dieser Informationen war es möglich, gezielt 13 Konstrukte aus der Bibliothek auszuwählen, die in bestimmten Bereichen von pRN1 unterbrochen waren. Zu Kontrollzwecken wurde ein Konstrukt ausgewählt, das innerhalb des Replikationsoperons *orf56/orf904* unterbrochen war. Alle anderen Konstrukte wurden so gewählt, dass die Unterbrechungsstellen möglichst gleichmäßig über den übrigen Teil des Plasmides pRN1 verteilt waren (Einzelarbeit D).

Da zu Beginn der Arbeiten an der Transposonbibliothek noch nicht feststand, welcher selektive Marker am besten geeignet wäre, enthielten die Transposonkonstrukte noch keinen selektiven Marker für *Sulfolobus*. Die Versuche zu verschiedenen Selektionsmethoden (siehe folgendes Kapitel) ergaben, dass Uracil-Selektion und Laktose-Selektion die effizienteste Selektion erlauben. Daher wurden in die 13 Konstrukte die *pyrEF*-Gene aus *S. solfataricus* P2 unter Kontrolle ihres nativen Promotors und in ein Konstrukt auch zusätzlich das *lacS*-Gen aus *S. solfataricus* P2 unter Kontrolle des *tf55 α* - (*thermophilic factor α*) Promotors kloniert. Gleichzeitig wurde der *E. coli*-Replikationsursprung des verwendeten Transposons (R6K γ -Replikationsursprung) durch den bereits erfolgreich in Shuttle-Vektoren eingesetzten ColE1/pMB1-Replikationsursprung ersetzt. Damit waren 13 verschiedene potentielle Shuttle-Vektoren erstellt, die sich nur durch die Unterbrechungsstelle des Plasmides pRN1 unterscheiden (Einzelarbeit D, Abbildung 1 und Abbildung 15).

2.4 Selektive Marker

2.4.1 Selektion durch Antibiotika in Kombination mit resistenzvermittelnden Enzymen oder Mutationen

Zunächst wurde eine Literaturübersicht zu bereits in *Sulfolobus* getesteten Antibiotika erstellt. Ein Großteil der Daten stammte dabei aus Tests, in denen spezifische Inhibitoren der Translation (Cammarano *et al.*, 1985, Sanz *et al.*, 1994), Transkription (Bini *et al.*, 2002) und Replikation (Hjort und Bernander, 2001) identifiziert werden sollten. Studien, in denen Wachstumsinhibition untersucht wurde, wurden ebenfalls publiziert (Grogan, 1989, Cannio *et al.*, 1998, Aagaard *et al.*, 1996). In allen diesen Studien wurde entweder *S. acidocaldarius* oder *S. solfataricus* eingesetzt. Zur Antibiotikasensitivität von *S. islandicus* lagen keine Daten vor.

Tabelle 2: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Literaturrecherche zu Antibiotikasensitivität und Resistenzdeterminanten.

Antibiotikum	Ziel	Literaturquelle (Sensitivität <i>Sulfolobus</i>) ^{a)}	Resistenzdeterminante	Thermostabilität	Literaturquelle (Thermostabilität Resistenzdeterminante)
Chloramphenicol	Translation	Cannio <i>et al.</i> , 1998	Chloramphenicol Acetyltransferase (Cat Typ II, <i>E. coli</i> wt)	<i>in vitro</i> bis zu 1 h bei 70°C	Lewndon <i>et al.</i> , 1988
5'-Fluororotat	Pyrimidin-Biosynthese	Kondo <i>et al.</i> , 1991	<i>pyrEF</i> -Gene (<i>Sulfolobus</i> wt)	unbegrenzt, da wt	Grogan, 1991
Hygromycin B	Translation	Cannio <i>et al.</i> , 1998	Hygromycin Phosphotransferase (Hph, <i>E. coli</i> , mutiert)	<i>in vitro</i> 30 min 65°C, <i>in vivo</i> 82°C	Cannio <i>et al.</i> , 2001
Novobiocin	Topoisomerase ^{b)}	Grogan, 1989	unklar ^{b)}	-	-
Zeocin (Bleomycin)	DNA	c)	Bleomycin Resistenzprotein (Ble, <i>Streptoaliotheichus hindustanus</i> , mutiert)	<i>in vivo</i> 77°C	Brouns <i>et al.</i> , 2005
Simvastatin	Isoprenoid-Biosynthese	-	Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase (Hmg), promotorverstärkende Mutation	unbegrenzt, da wt	Wendoloski <i>et al.</i> , 2001 Matsumi <i>et al.</i> , 2007

a) alle Literaturangaben wurden in eigenen Tests überprüft und teilweise als nicht zutreffend gefunden, b) Mutanten waren instabil, Ort der Mutation konnte nicht bestimmt werden, (mündliche Mitteilung Christa Schleper, Universität Bergen, Norwegen), c) (mündliche Mitteilung John van der Oost, Universität Wageningen, Niederlande), wt = Wildtyp.

Daher wurden aus den bereits von anderen Gruppen getesteten Antibiotika vielversprechende Kandidaten ausgewählt und jeweils mit *S. solfataricus* P1 und *S. islandicus* REN1H1 getestet. Zusätzlich zu Antibiotika, die bereits in *Sulfolobus* getestet worden waren, wurde auch die Verwendung von Substanzen in Betracht gezogen, die sich in anderen Archaeen als effektiv erwiesen hatten (Allers und Mevarech, 2005). Diese Antibiotika wurden jedoch zunächst unter Vorbehalt betrachtet, da die speziellen Wachstumsbedingungen von *Sulfolobus* (pH 3-4, 75-80 °C, Kultivierungsdauer von einigen Tagen) hohe Anforderungen an die chemische Stabilität eines Antibiotikums stellen. Auch Antibiotika, die in *in vitro*-Tests als effektiv beschrieben wurden, fielen unter diesen Vorbehalt. Ein weiteres Kriterium zur Auswahl war das Vorhandensein eines möglichst thermostabilen oder -stabilisierten resistenzvermittelnden Enzyms oder einer resistenzvermittelnden Mutation. Das entsprechende Gen sollte dann als

selektiver Marker in den Shuttle-Vektor integriert werden. Antibiotika, die detailliert untersucht wurden, sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Zunächst wurde in 50 mL-Kulturen getestet, ob das entsprechende Antibiotikum einen Effekt auf das Wachstum einer behandelten im Vergleich zu einer unbehandelten Kultur zeigte. War dieser erste Test erfolgreich, wurde eine logarithmische Konzentrationsreihe des Antibiotikums getestet, um die MHK zu ermitteln. Die MHK für Flüssigmedium und für Platten wurde als die niedrigste Konzentration ermittelt, bei der kein Wachstum mehr zu beobachten war.

Die Bedingungen im Wachstumsmedium von *Sulfolobus* mit pH 3-4 und 75 °C führen zu einer starken Beschleunigung von Hydrolysevorgängen. Praktisch alle Antibiotika werden unter diesen Bedingungen verstärkt abgebaut. Daher wurde zusätzlich die Stabilität der Antibiotika in Vorinkubationsexperimenten bestimmt. Dazu wurden alle getesteten Antibiotika 36 h im mineralischen Basismedium bei 75°C vorinkubiert, mit derselben Methode ihre Wirksamkeit wie für nicht vorinkubierten Verbindungen bestimmt und die erhaltenen MHKs verglichen.

Tabelle 3: MHK-Werte für verschiedene Antibiotika sowie Ergebnisse der Vorinkubationstests.

Antibiotikum	MHK ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MHK _{vorinkubiert} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MHK Platten ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Chloramphenicol	960	960	500
5'-Fluororotat	0,5 ^{a)}	0,5 ^{a)}	100-200
Hygromycin B	800	> 800	> 500
Novobiocin	2-4	4	nb
Zeocin (Bleomycin)	>> 1600	>> 1600	nb
Simvastatin	10-16	10-16	10-20

a) 5'-Fluororotat ist aufgrund seiner mutagenen Wirkung nicht zur Selektion in Flüssigmedium geeignet. Zellen, die in 5'-Fluororotat-Flüssigmedium kultiviert wurden, zeigten Merkmale sogenannter „mutator mutants“, wie z. B. eine erhöhte Mutations- und Reversionsrate und verändertes Wachstumsverhalten (Bell und Grogan, 2002, eigene Beobachtungen). Dieser Effekt wurde nicht bei Verwendung hoher Konzentrationen von 5'-Fluororotat auf Platten beobachtet. nb: nicht bestimmt.

Zeocin (Bleomycin) erwies sich als ungeeignet zur Verwendung in *Sulfolobus*. Die Verbindung zeigte erst bei sehr hohen Konzentrationen einen inhibitorischen Effekt und erwies sich in Vorinkubationstests als instabil. Novobiocin zeigte sehr geringe MHKs. Leider war jedoch weder ein resistenzvermittelndes Enzym noch eine resistenzvermittelnde Mutation bekannt. Resistente Mutanten erwiesen sich als instabil, so dass es nicht möglich war die Resistenzdeterminante zu bestimmen. 5'-Fluororotat wurde in diese Testreihe mit aufgenommen, da es zur Isolierung uracilautotropher Mutanten eingesetzt werden sollte (folgendes Kapitel). Unter den Antibiotika, für die thermostabile Resistenzdeterminanten verfügbar waren, zeigte Chloramphenicol eine relativ hohe MHK, war jedoch sehr stabil. Hygromycin B erwies sich als relativ instabil und zeigte ebenfalls eine hohe MHK. Da dieses Antibiotikum jedoch zur Selektion eines bereits publizierten Shuttle-Vektors (Cannio *et al.*, 1998) eingesetzt worden war, wurde es in weitere Tests einbezogen, um Klarheit über die Anwendbarkeit dieses Systems zu erhalten. Simvastatin zeigte niedrige MHKs und hohe Stabilität und erschien daher als am besten geeigneter Kandidat unter den getesteten Antibiotika.

Für die drei Antibiotika Chloramphenicol, Hygromycin B und Simvastatin, wurden die entsprechenden resistenzvermittelnden Enzyme mittels Shuttle-Vektorkonstrukten in *Sulfolobus* exprimiert. Die Gene codierend für die Chloramphenicol Acetyltransferase (Cat, TypII, aus *E.*

coli) und die Hygromycin Phosphotransferase (Hph, aus *E. coli*, Cannio *et al.*, 2001) wurden unter Kontrolle des starken *tf55 α* -Promotors in den Virus-basierten Shuttle-Vektor pMJ05 kloniert, da zu diesem Zeitpunkt noch keine pRN1-basierten Vektoren entwickelt waren. Das Gen codierend für die Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase (aus *S. solfataricus* P2, Hmg) wurde unter Kontrolle des *tf55 α* -Promotors sowie des *dps*-(*DNA binding protein from starved cells*) Promotors (Kapitel 2.7) in die pRN1 basierten Shuttle-Vektorkonstrukte pG und pC (Kapitel 2.6) kloniert. Die Konstrukte wurden in die jeweiligen Rezipientenstämme *S. solfataricus* PH1-16 bzw. *S. acidocaldarius* MR31 transformiert und das Wachstum erfolgreich transformierter Kulturen im Vergleich zu untransformierten Kulturen bei verschiedenen Antibiotikakonzentrationen untersucht.

Für das Cat exprimierende Konstrukt konnte kein Selektionsvorteil gegenüber untransformierten oder mit Kontrollkonstrukten transformierten Zellen beobachtet werden. Es stand ein empfindlicher Test zur Detektion der Aktivität des Cat-Enzyms in *Sulfolobus*-Rohextrakten zur Verfügung (Acetylierung von Chloramphenicol mit ^{14}C -markiertem Acetyl-CoA, Cassinotti und Weitz, 1994). Diese Tests zeigten, dass kein funktionsfähiges Enzym in *Sulfolobus* exprimiert wurde. Auch mit Hilfe des Hph exprimierenden Konstrukts konnte kein Selektionsvorteil gegenüber untransformierten Zellen beobachtet werden. Das Hmg exprimierende Konstrukt bewirkte Wachstumsvorteile gegenüber untransformierten oder mit einem Kontrollkonstrukt transformierten Zellen. Durch dreimaliges Überimpfen in Medium mit jeweils höherer Simvastatinkonzentration gelang es einen Shuttle-Vektor in einer *S. acidocaldarius* Kultur anzureichern, der nur das *hmg*-Gen als selektiven Marker trug. Die beobachteten Wachstumsunterschiede waren jedoch klein, so dass eine Abtrennung untransformierter Zellen in einem Schritt nicht möglich erschien.

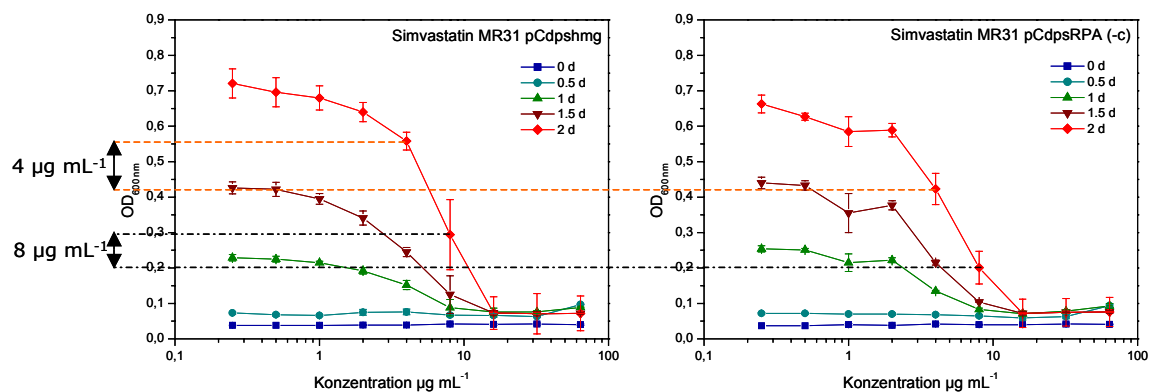


Abbildung 10: Selektion mit Simvastatin. Dosis-Wachstumshemmungskurven für *S. acidocaldarius* MR31 transformiert mit einem Hmg-exprimierenden Konstrukt (pCdpsHmg, linke Seite) und einem Kontrollkonstrukt, das ein Protein exprimiert, das keine Resistenz gegen Simvastatin verleiht (pCdpsRPA, rechte Seite). Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichten während zwei Tagen im 12 h - Abstand für verschiedene Simvastatin-Konzentrationen bestimmt. Die horizontalen Linien verbinden die Messpunkte für das Hmg-Konstrukt mit denen der Kontrolle für die zwei Konzentrationen mit den größten Wachstumsunterschieden ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Die Fehlerbalken repräsentieren eine Standardabweichung aus drei Parallelkulturen.

Diskussion

Die Selektion mittels Antibiotika in Kombination mit resistenzvermittelnden Enzymen ist als problematisch einzustufen. Zum einen wurden alle Antibiotika unter den Mediumsbedingungen verstärkt abgebaut. Es konnten Antibiotika identifiziert werden, die unter diesen Bedingungen in ausreichendem Maße stabil waren. Jedoch war nach etwa vier Tagen auch bei diesen Antibiotika ein verstärktes Wachstum der Kulturen zu beobachten, das auf den Abbau des Antibiotikums zurückging. Eine Stabilität über vier Tage ermöglicht, zumindest für den schneller wachsenden *S. acidocaldarius*, auch eine Selektion auf Platten. Bei Kultivierung in Flüssigmedium kann das Stabilitätsproblem durch Überimpfen der Kulturen in frisches antibiotikahaltiges Medium umgangen werden.

Ein weiteres Problem war die eingeschränkte Verfügbarkeit von thermostabilen resistenzvermittelnden Enzymen. Bei Verwendung von heterologen Enzymen bakteriellen Ursprungs (Cat, Hph) ist es möglich, dass Probleme aufgrund unterschiedlicher Codon-Häufigkeiten oder unerwünschter Signalsequenzen (z.B. Promotorsequenzen, Terminatorsequenzen, u.ä. innerhalb der Gensequenz) auftreten und eine Expression in *Sulfolobus* be- oder verhindern. Auch kann es sein, dass die exprimierten Proteine für die Zelle toxisch sind. Auch bei Verwendung homologer Enzyme (Hmg) kann die vermehrte Expression sich negativ auf die Zellen auswirken.

Eine hochstringente Selektion in möglichst einem Schritt mit der Möglichkeit der direkten Plattierung der Zellen nach der Transformation war mit keinem der Antibiotika möglich. Daher musste eine andere Selektionsmethode gefunden werden.

2.4.2 Selektion auf Basis auxotropher Mutanten – Uracil-Selektion

Das Prinzip dieser Selektion beruht auf der Verwendung auxotropher Mutanten, die durch die Inaktivierung eines oder mehrerer Gene nicht mehr zu einer bestimmten Stoffwechsellleistung in der Lage sind. Diese auxotrophen Stämme können nur wachsen, wenn das (End-)Produkt des unterbrochenen Stoffwechselweges durch Zugabe ins Medium zur Verfügung gestellt wird und von den Zellen aufgenommen werden kann. Als selektiver Marker werden die funktionsfähigen Wildtyp-Gene verwendet.

Vorteile dieser Selektion gegenüber der Antibiotika-Selektion liegen in der Verwendung von Wildtyp-Genen. Daher sind keine Probleme mit der Thermostabilität oder selten verwendeter Codons zu erwarten. Ein Nachteil ist jedoch die Gefahr unerwünschter homologer Rekombination der zusätzlich eingebrachten Wildtyp-Gene mit den inaktivierten Genen, wenn die Inaktivierung der Gene im Wirtschromosom nicht durch Deletion erfolgen oder ein Stamm mit nur geringer Sequenzhomologie eingesetzt werden kann. Hinzu kommt, dass für diese Selektionsmethode für alle zu testenden Rezipienten erst geeignete Mutanten isoliert werden müssen.

Für *Sulfolobus* wurde Uracil-Selektion erstmals von Grogan (1996) beschrieben. Voraussetzung für die Anwendung dieses Selektionssystems war die Charakterisierung des *de novo* Stoffwechselweges zur Herstellung von 5'-Uridinmonophosphat (UMP) in *Sulfolobus*. Grogan und Gunsalus (1993) ermittelten, dass *Sulfolobus* den Standard-Syntheseweg zur Herstellung von UMP verwendet.

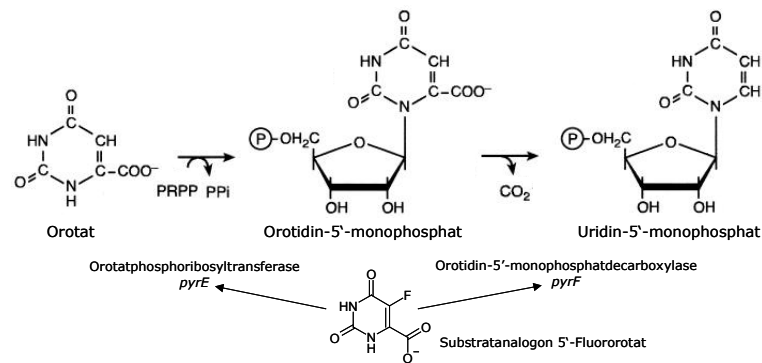


Abbildung 11: Syntheseweg von UMP in *S. acidocaldarius* (aus Thia-Toong *et al.*, 2002). Das Substratanalogon 5'-Fluororotat ist ebenfalls dargestellt.

Mit Hilfe des fluorierten Substratanalogons 5'-Fluororotat ist es möglich Mutanten zu isolieren, deren *pyrE* oder *pyrF* Gene inaktiviert sind (Kondo *et al.*, 1991, Grogan 1991a). In seltenen Fällen wurden auch Mutationen an anderen Orten im Genom beschrieben, jedoch ist der Ort dieser Mutationen unklar (Redder und Garrett, 2006). *pyrE* codiert für die Orotatphosphoribosyltransferase. Dieses Enzym katalysiert die Addition von Phosphoribosylpyrophosphat an Orotat, wobei Orotidin-5'-monophosphat entsteht. *pyrF* codiert für die Orotidin-5'-monophosphatdecarboxylase, welche den letzten Schritt in der UMP-Synthese katalysiert, eine Decarboxylierung des Orotidin 5'-phosphats zum 5'-Uridinmonophosphat. Wird eines dieser Enzyme nicht mehr gebildet, so zeigen die Zellen einen uraciluxotrophen Phänotyp und benötigen die Gabe von Uracil zum Wachstum. Das *pyrE*- und *pyrF*-Gen sind in einem Operon organisiert. Daher werden sie als *pyrEF*-Gene bezeichnet, da sie, wie für *S. acidocaldarius* gezeigt, von einem gemeinsamen Promotor aus kotranskribiert werden (Thia-Thoong *et al.*, 2002).

Um die Uracil-Selektion in *Sulfolobus* anwenden zu können, wurden also *pyrE*- oder *pyrF*-Mutanten geeigneter Rezipientenstämmen benötigt. Für *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* waren bereits die *pyrEF*-Mutanten PH1-16 (Martusewitsch *et al.*, 2000) und MR31 (Reilly und Grogan, 2001) isoliert und charakterisiert, für *S. islandicus* waren jedoch noch keine Mutanten beschrieben. Daher wurden für die drei *S. islandicus* Stämme REN1H1, REN2H1 und HVE10/4 *pyrEF*-Mutanten durch Selektion mit 5'-Fluororotat isoliert (Einzelarbeit E). Es sollte möglichst eine Deletionsmutante isoliert werden. Deshalb wurde zunächst ein PCR-Screening der Mutanten vorgenommen. Ausgewählte Mutanten wurden phänotypisch hinsichtlich ihres Wachstumsverhalten auf selektivem und nicht selektivem Medium und in Kompetitions-experimenten mit Wildtypzellen getestet. Ihr Genotyp wurde bestimmt, indem die *pyrEF*-Gene PCR-amplifiziert, kloniert und sequenziert wurden, um die inaktivierende(n) Mutation(en) zu bestimmen. Da die Genomsequenz von *S. islandicus* bis zum Ende dieser Arbeit nicht verfügbar war, wurden auch die Wildtyp *pyrEF* Sequenzen der drei untersuchten *S. islandicus* Stämme bestimmt. Letztendlich wurden die Mutanten, die in Experimenten zum Testen von Shuttle-Vektoren eingesetzt werden sollten, auf ihre Reversionsfrequenz mit Hilfe von Fluktuationstests (Luria und Delbrück, 1943, Lea und Coulson, 1949) untersucht.

2.4.3 Laktose-Selektion

Eine weitere Selektionstechnik, die auch als Anreicherungstechnik („enrichment“) bezeichnet wird, und für *Sulfolobus* vielversprechend erschien, ist die Laktose-Selektion. Zellen, deren *lacS*-Gen, codierend für eine β -Glykosidase (Cubellis *et al.*, 1990, Grogan, 1991b), inaktiviert ist, können nicht auf Medium wachsen, das nur Laktose als Kohlenstoff- und Energiequelle enthält. Diese Form der Selektion wurde erfolgreich in *S. solfataricus* eingesetzt (Worthington *et al.* 2003, Schelert *et al.*, 2004, Bartolucci *et al.*, 2003, Albers und Driessen, 2007). Neben der Nutzung zur Selektion bieten *lacS*-Mutanten auch den Vorteil eines einfach zu detektierenden Phänotyps, wenn das intakte *lacS*-Gen z.B. durch einen Vektor zusätzlich eingebracht wird. Transformierte Zellen können dann durch einen einfachen Farbttest mit dem Substrat Xgal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid) durch Blaufärbung von den farblosen, nicht transformierten Zellen unterschieden werden. Dieser phänotypische Marker wurde ebenfalls schon in *S. solfataricus* eingesetzt (Elferink *et al.*, 1996, Jonuscheit *et al.*, 2003). Auch zur Verwendung als Reportergen eignet sich das *lacS*-Gen hervorragend (Jonuscheit *et al.*, 2003, Lubelska *et al.*, 2006). In diesem Falle werden Doppelmutanten benötigt, deren *pyrEF*-Gene zur Nutzung der Uracil-Selektion, und deren *lacS*-Gen zur Nutzung als phänotypischer Marker oder Reportergen inaktiviert sind. Für *S. solfataricus* war bereits die *lacS/pyrEF*-Doppelmutante PH1-16 vorhanden (Martusewitsch *et al.*, 2000), sowie die *lacS*-Deletionsmutante PBL2025 (Schelert *et al.*, 2004). *S. acidocaldarius* hat eine sehr niedrige intrinsische β -Galactosidaseaktivität (Grogan, 1991b) und es war zu erwarten, dass das *lacS*-Gen hier ohnehin als phänotypischer Marker eingesetzt werden kann. Für *S. islandicus* existierten noch keine *lacS*-Mutanten. Daher wurde für *S. islandicus* REN1H1 eine *lacS*-Mutante isoliert, von der ausgehend auch *lacS/pyrEF*-Doppelmutanten isoliert wurden (Einzelarbeit E). Die Laktose-Selektion erfordert jedoch eine Kultivierung der Zellen in einem Medium, das nur Laktose als einzige Energiequelle enthält. Die Zellen müssen sich daher umstellen, da sie normalerweise in Trypton-Medium kultiviert wurden. In Laktose-Medium wurden auch nur geringere Wachstumsraten als in Tryptonmedium erzielt (Einzelarbeit D, Abbildung 6B und Einzelarbeit E, Abbildung 3B). *S. islandicus* und *S. solfataricus* konnten in diesem Minimalmedium wachsen, *S. acidocaldarius* jedoch nicht. Der genetische Hintergrund für diese Unterschiede ist nicht genau geklärt, jedoch könnten sie durch in *S. acidocaldarius* fehlende Laktose-Transportproteine bedingt sein.

2.4.4 Isolation von *S. islandicus pyrEF*- und *lacS*-Mutanten

Für *S. islandicus* REN1H1 wurden 230 Mutanten mittels PCR hinsichtlich ihrer *pyrEF*-Gene untersucht, für HVE10/4 24 Mutanten. Die durch Christa Schleper (Universität Bergen, Norwegen) zur Verfügung gestellte REN2H1 Mutante DM wurde nur kurz charakterisiert, da sich herausstellte, dass der Stamm *S. islandicus* REN2H1 ein Restriktions-/Modifikationssystem aufweist (Einzelarbeit B), das nicht überwunden werden konnte. Trotz der hohen Zahl an untersuchten Mutanten konnte keine einzige Deletionsmutante erhalten werden. Die meisten Mutanten zeigten dieselbe Länge des PCR-Produkts wie der Wildtyp. Es wurde daher angenommen, dass es sich um Punktmutanten handelt. Vereinzelt wurden auch längere PCR-

Produkte beobachtet. Eine Überprüfung durch Sequenzierung ergab in allen Fällen ein aktives Insertionselement als Ursache (Einzelarbeit C).

Eine *lacS*-Mutante des Stammes *S. islandicus* REN1H1 wurde nach UV-Mutagenese und phänotypischem Screening auf weiße Kolonien nach Besprühen der Platten mit Xgal isoliert. Nach Durchsicht von $1,2 \cdot 10^6$ Kolonien konnte nur eine weiße Kolonie erhalten werden (Einzelarbeit E).

2.4.5 Phäno- und genotypische Charakterisierung der Mutanten

Für die Mutanten, die in phänotypischen Tests die besten Wachstumseigenschaften zeigten (gleiches Wachstum wie der Wildtyp in nicht selektivem Medium und möglichst geringes Wachstum in selektivem Medium), wurden die zur Inaktivierung der *pyrE*-, *pyrF*- oder *lacS*-Gene führenden Mutationen bestimmt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht über die Mutationen der selbst isolierten *S. islandicus pyrEF*- und *lacS*-Mutanten. Auch stille Mutationen, die keinen Aminosäureaustausch bewirken, wurden mit aufgenommen.

<i>S. islandicus</i> Stamm	Name der Mutante	Gen	Typ der Mutation	Mutation auf Nucleotidebene ^{a)}	Mutation auf Aminosäureebene	Grund für Inaktivierung
REN1H1	R1	<i>pyrE</i>	Punktmutation	223 G→A	A75→T	A75 ist konserviert
			stille Mutation	336 T→C		
REN1H1	R20	Promotor				negative Beeinflussung der Transkription
	R21	<i>pyrEF</i>	Insertionselement	SMN1 in TATA-Box		
	R22					
REN1H1	S1	<i>lacS</i>	Frameshift-Mutation	648 T fehlt	ab V216 10 <i>nonsense</i> -AS, dann Stopcodon	C-terminalen 274 AS fehlen
REN1H1	S1R1	<i>lacS</i>	siehe Mutante S1			
		<i>pyrE</i>	Punktmutation	350 G→A	G117→E	G117 liegt in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums
		<i>pyrF</i>	Punktmutation	245 T→C	F82→S	
REN2H1	DM	<i>lacS</i>	Punktmutation	1280 T→A	L427→Stop	C-terminalen 63 AS fehlen
		<i>pyrF</i>	Frameshift-mutation	nach Pos. 346 A eingefügt	nach 1 AS Stopcodon	C-terminalen 109 AS fehlen
HVE10/4	H1	<i>pyrE</i>	Punktmutation	223 G→T	A75→S	A75 ist konserviert
			Punktmutation	586 C→T	Q196→Stop	C-terminalen 7 AS fehlen
		<i>pyrF</i>	stille Mutation	12 C→T		
			Punktmutation	26 C→T	A9→V	
			stille Mutation	339 G→A		
			Punktmutation	430 A→G	T144→A	
			Punktmutation	549 T→A	Y183→Stop	C-terminalen 40 AS fehlen

a) die Nucleotidpositionen beziehen sich bei *pyrE*, *pyrF* und *lacS* auf das A des ATG-Startcodons des jeweiligen Gens als Position 1, AS = Aminosäure.

Da für *S. islandicus* während der Durchführung dieser Arbeit keine Genomsequenz zur Verfügung stand, wurde zunächst die Sequenz der *pyrEF*-Gene und des *lacS*-Gens der Stämme REN1H1, REN2H1 und HVE10/4 bestimmt. Darauf aufbauend wurden dann die inaktivierenden Mutationen der Mutanten R1, R20, R21, R22, DM, H1, S1 und S1R1 bestimmt (Einzelarbeit C und E).

Bei den *S. islandicus* Mutanten wurden Insertionselement-, Punkt- und Frameshift-Mutationen festgestellt. Trotz der sehr hohen Zahl untersuchter Mutanten konnte keine Deletionsmutante von mehr als 1 bp Länge erhalten werden. In manchen Fällen reichte eine einzige Punktmutation zur Inaktivierung (z.B. REN1H1 R1) aus, während in anderen Mutanten eine ganze Reihe von Mutationen auftrat (z.B. HVE10/4 H1). Häufig war auch eine Inaktivierung aufgrund der Einführung eines Stop-Codons und des damit verbundenen Verlusts C-terminaler Aminosäuren zu beobachten.

2.4.6 Selektive Medien

Ein Problem, das die effiziente Nutzung der Uracil-Selektion in einigen Stämmen erschwerte, war die Kontamination von Mediumbestandteilen (Gelrite, Trypton) mit Spuren von Uracil. Insbesondere *S. solfataricus* und *S. islandicus* zeigten auch auf selektiven Trypton-Platten, die nur Spuren von Uracilverunreinigungen aus Trypton und Gelrite enthielten, residuales Wachstum, das eine Selektion auf Platten erschwerte bis unmöglich machte. Zur effizienten Selektion wurden daher wirklich uracilfreie Medien benötigt. Als Stickstoffquelle wurden neben Trypton weitere Substanzen getestet. NZAmine zeigte dabei eine geringere Kontamination mit Uracil. Außerdem wurde ein völlig uracilfreies, rein Aminosäure-basiertes Medium getestet. *S. acidocaldarius* zeigte auf NZAmine-Medium dasselbe Wachstumsverhalten wie auf Trypton-Medium, während *S. islandicus* und *S. solfataricus* in Medien ohne Trypton ein langsames Wachstum zeigten (Einzelarbeit E, Abbildung 1). Das erhöhte residuale Wachstum der *S. solfataricus* und *S. islandicus*-Mutanten im Vergleich zu der *S. acidocaldarius*-Mutante könnte auf die Präsenz eines speziellen Uracil-Transporters in den erstgenannten Organismen zurückzuführen sein, der nicht in *S. acidocaldarius* vorkommt (Einzelarbeit D, Diskussion).

Für die problematischen *S. solfataricus* und *S. islandicus* Stämme wurde in Konkurrenzexperimenten überprüft, ob eine effiziente Selektion mit dem Aminosäure-basierten Medium möglich ist (Einzelarbeit E, Abbildung 2). Dazu wurden wenige uracilprototrophe Zellen des Wildtypstamms zusammen mit einer um etwa 6 Größenordnungen höheren Zahl an uracilautotrophen Zellen auf verschiedenen selektiven Medien plattiert (Abbildung 12).

Auf den Trypton-Platten waren praktisch keine einzelnen Kolonien, sondern nur Hintergrundwachstum zu beobachten, während auf den 20AS-Platten >90% der ausplattierten prototrophen Zellen wiedergefunden wurden. Die Platten mussten wegen des langsameren Wachstums der Zellen jedoch 11 Tage inkubiert werden.

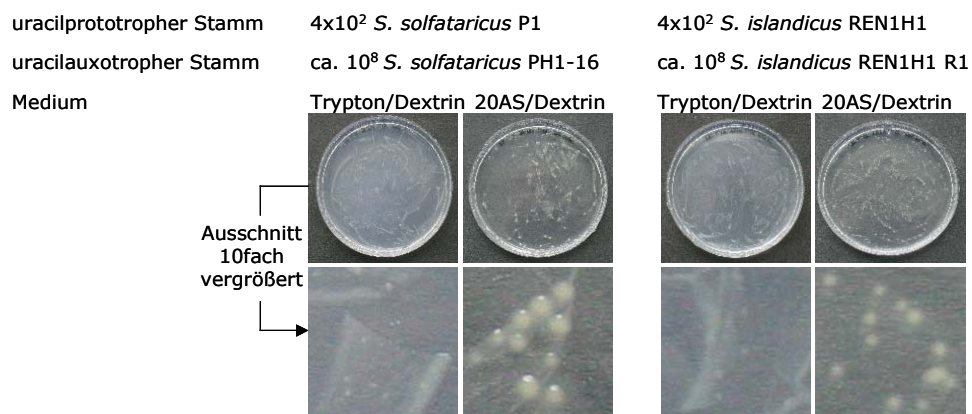


Abbildung 12: Konkurrenzexperimente zur Bestimmung der Effizienz der Uracil-Selektion auf verschiedenen Medien. Die jeweils über den Bildern genannten proto- und auxotrophen Sulfobolus Stämme wurden gemischt und ausplattiert. Für *S. islandicus* wurde zusätzlich eine Vitaminlösung verwendet (Wolin *et al.*, 1963).

2.4.7 Reversionsfrequenzen

Um die verfügbaren Mutanten sinnvoll zur Selektion einsetzen zu können, musste sichergestellt werden, dass die Häufigkeiten von Reversionsereignissen, die zur Wiederherstellung der Wildtypsequenz führen, tolerierbar niedrig sind. Da trotz Untersuchung einer Vielzahl von Mutanten keine Deletionsmutanten isoliert werden konnten, sollte überprüft werden, ob auch Punkt- oder Transposonmutanten eine ausreichend niedrige Reversionsfrequenz aufwiesen, um sie als Rezipienten einsetzen zu können. Von einer prinzipiellen Eignung von Transposonmutanten wurde zunächst ausgegangen, da der Stamm *S. solfataricus* PH1-16, dessen *pyrEF*- und *lacS*-Gene durch Insertionselemente inaktiviert sind (Tabelle 6), erfolgreich als Rezipient für das pMJ Virus-Shuttle-Vektorsystem genutzt worden war (Jonuscheit *et al.*, 2003).

Um eine genaue Aussage über die Reversionsfrequenzen machen zu können, wurden Fluktuationstests nach Luria und Delbrück (1943) durchgeführt (Einzelarbeit E) und nach der Methode von Lea und Coulson (1949) unter Zuhilfenahme der in Koch (1982) enthaltenen Graphen und Näherungsformeln ausgewertet. Dieses Verfahren ermöglicht eine Korrektur der Anzahl der apparenten Mutanten um die Beobachtungen, die nicht auf ein Reversionsereignis, sondern nur auf die Teilung von bereits mutierten Zellen zurückzuführen sind. Dazu wurden aus zehn Parallelansätzen die verschiedenen Quartile der Häufigkeitsverteilung der apparenten Reversionsereignisse nach Koch (1982) ermittelt. Aus diesen statistischen Parametern kann dann bei Kenntnis der Anzahl der Generationen und unter der begründeten Annahme, dass sich Wildtyp und Mutanten in ihrer Wachstumsrate in uracilhaltigem Medium nicht unterscheiden, die tatsächliche Anzahl der Reversionsereignisse pro Generation bestimmt werden. Wurden in allen Fällen keine Revertanden beobachtet, so wurde mit der sogenannten p0-Methode (Lea und Coulson, 1949, Koch, 1982) eine Abschätzung der oberen Grenze der Reversionsfrequenz vorgenommen werden.

Die ermittelten Reversionsfrequenzen waren sehr niedrig ($< 0,6$ Rückmutationen pro Generation pro 10^8 Zellen für alle *S. islandicus* REN1H1 Mutanten, Einzelarbeit E, Tabelle 4). So wurden mit Ausnahme der *S. islandicus* HVE10/4 Mutante H1 überhaupt keine Revertanden erhalten.

Die Reversionsfrequenzen lagen etwa im selben Bereich wie die von Blount und Grogan (2005) für *S. islandicus* Insertionselement-Mutanten veröffentlichten Werte (0,19- < 0,02 Rückmutationen pro Generation und 10^8 Zellen). Auffällig ist die relativ hohe Reversionsfrequenz für HVE10/4 H1 (1,0-1,5 Rückmutationen pro Generation pro 10^8 Zellen). *S. islandicus* HVE10/4, von dem die Mutante H1 abgeleitet ist, zeigte neben dieser hohen Reversionsrate auch die niedrigste spontane Mutationsrate (Kapitel 2.5.1).

Aufgrund der niedrigen Reversionsfrequenzen erschienen alle hier beschriebenen Mutanten des Stammes *S. islandicus* REN1H1 geeignet, um als Rezipientenstämme in Transformationen potentieller Shuttle-Vektorkonstrukte verwendet zu werden. Weitere Mutanten, die nicht selbst isoliert und charakterisiert wurden, sondern bereits veröffentlicht waren und ebenfalls im Rahmen der Tests potentieller Shuttle-Vektorkonstrukte eingesetzt wurden, wurden nicht detailliert untersucht. Zusammen mit den Ergebnissen zur Charakterisierung möglicher Rezipientenstämme sind sämtliche im Rahmen dieser Arbeit als Rezipienten verwendete Mutanten am Ende des folgenden Kapitels zusammengefasst (Tabelle 5).

2.5 Rezipienten

2.5.1 Genetische Stabilität

Die bisher weitgehend verwendeten Stämme *S. solfataricus* P1 und P2 sind genetisch wenig stabil. Für genetische Experimente stellt die Instabilität ein Problem dar, da schon innerhalb weniger Generationen ganze Bereiche des Genoms deletiert oder invertiert werden können (Redder und Garrett, 2006). Mobile genetische Elemente, die in sehr hoher Zahl in *S. solfataricus* P1 und P2 vorkommen und aktiv sind, können Ergebnisse genetischer Experimente beeinflussen, wenn sie während der Durchführung dieser Experimente mobilisiert werden (She *et al.*, 2001, Schleper *et al.*, 1994, Martusewitsch *et al.*, 2000) und sich an anderer Stelle in das Genom integrieren.

Um verschiedene potentielle Rezipientenstämme hinsichtlich ihrer genetischen Stabilität vergleichen zu können, wurde die spontane Mutationsfrequenz am Beispiel der *pyrEF*-Gene untersucht (Einzelarbeit E). Die Experimente konzentrierten sich auf die *S. islandicus* Stämme REN1H1, REN2H1 und HVE10/4, zu denen bisher keine Daten vorlagen. Aus Vergleichbarkeitsgründen wurden auch *S. solfataricus* P2, P1 und PBL2025 und *S. acidocaldarius* miteinbezogen. Zum einen wurden apparente Mutationshäufigkeiten bestimmt. Dabei werden alle Mutanten gezählt und ihre Zahl auf die Gesamtzellzahl bezogen. Zum anderen wurden mittels Fluktuationstests (siehe Kapitel 2.4.7) die tatsächliche Mutationshäufigkeit bestimmt. Diese beiden experimentellen Ansätze wurden gewählt, um einen direkten Vergleich mit veröffentlichten Werten zu ermöglichen.

Für die getesteten Stämme wurden apparente Mutationshäufigkeiten von $1,3 \cdot 10^{-4}$ bis $5 \cdot 10^{-8}$ erhalten (Einzelarbeit E, Tabelle 1). Die ermittelten Werte zeigten dabei relativ gute Übereinstimmung mit bereits publizierten Vergleichswerten, so dass ein Vergleich aller ermittelten Werte mit Literaturwerten gerechtfertigt erschien. Die höchsten Werte wurden für *S. solfataricus* P2 bestimmt, gefolgt von *S. solfataricus* P1 und PBL2025, den *S. islandicus* Stämmen und *S. acidocaldarius*. Der niedrigste Wert wurde für *S. islandicus* HVE10/4

gefunden. Für die tatsächlichen Mutationshäufigkeiten wurde dieselbe Reihenfolge wie für die apparenten Mutationshäufigkeiten erhalten (Einzelarbeit E, Tabelle 2). Die Anzahl an Mutanten, die durch Insertionselemente hervorgerufen wurden, machen für die Stämme *S. solfataricus* P1 100% und für *S. solfataricus* P2 ca. 67% aller Mutanten aus (Martusewitsch *et al.* 2000, Redder und Garrett *et al.*, 2006). Für *S. acidocaldarius* wurden bisher keine aktiven Insertionselemente detektiert (Jacobs und Grogan, 1997, Grogan *et al.*, 2001). Für die *S. islandicus* Stämme REN1H1 und HVE10/4 wurden nur 4% oder weniger der Mutationen durch Insertionselemente bedingt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Stämme *S. acidocaldarius*, alle *S. islandicus* Stämme und *S. solfataricus* PBL2025 teilweise deutlich niedrigere spontane Mutationshäufigkeiten aufweisen, als die bisher häufig eingesetzten *S. solfataricus* P1 und P2. Auch der niedrigere Anteil an Insertionselementmutanten lässt diese Stämme als genetisch stabilere, geeignete Rezipienten für Shuttle-Vektoren erscheinen. Auffällig ist der Unterschied im Mutationsspektrum in den verschiedenen Isolaten. Auf der einen Seite finden sich Stämme, die einen sehr hohen Anteil an Insertionselement-Mutanten aufweisen (*S. solfataricus* P1 und P2, Martusewitsch, 2000, Redder und Garrett, 2006). Weiterhin gibt es Stämme, bei denen Punktmutationen dominieren (*S. islandicus* Stämme) und nur wenige Insertionselement-Mutanten auftreten. *S. acidocaldarius* schließlich zeigt signifikant weniger Punktmutationen, keine Insertionselement-Mutationen jedoch einen höheren Anteil an Insertionen (Duplikation) und Deletionen (Grogan, 2001). Unter diesem Gesichtspunkt erschien *S. acidocaldarius* als am besten geeigneter Rezipient, da aufgrund der erhöhten Häufigkeit von Deletionen leichter stabile uraciluxotrophe Rezipienten gewonnen werden konnten.

2.5.2 Restriktions-/Modifikationsaktivität

Die erfolgreiche Transformation eines Shuttle-Vektors kann durch ein im Rezipienten vorhandenes Restriktions-/Modifikationssystem erschwert oder unmöglich gemacht werden. Daher war es erforderlich potentielle Rezipientenstämme auf ein solches System hin zu untersuchen (Einzelarbeit B). Für *S. solfataricus* P1 konnte aufgrund der Experimente mit dem Shuttle-Vektor pMJ03 (Jonuscheit *et al.*, 2003) davon ausgegangen werden, dass keine Restriktionsbarriere in diesem Stamm vorhanden war. In eigenen Experimenten war es möglich unmodifizierte DNA zu transformieren, die aus *E. coli* XL1-Blue präpariert worden war. Auch für *S. solfataricus* 98/2 und abgeleitete Mutanten (PBL2025) konnte unmodifizierte DNA transformiert werden (Albers *et al.*, 2007 und eigene Experimente). Für *S. acidocaldarius* war bekannt, dass er das Restriktionsenzym *SuaI* enthält (Prangishvili *et al.*, 1985, Grogan, 2003). Zu Restriktions-/Modifikationssystemen in *S. islandicus* war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt, so dass die Stämme REN1H1, REN2H1 und HVE10/4 auf das Vorhandensein eines solchen Systems getestet wurden.

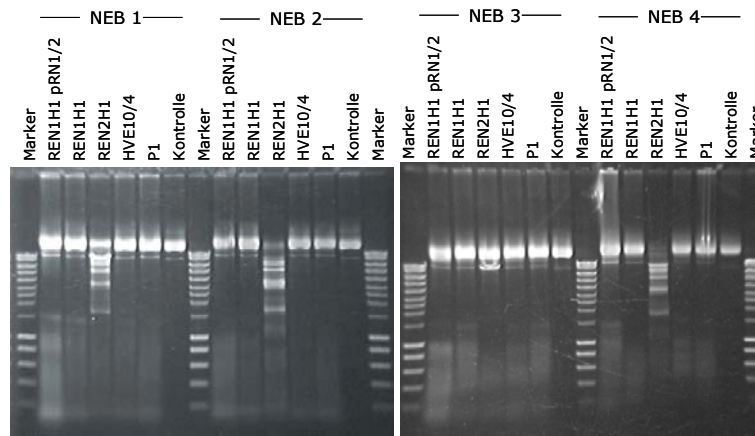


Abbildung 13: Tests auf Restriktionsaktivität mit Rohextrakten verschiedener *S. solfataricus* und *S. islandicus* Stämme. Als DNA wurde das Plasmid pUCpRN1 eingesetzt. Die Tests wurden in verschiedenen Puffern (NEB1-4) durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für die Aktivität zu ermitteln. Als Kontrolle wurde die DNA ohne Rohextraktzugabe derselben Behandlung unterzogen (1 h 65 °C, Proteinase K-Behandlung 30 min 37°C, Ethanol-fällung). NEB 1: 10 mM Bis Tris Propan-HCl, 10 mM MgCl₂, NEB 2: 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, NEB 3: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, NEB 4: 20 mM Tris-Acetat, 10 mM MgCH₃COO⁻, 50 mM K- CH₃COO⁻, NEB 1-4 jeweils 1mM Dithiothreitol.

Unter allen Versuchsbedingungen wurde für *S. islandicus* REN2H1 ein Abbau der Plasmid-DNA beobachtet. Alle anderen getesteten Rohextrakte, auch der zu Vergleichszwecken miteinbezogene *S. solfataricus* P1, zeigten keine Restriktionsaktivität.

Die in REN2H1 identifizierte Restriktionsaktivität konnte durch Fraktionierung des Rohextraktes aufgereinigt und einem Restriktionsenzym, das den Namen *SuiI* erhielt, zugeordnet werden (Einzelarbeit B). Die Erkennungssequenz (GCWGC) wurde ermittelt. Plasmid-DNA, die innerhalb dieser Erkennungssequenz mit Hilfe der Methylase *M.TseI* in C5-Position methyliert wurde, wurde *in vivo* jedoch vollständig durch *SuiI* innerhalb von 30 min abgebaut. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide mit derselben Modifikation waren hingegen vor einer Restriktion geschützt (Einzelarbeit B). Eine Erklärung könnte sein, dass auch *S. islandicus* REN2H1 eine N4-Methylierung anstelle einer mutationsbegünstigenden C5-Methylierung einführt, wie für *S. acidocaldarius* beschrieben, und eine vollständige Protektion *in vivo* nur durch eine N4-Methylierung innerhalb der Erkennungssequenz möglich ist. Da eine N4-Cytosinmethylase mit der Erkennungssequenz GCWGC nicht beschrieben und erhältlich war, konnte das Restriktions-/Modifikationssystem aus *S. islandicus* REN2H1 nicht überwunden werden.

Die Verwendung von *S. acidocaldarius* wurde zunächst ebenfalls durch die Präsenz des Restriktionsenzym *SuaI* verhindert. Zwar war bereits bekannt (Aagaard *et al.*, 1996), dass eine Methylierung von zu transformierender DNA mit der kommerziell erhältlichen Methylase *M.HaeIII* eine Verbesserung der Transformationseffizienz bewirkt, jedoch konnte mit dieser Methylase nur ein partieller Schutz der zu transformierenden DNA erreicht werden. Diese bewirkt nur eine C5-Methylierung des inneren Cytosinrestes der GGCC-Erkennungssequenz und keine N4-Methylierung wie in genomischer DNA aus *S. acidocaldarius* nachgewiesen werden konnte (Grogan, 2003). Da schon ein Schnitt innerhalb der Vektorsequenz die Replikation eines Shuttle-Vektors unterbindet, und der GC-reiche *E. coli*-Anteil des Vektors elf

GGCC-Erkennungssequenzen enthält, war zur erfolgreichen Anwendung eines Shuttle-Vektors eine komplett schützende Methylierung notwendig. Erst die Verwendung der nicht kommerziell erhältlichen Methylase *M.EsaBC4I* (zur Verfügung gestellt durch New England Biolabs (NEB)) zur kompletten N4-Methylierung der inneren Cytosinreste der *SuaI*-Erkennungssequenz ermöglichte die komplette Protektion von zu transformierender DNA (Kurosawa und Grogan, 2005). Um Shuttle-Vektoren in methylierte Plasmide zu überführen wurden sie mit einem Plasmid, das die Methylase *M.EsaBC4I* exprimiert, in *E. coli* kotransformiert und anschließend das methylierte Plasmid gereinigt. Dabei war es wichtig einen *E. coli*-Stamm zu verwenden, dessen *mcrBC*-Gene inaktiviert sind, da dieses Restriktionssystem, das in standardmäßig verwendeten *E. coli*-Stämmen aktiv ist, die modifizierte DNA schneidet. Der Stamm ER1821 (NEB) zeigte dabei das beste Verhalten (Einzelarbeit D).

2.5.3 Risiko homologer Rekombination mit dem Wirtsgenom

Ein weiterer wichtiger Punkt, der entscheidend für die Stabilität eines Shuttle-Vektors in episomaler Form sein kann, ist die Reduzierung der Gefahr homologer Rekombination von Regionen des Shuttle-Vektors mit Regionen des Wirtschromosoms, die eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen. Da zur Konstruktion der Shuttle-Vektoren die *pyrEF*-Gene aus *S. solfataricus* P2 verwendet wurden, war die Gefahr homologer Rekombination bei Verwendung eines *S. solfataricus* Stammes hoch. Da jedoch bekannt war, dass der verwendete Stamm *S. solfataricus* PH1-16 nicht zur effizienten homologen Rekombination befähigt ist (Jonuscheit *et al.*, 2003), erschien das Risiko hier gering. Für *S. solfataricus* PBL2025 bestand dieses Risiko jedoch. Da *S. islandicus* eine hohe Sequenzähnlichkeit von ca. 80-90% mit *S. solfataricus* aufweist, musste auch hier von einem erhöhten Rekombinationsrisiko ausgegangen werden. Als am besten geeignet in dieser Hinsicht erschien *S. acidocaldarius*, da dieser nur eine Sequenzähnlichkeit von 60-70% mit *S. solfataricus* zeigt.

2.5.4 Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse zur Charakterisierung möglicher Wirtsstämme

Die Vor- und Nachteile verschiedener selbst isolierter (siehe Kapitel 2.4) sowie bereits beschriebener *Sulfolobus*-Stämme hinsichtlich ihrer Eignung als Rezipienten für potentielle Shuttle-Vektorkonstrukte sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Übersicht über die Bewertung einzelner Stämme hinsichtlich ihrer Eignung als Rezipient für potentielle Shuttle-Vektorkonstrukte.

	<i>S. solfataricus</i> PH1-16	<i>S. solfataricus</i> PBL2025	<i>S. acidocaldarius</i> MR31	<i>S. islandicus</i> REN1H1, SIR1, R20	<i>S. islandicus</i> HVE10/4 H1
Mutanten zur Selektion vorhanden	+	+	+	+	+
- davon Deletionsmutanten	-	+	+	-	-
geringes Risiko homologer Rekombination mit dem Wirtsgenom	+	-	++	-	-
genetische Stabilität	-	+	++	+	+
kein bzw. überwindbares Restriktions-/Modifikationssystem	++	++	+	++	++
bereits erfolgreich als Rezipient für Shuttle-Vektor eingesetzt	+	-	-	-	-

++: sehr positive Bewertung, +: positive Bewertung, -: negative Bewertung, in Bezug auf die Eignung als Rezipient.

Keines der vorhandenen Isolate erhielt durchwegs positive Bewertungen. *S. acidocaldarius* erschien aufgrund der Verfügbarkeit einer Deletionsmutante, seiner hohen genetischen Stabilität und der geringen Sequenzähnlichkeit zu dem als Quelle der selektiven Markergene dienenden Stamm *S. solfataricus* P2 und daraus resultierendem geringem Risiko homologer Rekombination prinzipiell als besonders geeignet. Zunächst wurde der Einsatz von *S. acidocaldarius* MR31 jedoch durch das Restriktions-/ Modifikationssystem verhindert. Die Methylase *M.EsaBC4I* stand erst zu einem späten Zeitpunkt während dieser Arbeit zur Verfügung. Daher wurde zunächst *S. solfataricus* PH1-16 bevorzugt eingesetzt, da dieser bereits erfolgreich als Rezipient für einen Virus-basierten Shuttle-Vektor gedient hatte (Jonuscheit *et al.*, 2003). Daneben wurden ebenfalls die Mutanten des kurierten, nativen Wirtsstammes des Plasmides pRN1, *S. islandicus* REN1H1, getestet. *S. solfataricus* PBL2025 (Schelert *et al.*, 2004) stand erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung. Nicht verwendet wurden *S. islandicus* REN2H1 Stämme, da deren Restriktionssystem nicht durch Methylierung zu transformierender DNA mit Hilfe einer Methylase überwunden werden konnte.

Wie schon im Falle der pRN1-Unterbrechungsstellen bei der Vektorkonstruktion wurde auch bei der Auswahl der potentiellen Rezipientenstämme eine größere Zahl an Stämmen getestet um die Erfolgswahrscheinlichkeit zu erhöhen. Es konnte nicht mit Sicherheit entschieden werden, welcher der in diesem Kapitel angesprochenen Punkte entscheidend für eine erfolgreiche und stabile Replikation der Shuttle-Konstrukte sein würde oder ob darüber hinaus weitere Faktoren einen Einfluss haben könnten.

2.6 Identifizierung, Charakterisierung und Validierung erfolgreicher Shuttle-Vektorkonstrukte

2.6.1 Identifizierung erfolgreicher Shuttle-Vektoren und Rezipientenstämme

Die 13 verschiedenen potentiellen Shuttle-Konstrukte mit den *pyrEF*-Genen als selektivem Marker für die Uracil-Selektion, sowie das Konstrukt, das zusätzlich das *lacS*-Gen als selektiven Marker für die Laktose-Selektion beinhaltet (Kapitel 2.3.6) wurden in die zur Verfügung stehenden Rezipientenstämme (Kapitel 2.5.4) transformiert (Einzelarbeit D).

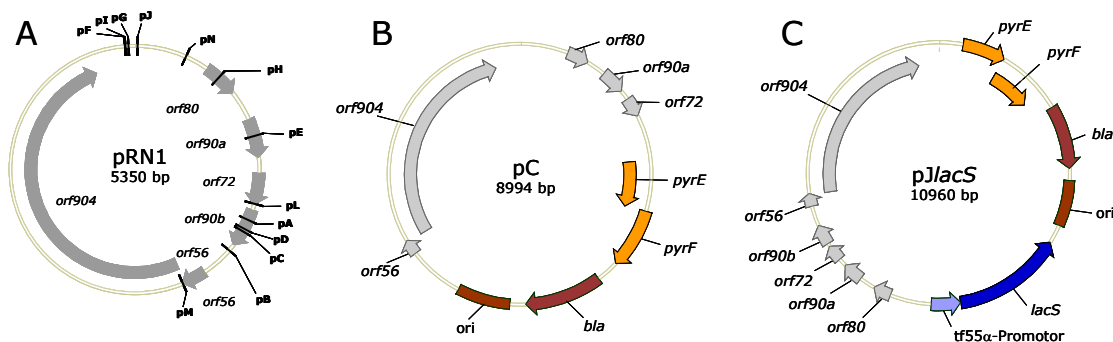


Abbildung 14: Transformierte Shuttle-Vektorkonstrukte. A: Karte des Plasmides pRN1 mit 13 verschiedenen Unterbrechungsstellen der Konstrukte pA bis pN. B: Karte des Shuttle-Konstruktes pC. C: Karte des Shuttle-Konstruktes pJlacS. Offene Leseraster des Plasmides pRN1 sind grau gekennzeichnet, der *E. coli*-Anteil in dunkelrot, die selektiven Markergene *pyrE* und *pyrF* in orange und die LacS-Expressionskassette bestehend aus dem *tf55α*-Promotor und dem *lacS*-Gen in blau.

Da davon ausgegangen wurde, dass die Elektroporation nicht in allen Fällen erfolgreich sein würde, wurden alle Konstrukte mehrfach in jeden Rezipientenstamm transformiert. Als erster Hinweis auf eine erfolgreiche Replikation der Konstrukte wurde das Wachstum von Transformanten auf Platten und in Flüssigmedium untersucht. Wenn Einzelkolonien in Flüssigmedium stabiles Wachstum zeigten, wurde genomische DNA präpariert und mittels PCR mit pRN1-spezifischen Primern, Dot Blot, Koloniehybridisierung, Southern Blot und Retransformation in *E. coli* auf replizierende Shuttle-Vektoren untersucht.

Zusätzlich wurde mittels PCR mit Primern spezifisch für das inaktivierte Markergene des Rezipienten untersucht, ob es zu einer Reversion der verwendeten Mutante gekommen war. Im Falle von Insertionsmutanten konnte die Länge des erhaltenen PCR-Produktes Aufschluss geben. Bei Punktmutanten wurde das entsprechende PCR-Fragment kloniert und sequenziert. Die Ergebnisse dieser Tests für alle verwendeten Rezipienten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Übersicht über erfolgreiche Kombinationen von Shuttle-Vektorkonstrukten und Rezipienten.

<i>Sulfolobus</i> Spezies und Stamm	Name der Mutante	Gen	Typ der Mutation		Herkunft der Mutante/ Literaturquelle	erfolgreich mit Shuttle-Konstrukt(en)
<i>S. acidocaldarius</i> MR31		<i>pyrE</i>	Deletion	18 bp deletiert	Reilly und Grogan, 2001	pA-pN, p <i>JlacS</i>
<i>S. islandicus</i> REN1H1	R1	<i>pyrE</i>	Punktmutationen		diese Arbeit	keine stabile Replikation
<i>S. islandicus</i> REN1H1	R20	<i>pyrEF</i>	Insertionselement	SMN1 in Promotor-region	diese Arbeit	keine stabile Replikation
<i>S. islandicus</i> REN1H1	S1R1	<i>pyrEF lacS</i>	Punktmutationen Frameshift		diese Arbeit	keine stabile Replikation
<i>S. islandicus</i> HVE10/4	H1	<i>pyrEF</i>	Punktmutationen		diese Arbeit	keine stabile Replikation
<i>S. solfataricus</i> P1	PH1-16	<i>pyrF lacS</i>	Insertionselement Insertionselement	ISC1359 ISC1217	Martusewitsch et al., 2000	keine stabile Replikation
<i>S. solfataricus</i> 98/2	PBL2025	<i>lacS</i>	Deletion	SSO3004- SSO3050 deletiert	Schelert et al., 2004	p <i>JlacS</i>

2.6.2 Charakterisierung und Validierung der erfolgreichen Shuttle-Vektoren

Nachdem feststand, dass alle Shuttle-Konstrukte bis auf pM unter Uracil-Selektion in *S. acidocaldarius* MR31 (Abbildung 15), und das Konstrukt p*JlacS* unter Laktose-Selektion in *S. solfataricus* PBL2025 erfolgreich repliziert wurden, wurde eine detaillierte Charakterisierung im Hinblick auf die an den Shuttle-Vektor gestellten Anforderungen vorgenommen.

Da bei Verwendung der Uracil-Selektion und des Rezipienten *S. acidocaldarius* MR31 eine direkte Plattierung nach der Transformation möglich war, wurden zunächst Einzeltransformanten aus je einer Kolonie isoliert. Es wurde genomische DNA präpariert, und die Präsenz des Shuttle-Vektors mittels Southern Blot nach geeignetem Restriktionsverdau überprüft. Mit dieser Methode wurde eine mögliche Rekombination des Vektors sowie eine eventuell stattfindende Integration in das Wirtschromosom überprüft. Weiterhin wurde mittels alkalischer Lyse direkt aus *Sulfolobus*-Zellen eine Plasmidisolierung durchgeführt. Diese Plasmidpräparation wurde zur Rücktransformation in *E. coli* und zur direkten Restriktionsanalyse genutzt. Rücktransformanten wurden mittels Restriktionsanalyse mit dem Ausgangs-plasmid verglichen, das in *Sulfolobus* transformiert worden war. So konnte zum einen die Rücktransformierbarkeit überprüft werden, zum anderen diente diese Methode zur gleichzeitigen Kontrolle eventueller Veränderungen des Plasmides in *Sulfolobus* oder *E. coli*. Zur weitergehenden Charakterisierung der Shuttle-Vektoren wurde die Kopienzahl aller Konstrukte mittels qPCR bestimmt, für die Konstrukte pC, pE in *S. acidocaldarius* MR31 und p*JlacS* in *S. solfataricus* PBL2025 auch in verschiedenen Wachstumsphasen.

Außerdem wurde die Stabilität der Vektoren über einen Zeitraum von etwa 200 Generationen unter selektiven Bedingungen mittels Plattierung und Koloniehybridisierung und für etwa 10 Generationen unter nicht selektiven Bedingungen untersucht.

Ergebnisse

Es zeigte sich, dass die Vektoren keine Veränderungen oder Rekombination in *Sulfolobus* oder *E. coli* zeigten. Für die Vektoren pA-pN mit Ausnahme von pB wurde in *Sulfolobus* auch nach sehr langer Kultivierung keine Veränderung des Shuttle-Vektors beobachtet. Das Konstrukt pB zeigte in zwei mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen (*Hind*III und *Sac*I) durchgeführten Restriktionsanalysen und anschließenden Southern Blots eine zusätzliche Bande, was auf den Verlust eines Teils des Plasmides hindeutete. Da in Rücktransformationen stets nur das Originalplasmid erhalten wurde, ist es wahrscheinlich, dass der *E. coli*-Replikationsursprung oder das Ampicillinresistenzgen beeinträchtigt wurde (Einzelarbeit D, Abbildung 2A und B). Das Plasmid p*JlacS* war ebenfalls für die Dauer von Reporterexperimenten stabil in *Sulfolobus*. Es wurden jedoch nach sehr langer Kultivierung (> 200 Generationen) Veränderungen am Shuttle-Vektor detektiert (Verlust von Teilen des *lacS*-Gens), jedoch nur in *S. acidocaldarius* MR31. In *S. solfataricus* PBL2025 war p*JlacS* völlig stabil (Einzelarbeit D, Abbildung 6). In *E. coli* wurde eine Veränderung der Plasmide nur detektiert, wenn eine Restriktionsanalyse mit anschließendem Southern Blot durchgeführt wurde. Ein sehr kleiner Teil (< 1%) der Plasmidpräparation zeigt dabei ein anderes Bandenmuster als erwartet. Auf mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen konnten jedoch stets nur die erwarteten Banden nach Restriktionsanalyse beobachtet werden (Einzelarbeit D, Abbildung 2 D und E).

Mit Shuttle-Vektor transformierte Konstrukte in selektivem Medium zeigten dasselbe Wachstumsverhalten wie der Rezipientenstamm in nicht selektivem Medium (Einzelarbeit D, Abbildung 3 A und B).

Unter selektiven Bedingungen zeigten die Shuttle-Vektoren eine sehr hohe Retention bzw. Stabilität in *Sulfolobus*. Ausplattieren derselben Kultur auf selektivem und nicht selektivem Medium erbrachte sehr ähnliche Koloniezahlen. Zusätzlich durchgeführte Koloniehybridisierungen zeigten, dass für > 90% aller Kolonien ein Signal mit einer pRN1 spezifischen Sonde erhalten wurde (Einzelarbeit D, Abbildung 2C). Unter nicht selektiven Bedingungen wurde eine Abnahme der Anzahl Shuttle-Vektor enthaltender Zellen auf etwa 10 % nach 10 Generationen für alle Konstrukte außer pH und p*JlacS* beobachtet. Die Fraktion der Zellen, die den Vektor pH nach 10 Generationen noch trugen, lag bei 10^{-4} , für p*JlacS* bei ca. 10^{-2} (Einzelarbeit D, Abbildung 3C).

Kopienzahlbestimmungen zeigten, dass die verschiedenen Vektoren mit einer Kopienzahl von 2-8 pro Zelle vertreten waren. Nur für das instabile pB wurde die Kopienzahl 1 ermittelt. Die Größe der Konstrukte pA-pN liegt mit 8994 bp erheblich unter der Größe des pMJ-Virus-Vektorsystems von 22 kb. Der Erfolg des Konstruktes p*JlacS* mit einer Größe von 11 kb zeigt, dass auch zusätzliche Insertionen toleriert werden. Es sind in den Vektoren jeweils zwei benachbarte, nur einmal vorkommende Restriktionsschnittstellen (*Sac*II/*Not*I bzw. *Xba*I/*Not*I) enthalten, die eine einfache zusätzliche Insertion von DNA-Fragmenten ermöglichen. Die erfolgreiche Replikation konnte für die wenig verwandten Arten *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* demonstriert werden. Eine Ausweitung der möglichen Rezipienten ist sehr wahrscheinlich möglich, sofern geeignete *pyrEF*-Deletionsmutanten isoliert werden können.

Da es bei zuvor publizierten Shuttle-Systemen immer wieder zu großen Problemen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit gekommen war, wurden die 14 Konstrukte nicht

nur in diesem Labor in Bayreuth getestet, sondern auch davon unabhängig in zwei weiteren Labors (Dennis Grogan, Cincinnati, USA und Sonja Albers, Groningen, Niederlande). Dort wurden die Vektoren unter geringfügig anderen Elektroporations- und Kultivierungsbedingungen ebenfalls für geeignet befunden.

Diskussion

Nach der erfolgreichen Etablierung des pRN1-basierten Shuttle-Systems konnten nun die entscheidenden Faktoren identifiziert werden, die über dieses System hinaus (z. B. auch für integrative Systeme oder *Knockout*-Systeme) Bedeutung für die Etablierung genetischer Systeme in *Sulfolobus* haben. Zum einen wurde deutlich, dass die Mehrheit der an verschiedenen Stellen unterbrochenen Konstrukte keinerlei Beeinflussung der Replikationsfähigkeit zeigten. Insbesondere war es überraschend, dass das Konstrukt pH, bei dem der hochkonservierte offene Leseraster *orf80* unterbrochen wurde, sich unter selektiven Bedingungen wie die anderen Shuttle-Vektoren verhielt. Eine genauere Auswertung der verschiedenen Konstrukte findet sich im anschließenden Kapitel.

Weiterhin zeigte sich, dass eine effiziente Selektion der Durchbruch zur erfolgreichen Etablierung der Vektoren in *Sulfolobus* war. Interessant ist, dass es nur mit Deletionsmutanten (partiell oder vollständig) gelang, den nötigen hohen Selektionsdruck zu erzielen. Obwohl alle verwendeten Punkt- und Transposonmutanten sehr stabil waren, wurde für diese Mutanten eine Reversion zum Wildtyp beobachtet (Einzelarbeit E). Der Verlust des Selektionsdrucks nach der Reversion erklärt, warum für diese Mutanten zwar anfänglich das Vorhandensein von Vektorkonstrukten in den Zellen nachgewiesen werden konnte (nur mit empfindlichen Detektionsmethoden wie PCR), die Vektoren dann jedoch rasch verloren wurden und nicht stabil in den Zellen replizierten.

Dieser Befund steht in scheinbarem Widerspruch zum erfolgreichen Einsatz der Transposonmutante *S. solfataricus* PH1-16 als Rezipient für den pMJ-Shuttle-Vektor (Jonuscheit *et al.*, 2003). Dieser Vektor trägt ebenfalls die *pyrEF*-Gene als selektiven Marker. Da bei diesem System jedoch ein intaktes Virusgenom verwendet wird und es sich um ein selbstverbreitendes System handelt, bei dem alle Zellen einer Kultur durch den Virus mit dem Vektor infiziert werden, ist nur ein erheblich geringerer Selektionsdruck erforderlich. Zudem integriert der Virus nach der Verbreitung in das Wirtsgenom, weshalb ab diesem Zeitpunkt keine Selektion mehr erforderlich ist. Während der Versuche zum Testen dieses Virusvektors konnten in vielen Fällen keine Einzeltransformanten (d. h. Zellen mit chromosomal integriertem Shuttle-Vektor) gewonnen werden. Dies spricht dafür, dass hier der Selektionsdruck zu niedrig war, um eine Integration ins Chromosom zu erzwingen. Ein weiterer Punkt, der die Effizienz der Selektion dieses Vektor-Rezipienten-Systems in Frage stellt, ist die Tatsache, dass nach der Transformation zunächst eine Kultivierung für drei Tage in nicht selektivem Medium absolut notwendig ist, da die Zellen sonst absterben (Jonuscheit *et al.*, 2003).

Die Verwendung von *S. acidocaldarius* als Rezipient bringt eine Reihe von Vorteilen mit sich, die den Nachteil der notwendigen Methylierung zu transformierender DNA aufwiegen. Neben den bereits in Tabelle 5 zusammengefassten Vorteilen hoher genetischer Stabilität und geringem Risiko homologer Rekombination mit Vektorbestandteilen ist auch die Tatsache von Vorteil, dass *S. acidocaldarius* keine chromosomalen Kopien extrachromosomaler Elemente oder

Teilbereiche davon mit Ähnlichkeiten zur pRN1-Sequenz enthält. Für *S. solfataricus* und *S. tokodaii* sind solche Elemente beschrieben (She *et al.*, 2001). Deletionsanalysen von pRN1 können in *S. acidocaldarius* also unbeeinflusst von homologen chromosomal integrierten Elementen durchgeführt werden (Einzelarbeit D). Weiterhin zeigte *S. acidocaldarius* MR31, im Gegensatz zu *S. islandicus* und *S. solfataricus* Stämmen, praktisch kein Hintergrundwachstum auf in Spuren mit Uracil verunreinigten Medien (Kapitel 2.4.6, Einzelarbeit D, Einzelarbeit E). Hinzu kommt, dass *S. acidocaldarius* die kürzeste Verdopplungszeit aller getesteten *Sulfolobus* Stämme aufweist, und im Gegensatz zu *S. islandicus* und *S. solfataricus* Stämmen nach nur kurzer Regeneration direkt nach der Elektroporation plattierbar ist (Einzelarbeit D).

2.7 Anwendung der Shuttle-Vektoren

2.7.1 Ermittlung essentieller Regionen des Plasmides pRN1

Eine Anwendung, die sich unmittelbar aus den an 13 unterschiedlichen Stellen unterbrochenen Konstrukten ergab, war die Analyse der für die Replikation von pRN1 essentieller Regionen. Ausgehend von den Ergebnissen zur Replikation der Konstrukte pA-pN in *S. acidocaldarius* konnte gefolgert werden, dass das Replikationsoperon *orf56/orf904* essentiell zur Replikation des Plasmides ist, da das Konstrukt pM, in dem das Operon unterbrochen ist, das einzige nicht replikationsfähige Shuttle-Konstrukt war. Die Unterbrechung von *orf80* zeigte keinen Einfluss auf die Replikation des Plasmides unter selektiven Bedingungen. Folglich ist Orf80 nicht essentiell für die Replikation von pRN1. Da der Shuttle-Vektor mit einer Unterbrechung dieses offenen Leserasters jedoch unter nicht selektiven Bedingungen schnell verloren wurde (Einzelarbeit D, Abbildung 3C), könnte *orf80* eine Funktion in der stabilen Retention des Plasmides haben. Der Mechanismus dieser Funktion ist jedoch unklar. Die Veränderung oder Rekombination, die für das Plasmid pB in *Sulfolobus* beobachtet wurde, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Region um die Unterbrechungsstelle von pB eine Funktion hat. In dieser Region finden sich ungewöhnliche Sequenzabschnitte, z. B. eine Abfolge von 17 Cytosinresten oder eine Reihe repetitiver Sequenzen (Keeling *et al.*, 1996).

Zusätzlich zu den Unterbrechungskonstrukten wurden auch Deletionskonstrukte getestet. Dabei stellte sich heraus, dass der gesamte Bereich zwischen der Insertion in Plasmid pF und pC deletiert werden kann (Abbildung 15), ohne mit der stabilen Replikation von pRN1 zu interferieren. Daher ist es prinzipiell möglich, die Shuttle-Vektoren um zusätzlich ca. 1,8 kb zu verkleinern.

Eine weitere Deletion des pRN1-Anteils würde auch die Entfernung von Teilen des Replikationsoperons bedeuten. Da die Replikation des Plasmides jedoch nicht ohne dieses Operon möglich ist, können die Untersuchungen zur Identifizierung des Replikationsursprungs erst weitergeführt werden, wenn es gelingt das Replikationsprotein in geeigneter Dosierung *in trans* bereitzustellen.

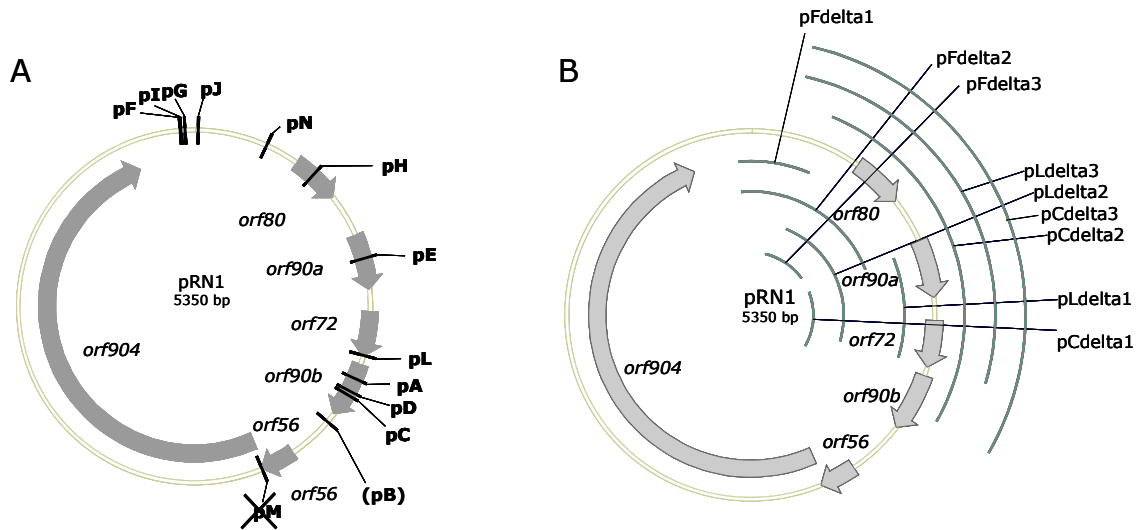


Abbildung 15: Essentielle Regionen des Plasmids pRN1. A: Erfolg der Konstrukte mit unterschiedlichen Unterbrechungsstellen. Kennzeichnung: durchgestrichen: Konstrukt repliziert nicht, eingeklammert: Konstrukt rekombiniert, keine Kennzeichnung: erfolgreich replizierendes Konstrukt. B: Erfolgreich replizierende Deletionskonstrukte nachgewiesen durch Wachstumstests und Rücktransformation (nicht gezeigt). Der jeweils deletierte pRN1-Anteil ist gekennzeichnet.

2.7.2 Nutzung der Vektoren zur Proteinexpression

Expression eines Reportergens

Eine wichtige Anwendung der entwickelten Shuttle-Vektoren ist der Einsatz in Reportergenexperimenten. Ein für diesen Zweck hervorragend geeignetes Enzym ist die β -Glykosidase (LacS) aus *S. solfataricus* P2 (Pisani *et al.*, 1990, Elferink *et al.*, 1996, Jonuscheit *et al.*, 2003, Auceili *et al.*, 2006, Lubelska *et al.*, 2006, Einzelarbeit A). LacS zeigt β -Galaktosidaseaktivität und katalysiert die Hydrolyse des Substrates ortho-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid zum photometrisch quantifizierbaren ortho-Nitrophenol.

Dieses Enzym war bisher nur als Reporter in *S. solfataricus* Stämmen eingesetzt worden. Für *S. acidocaldarius* wurden bisher keine induzierbaren Promotor charakterisiert. Um dennoch die prinzipielle Eignung dieses Enzyms für Reportergenuntersuchungen in *S. acidocaldarius* überprüfen zu können wurde der Gendosierungseffekt genutzt. Dieser Effekt bezeichnet die Korrelation der Expressionsstärke eines Gens (ohne zusätzliche Regulation) mit der Kopienzahl des Gens in einer Zelle. Da für die Shuttle-Vektoren unterschiedliche Kopienzahlen im Verlauf einer Batch-Kultur gemessen wurden (Einzelarbeit D, Abbildung 4), sollte der Verlauf der β -Galaktosidaseaktivität der Kopienzahl folgen.

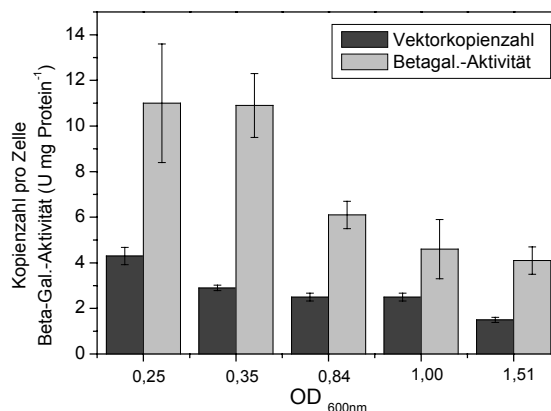


Abbildung 16: *lacS* als Reportergen in *S. acidocaldarius* MR31 transformiert mit *pJlacS*. Aus gleichzeitig genommenen Proben in verschiedenen Wachstumsphasen wurden die Kopienzahl des Vektors sowie die β -Galaktosidaseaktivität bestimmt ($n = 3$), die Fehlerbalken entsprechen einer Standardabweichung.

Dieses Verhalten konnte für *S. acidocaldarius* beobachtet werden. Sowohl die Kopienzahl als auch die β -Galaktosidaseaktivität halbierten sich vom Probenahmezeitpunkt bei OD 0,25 bis OD 1,51.

Promotoren

Der für die Expression des LacS-Enzyms genutzte Promotor war der bereits von Jonuscheit *et al.* (2003) beschriebene *tf55 α* -Promotor der α -Untereinheit des archaealen Thermosoms aus *S. solfataricus* P2. Dieser Promotor wurde beibehalten, da er eine hohe basale Aktivität zeigt (Jonuscheit *et al.*, 2003).

Im Verlauf der Untersuchungen zu anderen Promotoren stellte sich heraus, dass aus *S. solfataricus* stammende Promotoren, die im natürlichen Wirt induzierbar waren, in *S. acidocaldarius* nicht reguliert werden konnten. Eine Verwendung von *S. acidocaldarius*-Promotoren in den Shuttle-Vektoren wurde zunächst nicht in Betracht gezogen, da *S. acidocaldarius* zu sehr effizienter homologer Rekombination befähigt ist, und schon sehr kurze homologe Regionen zur Integration in das Chromosom ausreichen (Kurosawa und Grogan, 2005).

Neben dem *tf55 α* -Promotor, der eine sehr hohe Aktivität zeigte und sich negativ auf die Retention des Vektors *pJlacS* auswirkte, wurde deshalb der im natürlichen Wirt durch H₂O₂-Zugabe induzierbare *dps*-Promotor (Wiedenheft *et al.*, 2005) aus *S. solfataricus* P2 getestet. Dieser Promotor war in *S. acidocaldarius* zwar nicht induzierbar, zeigte jedoch in Aktivitätstests eine geringere Promotorstärke und das entsprechende Konstrukt eine höhere Vektorretention in *Sulfolobus* als der *tf55 α* -Promotor und wurde daher für weitere Anwendungen eingesetzt. Die Entwicklung regulierbarer Promotoren für den Einsatz in den Shuttle-Vektoren geht über den Rahmen dieser Arbeit hinaus und wird Ziel zukünftiger Optimierungen des Shuttle-Systems sein (siehe Ausblick am Ende dieses Kapitels).

Expression eines mit Affinitätstag versehenen Proteins

Eine weitere Anwendung, für die die Eignung der Shuttle-Vektoren überprüft werden sollte, ist die homologe Expression von Proteinen aus *Sulfolobus*, die mit einem Affinitätstag versehen sind und daher einfach gereinigt werden können. Diese Anwendung ist deshalb von Bedeutung,

da es zum Teil sehr schwierig oder sogar unmöglich ist, Proteine aus *Sulfolobus* oder auch Proteine anderer hyperthermophiler Archaea heterolog in mesophilen Expressionssystemen in funktionaler Form zu exprimieren. Auch konnte durch die Expression im nativen Wirt eine verbesserte katalytische Aktivität gegenüber heterolog exprimierten Proteinen festgestellt werden (Albers *et al.*, 2006). Weiterhin ist eine homologe Expression auch von Vorteil, wenn das Protein Modifikationen enthält. Im Falle des hier exprimierten Proteins RPA (*replication protein A*) wurde beispielsweise festgestellt, dass es *in vivo* N-terminal acetyliert wird, während in *E. coli* heterolog exprimiertes RPA diese Modifikation nicht aufweist (Mackay *et al.*, 2007). Das *rpa*-Gen aus *S. solfataricus* P2 wurde unter Kontrolle des *dps*-Promotors in den Vektor pC kloniert und in *S. acidocaldarius* MR31 exprimiert. Ein C-terminaler Hexahistidin-Tag ermöglichte eine einfache Reinigung mittels Affinitätschromatographie. Ein ebenfalls C-terminaler FLAsH-Tag (Aminosäuresequenz CCPGCC, Adams *et al.*, 2002) erlaubte die eindeutige Identifizierung des Proteins mittels Fluoreszenzfärbung auch nach nur partieller Reinigung. Die Visualisierung erfolgte durch kovalente Bindung modifizierter Fluoresceinmoleküle an die Thiolgruppen der vier Cysteinreste des FLAsH-Tags.

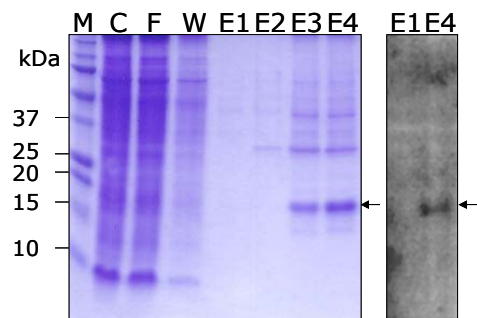


Abbildung 17: Expression von RPA in *S. acidocaldarius* MR31. Links: mit Coomassie Brilliant Blau gefärbtes 12%-Polyacrylamidgel mit den Fraktionen eines Reinigungsschrittes über eine 1 mL-NiNTA-Säule. M: Marker, C: Rohextrakt, F: Durchfluss, W: Waschfraktion (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol), E1-E4: Elutionsfraktionen (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 250 mM Imidazol). RPA (19 kDa) in E3 und E4 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Rechts: 12%-Polyacrylamidgel mit Visualisierung des FLAsH-Tags für die Elutionsfraktionen E1 als Negativkontrolle und E4 (UV-Transilluminator bei 312 nm).

Es wurde eine deutliche Bande des 19 kDa RPA-Proteins erhalten, die durch die FLAsH-Tag-Färbung eindeutig identifiziert werden konnte. Zwar ist die Proteinexpression mit einer Ausbeute im Bereich von 10-100 µg Protein pro Liter Kultur gering, jedoch sollte dieses Experiment nur zur Demonstration der prinzipiellen Eignung des Vektors zur Proteinexpression dienen.

2.7.3 Diskussion und Ausblick

Es konnte mit einer Reihe von Versuchen demonstriert werden, dass die entwickelten Shuttle-Vektoren sowohl zur weiteren Analyse des Plasmides pRN1 als auch für Reporter-genexperimente und zur Expression von Proteinen in *Sulfolobus* geeignet sind.

Die Lösung des Problems der effizienten Selektion wird in Zukunft weitere Anwendungen ermöglichen. So können mit Hilfe der selektiven Markergene und des Rezipienten MR31 Versuche zur Konstruktion episomaler Vektoren auf Basis chromosomaler Replikations-

ursprünge vorgenommen werden. Auch ist es möglich den selektiven Marker auf Konstrukten zur homologen Rekombination mit dem Chromosom in *S. acidocaldarius* einzusetzen. Damit eröffnet sich die Möglichkeit gezielt Gene im Chromosom zu deletieren und *Knockout*-Stämme herzustellen sowie auch zusätzliche Gene in das Chromosom zu integrieren.

Weiterhin ist aufgrund der Funktion des Replikons des Plasmides pRN1 in den wenig verwandten Spezies *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* und der Konservierung des für die Replikation essentiellen Teils des Plasmides pRN1 in mindestens einem Plasmid außerhalb der Gattung *Sulfolobus* (pDL10 aus *Acidianus ambivalens*) denkbar, dass die Shuttle-Vektoren in weiteren Vertretern der hyperthermophilen Crenarchaea zur Replikation befähigt sind.

Die Entwicklung dieses genetischen Systems gelang zu einem Zeitpunkt, als viele biochemische Studien zeigen konnten, dass *Sulfolobus* sich sehr gut als Modellorganismus zum Studium komplexer eukaryontischer Prozesse anhand eines einfachen Systems eignen (Duggin und Bell, 2006, Lundgren und Bernander, 2007, Robinson und Bell, 2007, Mackay *et al.*, 2007). Weitere interessante Anwendungen des Systems liegen in der Biotechnologie. Vor allem sekretierte Enzyme aus *Sulfolobus*, die thermo- und säurestabil sind, sind interessante Kandidaten für die homologe Expression mit Hilfe des entwickelten Systems.

3 Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	<i>3' untranslated region</i>
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AS	Aminosäure
Beta-Gal.	β -Galaktosidaseaktivität
bp	Basenpaar(e)
BRE	<i>transcription factor B responsive element</i>
Cat	Chloramphenicol Acetyltransferase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dps	<i>DNA-binding protein from starved cells</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Hmg	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A-Reduktase
Hph	Hygromycin Phosphotransferase
kb	Kilobasenpaare
MHK	Minimale Hemmkonzentration
NEB	New England Biolabs
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
<i>orf</i>	<i>open reading frame</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
qPCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<i>rom/rop</i>	<i>RNA one modulator/repressor of primer</i>
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	<i>replication protein A</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
S-Layer	<i>surface layer</i>
SSV1	<i>Sulfolobus shibatae virus 1</i>
TBP	<i>TATA-Box binding protein</i>
TFB	<i>transcription factor B</i>
TFIIB	<i>transcription factor IIB</i>
Tf55 α	<i>thermophilic factor 55 α</i>
UMP	Uridinmonophosphat
wt	Wildtyp
Xgal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid

4 Literaturverzeichnis

- Aagaard, C., Dalgaard, J. Z. und Garrett, R. A. (1995). Intercellular mobility and homing of an archaeal rDNA intron confers a selective advantage over intron⁻ cells of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92(26): 12285-12289.
- Aagaard, C., Leviev, I., Aravalli, R. N., Forterre, P., Prieur, D. und Garrett, R. A. (1996). General vectors for archaeal hyperthermophiles: Strategies based on a mobile intron and a plasmid. *FEMS Microbiology Reviews* 18: 93-104.
- Adams, S. R., Campbell, R. E., Gross, L. A., Martin, B. R., Walkup, G. K., Yao, Y., Llopis, J. und Tsien, R. Y. (2002) New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling *in vitro* and *in vivo*: synthesis and biological applications. *Journal of the American Chemical Society* 124: 6063-6076.
- Agron, P. G., Sobczyk, P. und Andersen, G. L. (2002). Establishment of uncharacterized plasmids in *Escherichia coli* by *in vitro* transposition. *FEMS Microbiology Letters* 217: 249-254.
- Albers, S. V. und Driessen, A. J. M. (2007). Conditions for gene disruption by homologous recombination of exogenous DNA into the *Sulfolobus solfataricus* genome. *Archaea* 2(3): i-v.
- Albers, S. V., Jonuscheit, M., Dinkelaker, S., Urich, T., Kletzin, A., Tampé, R., Driessen, A. J. M. und Schleper, C. (2006). Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Applied and Environmental Microbiology* 72(1): 102-111.
- Allers, T. und Mevarech, M. (2005). Archaeal genetics - the third way. *Nature Reviews Genetics* 6: 58-73.
- Andersson, A., Lundgren, M., Eriksson, S., Rosenlund, M., Bernander, R. und Nilsson, P. (2006). Global analysis of mRNA stability in the archaeon *Sulfolobus*. *Genome Biology* 7(10): R99.
- Aravalli, R. N. und Garrett, R. A. (1997). Shuttle vectors for hyperthermophilic archaea. *Extremophiles* 1: 183-191.
- Arnold, H. P., She, Q., Phan, H., Stedman, K. M., Prangishvili, D., Holz, I., Kristiansson, J. K., Garrett, R. A. und Zillig, W. (1999). The genetic element pSSVx of the extremely thermophilic crenarchaeon *Sulfolobus* is a hybrid between a plasmid and a virus. *Molecular Microbiology* 34(2): 217-226.
- Aucelli, T., Contursi, P., Girfoglio, M., Rossi, M. und Cannio, R. (2006). A spreadable, non-integrative and high copy number shuttle vector for *Sulfolobus solfataricus* based on the genetic element pSSVx from *Sulfolobus islandicus*. *Nucleic Acids Research* 34(17): e114. doi:10.1093/nar/gkl615
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W. und Pace, N. R. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91: 1609-1613.
- Barry, E. R. und Bell, S. D. (2006). DNA replication in the archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70(4): 876-887.
- Bartolucci, S., Rossi, M. und Cannio, R. (2003). Characterization and functional complementation of a nonlethal deletion in the chromosome of a beta-glycosidase mutant of *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology* 185(13): 3948-3957.
- Bell, S. D. und Jackson, S. P. (1998). Transcription and translation in archaea: a mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends in Microbiology* 6(6): 222-228.
- Bell, S. D. und Jackson, S. P. (2000). Mechanism of autoregulation by an archaeal transcriptional repressor. *Journal of Biological Chemistry* 275(41): 31624-31629.
- Bell, S. D., Cairns, S. S., Robson, R. L. und Jackson, S. P. (1999b). Transcriptional regulation of an archaeal operon *in vivo* and *in vitro*. *Molecular Cell* 4: 971-982.

- Bell, S. D., Kosa, P. L., Sigler, P. B. und Jackson, S. P. (1999a). Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96(24): 13662-13667.
- Bernander, R. (1998). Archaea and the cell cycle. *Molecular Microbiology* 29(4): 955-961.
- Bernander, R. und Poplawski, A. (1997). Cell cycle characteristics of thermophilic archaea. *Journal of Bacteriology* 179(16): 4963-4969.
- Bini, E., Dikshit, V., Dirksen, K., Drozda, M. und Blum, P. (2002). Stability of mRNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *RNA* 8: 1129-1136.
- Blöchl, E., Rachel, R., Burggraf, S., Hafenbradl, D., Jannasch, H. W. und Stetter, K. O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles* 1(1): 14-21.
- Blount, Z. D. und Grogan, D. W. (2005). New insertion sequences of *Sulfolobus*: functional properties and implications for genome evolution in hyperthermophilic archaea. *Molecular Microbiology* 55(1): 312-325.
- Brantl, S. (2004). Plasmid replication control by antisense RNAs. In: *Plasmid Biology*. Hrsg.: Funnell, B.E. und Philips, G. J. Washington, ASM Press: 47-62.
- Breuer, S., Allers, T., Spohn, G. und Soppa, J. (2006). Regulated Polyploidy in Halophilic Archaea. *PLoS ONE* 1(1): e92.
- Brock, T. D., Brock, K. M., Belly, R. T. und Weiss, R. L. (1972). *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archives of Microbiology* 84: 54-68.
- Brouns, S. J. J., Wu, H., Akerboom, J., Turnbull, A. P., de Vos, W. M. und van der Oost, J. (2005). Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. *Journal of Biological Chemistry* 280(12): 11422-11431.
- Cammarano, P., Teichner, A., Londei, P., Acca, M., Nicolaus, B., Sanz, J. L. und Amils, R. (1985). Insensitivity of archaeobacterial ribosomes to protein synthesis inhibitors. Evolutionary implications. *EMBO Journal* 4(3): 811-816.
- Cannio, R., Contursi, P., Rossi, M. und Bartolucci, S. (1998). An autonomously replicating transforming vector for *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology* 180(12): 3237-3240.
- Cannio, R., Contursi, P., Rossi, M. und Bartolucci, S. (2001). Thermoadaptation of a mesophilic hygromycin B phosphotransferase by directed evolution in hyperthermophilic Archaea: selection of a stable genetic marker for DNA transfer into *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* 5: 153-159.
- Cassinotti, P. und Weitz, M. (1994). Increasing the sensitivity of a common CAT assay. *Biotechniques* 17: 36-40.
- Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted archaea. *Nature Reviews Microbiology* 4: 331-343.
- Charlebois, R. L., Lam, W. L., Cline, S. W. und Doolittle, W. F. (1987). Characterization of pHV2 from *Halobacterium volcanii* and its use in demonstrating transformation of an archaeobacterium. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 84(23): 8530-8540.
- Chen, L., Brügger, K., Skovgaard, M., Redder, P., Qunxin, S., Torarinsson, E., Greve, B., Awayez, M., Zibat, A., Klenk, H.-P. und Garrett, R. A. (2005). The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the crenarchaeota. *Journal of Bacteriology* 187(14): 4992-4999.
- Cline, S. W. und Doolittle, W. F. (1992). Transformation of members of the genus *Haloarcula* with shuttle vectors based on *Halobacterium halobium* and *Haloferax volcanii* plasmid replicons. *Journal of Bacteriology* 174(3): 1076-1080.
- Condo, I., Ciammaruconi, A., Benelli, D., Ruggero, D. und Londei, P. (1999). Cis-acting signals controlling translational initiation in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Molecular Microbiology* 34: 377-384.
- Contursi, P., Cannio, R., Prato, S., Fiorentino, G., Rossi, M. und Bartolucci, S. (2003). Development of a genetic system for hyperthermophilic Archaea: expression of a moderate thermophilic bacterial alcohol dehydrogenase gene in *Sulfolobus solfataricus*. *FEMS Microbiology Letters* 218: 115-120.

- Cubellis, M. V., Rozzo, C., Montecucchi, P. und Rossi, M. (1990). Isolation and sequencing of a new beta-galactosidase-encoding archaeobacterial gene. *Gene* 94(1): 91-94.
- Dahlke, I. und Thomm, M. (2002). A *Pyrococcus* homolog of the leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerase recruitment. *Nucleic Acids Research* 30(3): 701-710.
- De Rosa, M., Gambacorta, A. und Bullock, J. D. (1975). Extremely thermophilic acidophilic bacteria convergent with *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Genetics and Microbiology* 86(1): 156-164.
- del Solar, G. und Espinosa, M. (1992). The copy number of plasmid pLS1 is regulated by two trans-acting plasmid products: the antisense RNAII and the repressor protein, RepA. *Molecular Microbiology* 6(1): 83-94.
- del Solar, G. und Espinosa, M. (2000). Plasmid copy number control: an ever growing story. *Molecular Microbiology* 37(3): 492-500.
- del Solar, G., Acebo, P. und Espinosa, M. (1995). Replication control of plasmid pLS1: efficient regulation of plasmid copy number is exerted by the combined action of two plasmid components, CopG and RNAII. *Molecular Microbiology* 18(5): 913-924.
- del Solar, G., Acebo, P. und Espinosa, M. (1997). Replication control of plasmid pLS1: the antisense RNAII and the compact rnaII region are involved in translational regulation of the initiator RepB synthesis. *Molecular Microbiology* 23(1): 95-108.
- Duggin, I. G. und Bell, S. D. (2006) The chromosome replication machinery of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Biological Chemistry* 281(22): 15029-15032.
- Edgell, D. R. und Doolittle, W. F. (1997). Archaea and the origin(s) of DNA replication proteins. *Cell* 89(7): 995-998.
- Elferink, M. G. L., Schleper, C. und Zillig, W. (1996). Transformation of the extremely thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* via a self spreading vector. *FEMS Microbiology Letters* 137: 31-35.
- Forterre, P. (2002). A hot story from comparative genomics: reverse gyrase is the only hyperthermophile-specific protein. *Trends in Genetics* 18(5): 236-237.
- Gardner, W. L. und Whitman, W. B. (1999). Expression vectors for *Methanococcus maripaludis*: overexpression of acetohydroxyacid synthase and beta-galactosidase. *Genetics* 152(4): 1439-1447.
- Garrett, R. A., Redder, P., Greve, B., Brügger, K., Chen, L. und She, Q. (2004). Archaeal Plasmids. In: *Plasmid Biology*. Hrsg.: B. E. Funnell und G. J. Philips. Washington, ASM Press: 377-391.
- Garrity, G. M., Bell, J. und Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. Auflage. New York, Springer Verlag. doi: 10.1007/bergeysoutline.
- Genco, I., Gliozzi, A., Relini, A., Robello, M. und Scalas, E. (1993). Electroporation in symmetric and asymmetric membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1149: 11-18.
- Goryshin, I. Y. und Reznikoff, W. S. (1998). Tn5 *in vitro* transposition. *Journal of Biological Chemistry* 13: 7367-7374.
- Greve, B., Jensen, S., Phan, H., Brügger, K., Zillig, W., She, Q. und Garrett, R. A. (2005). Novel RepA-MCM proteins encoded in plasmids pTAU4, pORA1 and pTIK4 from *Sulfolobus neozealandicus*. *Archaea* 1: 319-325.
- Grogan, D. W. (1989). Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *Journal of Bacteriology* 171(12): 6710-6719.
- Grogan, D. W., Palm, P. und Zillig, W. (1990). Isolate B12, which harbours a virus-like element, represents a new species of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*, *Sulfolobus shibatae*, sp. nov. *Archives of Microbiology* 154(6): 594-599.
- Grogan, D. W. (1991a). Selectable mutant phenotypes of the extremely thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology* 173(23): 7725-7727.
- Grogan, D. W. (1991b). Evidence that beta-galactosidase of *Sulfolobus solfataricus* is only one of several activities of a thermostable beta-D-glycosidase. *Applied and Environmental Microbiology* 57(6): 1644-1649.

- Grogan, D. W. und Gunsalus, R. P. (1993). *Sulfolobus acidocaldarius* synthesizes UMP via a standard *de novo* pathway: results of a biochemical-genetic study. *Journal of Bacteriology* 175(5): 1500-1507.
- Grogan, D. W. (1996). Exchange of genetic markers at extremely high temperatures in the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology* 178(11): 3207-3211.
- Grogan, D. W., Carver, G. T. und Drake, J. W. (2001). Genetic fidelity under harsh conditions: analysis of spontaneous mutation in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 98(14): 7928-7933.
- Grogan, D. W. (2003). Cytosine methylation by the *SuaI* restriction-modification system: implications for genetic fidelity in a hyperthermophilic archaeon. *Journal of Bacteriology* 185(15): 4657-4661.
- Hjort, K. und Bernander, R. (2001). Cell cycle regulation in the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Molecular Microbiology* 40(1): 225-234.
- Holmes, M. L. und Dyllal-Smith, M. L. (1990). A plasmid vector with a selectable marker for halophilic archaeobacteria. *Journal of Bacteriology* 172(2): 756-761.
- Holmes, M. L., Nuttall, S. D. und Dyllal-Smith, M. L. (1991). Construction and use of halobacterial shuttle vectors and further studies on *Haloferax* DNA gyrase. *Journal of Bacteriology* 173(12): 3807-3813.
- Holmes, M. L., Pfeifer, F. und Dyllal-Smith, M. L. (1994). Improved shuttle vectors for *Haloferax volcanii* including a dual-resistance plasmid. *Gene* 146(1): 117-121.
- Honda, Y., Sakai, H., Hiasa, H., Tanaka, K., Komano, T. und Bagdasarian, M. (1991). Functional division and reconstruction of a plasmid replication origin: molecular dissection of the oriV of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 88(1): 179-183.
- Huber, H. und Stetter, K.-O. (1991). *Sulfolobus metallicus* sp. nov., a novel strictly chemolithotrophic thermophilic archaeal species of metal metabolizers. *Systematic and Applied Microbiology* 14: 372-378.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C. und Stetter, K. O. (2002). A new phylum of archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417: 63-67.
- Huber, H. and Prangishvili, D. (2006). Sulfolobales. In: *Prokaryotes*. Hrsg.: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer und E. Stackebrandt. New York, Springer Verlag: 23-51.
- Jacobs, K. L. und Grogan, D. W. (1997). Rates of spontaneous mutation in an archaeon from geothermal environments. *Journal of Bacteriology* 179(10): 3298-3303.
- Jan, R. L., Wu, J., Chaw, S. M., Tsai, C. W. und Tsen, S. D. (1999). A novel species of thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus yangmingensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49(4): 1809-1816.
- Jonuscheit, M., Martusewitsch, E., Stedman, K. M. und Schleper, C. (2003). A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle vector. *Molecular Microbiology* 48(5): 1241-1252.
- Karner, M. B., DeLong, E. F. und Karl, D. M. (2001). Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409: 507-510.
- Keeling, P. J., Klenk, H.-P., Singh, R. K., Feeley, O., Schleper, C., Zillig, W., Doolittle, W. F. und Sensen, C. W. (1996). Complete nucleotide sequence of the *Sulfolobus islandicus* multicopy plasmid pRN1. *Plasmid* 35: 141-144.
- Keeling, P. J., Klenk, H.-P., Singh, R. K., Schenk, M. E., Sensen, C. W., Zillig, W. und Doolittle, W. F. (1998). *Sulfolobus islandicus* plasmids pRN1 and pRN2 share distant but common evolutionary ancestry. *Extremophiles* 2: 391-393.
- Kelman, Z. und White, M. F. (2005) Archaeal DNA replication and repair. *Current Opinion in Microbiology* 8(6): 669-676.
- Kletzin, A., Lieke, A., Urich, T., Charlebois, R. L. und Sensen, C. W. (1999). Molecular Analysis of pDL10 from *Acidianus ambivalens* reveals a family of related plasmids from extremely thermophilic and acidophilic Archaea. *Genetics* 152: 1307-1314.

- Koch, A. L. (1982). Mutation and growth rates from Luria-Delbrück fluctuation tests. *Mutation Research* 95: 129-143.
- Kondo, S., Yamagishi, A. und Oshima, T. (1991). Positive selection for uracil auxotrophs of the sulfur-dependent thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* by use of 5-fluoroorotic acid. *Journal of Bacteriology* 173(23): 7698-7700.
- Kurosawa, N. und Grogan, D. W. (2005). Homologous recombination of exogenous DNA with the *Sulfolobus acidocaldarius* genome: properties and uses. *FEMS Microbiology Letters* 253(1): 141-149.
- Langer, D., Hain, J., Thuriaux, P. und Zillig, W. (1995). Transcription in archaea: similarity to that in eukarya. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92: 5768-5772.
- Lea, D. E. und Coulson, C. A. (1949). The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *Journal of Genetics* 49: 264-285.
- Leininger, S., Ulrich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C. und Schleper, C. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soil. *Nature* 442: 806-809.
- Lewendon, A., Murray, I. A., Kleanthous, C., Cullis, P. M. und Shaw, W. V. (1988). Substitutions in the active site of the chloramphenicol acetyl transferase: role of a conserved aspartate. *Biochemistry* 27: 7385-7390.
- Lipps, G., Stegert, M. und Krauss, G. (2001a). Thermostable and site-specific DNA binding of the gene product ORF56 from the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1, a putative archaeal plasmid copy control protein. *Nucleic Acids Research* 29(4): 904-913.
- Lipps, G., Ibanez, P., Stroessenreuther, T., Hekimian, K. und Krauss, G. (2001b). The protein ORF80 from the acidophilic and thermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* binds highly site-specifically to double-stranded DNA and represents a novel type of basic leucine zipper protein. *Nucleic Acids Research* 29(24): 4973-4982.
- Lipps, G., Röther, S., Hart, C. und Krauss, G. (2003). A novel type of replicative enzyme harboring ATPase, primase and DNA polymerase activity. *EMBO Journal*. 22: 2516-2525.
- Lipps, G. (2004). The replication protein of the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1. *Biochemical Society Transactions* 32(2): 240-243.
- Lipps, G., Weinzierl, A. O., von Scheven, G., Buchen, C. und Cramer, P. (2004). Structure of a bifunctional DNA primase-polymerase. *Nature Structural & Molecular Biology* 11(2): 157-162.
- Lipps, G. (2006) Plasmids and viruses of the thermoacidophilic crenarchaeote *Sulfolobus*. *Extremophiles* 10: 17-28.
- Littlefield, O., Korkhin, Y. und Sigler, P. B. (1999). The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96(24): 13668-13673.
- Londei, P. (2005). Evolution of translational initiation: new insights from the archaea. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 185-200.
- López-García, P. und Forterre, P. (2000). DNA topology and the thermal stress response, a tale from mesophiles and hyperthermophiles. *BioEssays* 22: 738-746.
- Lubelska, J. M., Jonuscheit, M., Schleper, C., Albers, S. V. und Driessen, A. J. (2006). Regulation of expression of the arabinose and glucose transporter genes in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* 10(5): 383-391.
- Lucas, S., Toffin, L., Zivanovic, Y., Charlier, D., Moussard, H., Forterre, P., Prieur, D. und Erauso, G. (2002). Construction of a shuttle vector for, and spheroplast transformation of, the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(1): 2258-5536.
- Lundgren, M. und Bernander, R. (2005). Archaeal cell cycle progress. *Current Opinion in Microbiology* 8: 662-668.
- Lundgren, M. (2007). Genome-wide transcription map of an archaeal cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 104(8): 2939-2944.
- Luria, S. E. und Delbrück, M. (1943). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28: 491-511.

- Lysetskaya, M., Zettl, H., Oka, I., Lipps, G., Krauss, G. und Krausch, G. (2005). Site-specific binding of the 9.5 kilodalton DNA-binding protein ORF80 visualized by atomic force microscopy. *Biomacromolecules* 6(3): 1252-1257.
- Mackay, D. T., Botting, C. H., Taylor, G. L. und White, M. F. (2007). An acetylase with relaxed specificity catalyses protein N-terminal acetylation in *Sulfolobus solfataricus*. *Molecular Microbiology* 64(6): 1540-1548.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. und Parker, J. (2001). *Brock Mikrobiologie*. Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Martusewitsch, E., Sensen, C. W. und Schleper, C. (2000). High spontaneous mutation rate in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by transposable elements. *Journal of Bacteriology* 182(9): 2574-2581.
- Matsumi, R., Manabe, K., Fukui, T., Atomi, H. und Imanaka, T. (2007). Disruption of a sugar transporter gene cluster in a hyperthermophilic archaeon using a host/marker system based on antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology* 189(79): 2683-2691.
- Moll, R. und Schäfer, G. (1988). Chemiosmotic H⁺ cycling across the plasma membrane of the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Letters* 232(2): 359-363.
- Muskhelishvili, G., Palm, P. und Zillig, W. (1993) SSV1-encoded site-specific recombination system in *Sulfolobus shibatae*. *Molecular Genomics and Genetics* 237(3): 334-342.
- Nadal, M., Jaxel, C., Portemer, C., Forterre, P., Mirambeau, G. und Duguet, M. (1988). Reverse gyrase of *Sulfolobus*: purification to homogeneity and characterization. *Biochemistry* 27(26): 9102-9108.
- Nakamura, A., Takakura, Y., Kobayashi, H. und Hoshino, T. (2005). *In vivo* directed evolution for thermostabilization of *Escherichia coli* hygromycin B phosphotransferase and the use of the gene as a selection marker in the host-vector system of *Thermus thermophilus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100(2): 158-163.
- Nieuwlandt, D. T. und Daniels, C. J. (1990). An expression vector for the archaeobacterium *Haloferax volcanii*. *Journal of Bacteriology* 172(12): 7104-7110.
- Norais, C., Hawkins, M., Hartmann, A. L., Eisen, J. A., Myllykallio, H. und Allers, T. (2007). Genetic and physical mapping of DNA replication origins in *Haloferax volcanii*. *PLoS Genetics* 3(5): e77. doi:10.1371/journal.pgen.0030077.eor.
- Olsen, G. J. (1994). Microbial ecology. Archaea, archaea, everywhere. *Nature* 371: 657-658.
- Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740.
- Peng, X., Holz, I., Zillig, W., Garrett, R. A. und She, Q. (2000). Evolution of the family of pRN plasmids and their integrase-mediated insertion into the chromosome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Molecular Biology* 303: 449-454.
- Peng, X., Kessler, A., Phan, H., Garrett, R. A. und Prangishvili, D. (2004). Multiple variants of the archaeal DNA rudivirus SIRV1 in a single host and a novel mechanism of genomic variation. *Molecular Microbiology* 54(2): 366-375.
- Pisani, F. M., Rella, R., Raia, C. A., Rozzo, C., Nucci, R., Gambacorta, A., De Rosa, M. und Rossi, M. (1990). Thermostable beta-galactosidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. Purification and properties. *European Journal of Biochemistry* 187(2): 321-328.
- Prangishvili, D. A., Vashakidze, R. P., Chelidze, M. G. und Gabriadze, I. Y. (1985). A restriction endonuclease *SuaI* from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEBS Letters* 192(1): 57-60.
- Prangishvili, D. und Garrett, R. A. (2005). Viruses of hyperthermophilic crenarchaea. *Trends in Microbiology* 13(11): 535-542.
- Prato, S., Cannio, R., Klenk, H.-P., Contursi, P., Rossi, M. und Bartolucci, S. (2006). pIT3, a cryptic plasmid isolated from the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* IT3. *Plasmid* 56(1): 35-45.
- Prüschenk, R., Baumeister, W. und Zillig, W. (1987). Surface structure variants in different species of *Sulfolobus*. *FEMS Microbiology Letters* 43: 327-330.

- Purschke, W. G. und Schäfer, G. (2001). Independent replication of the plasmids pRN1 and pRN2 in the archaeon *Sulfolobus islandicus*. FEMS Microbiology Letters 200: 97-102.
- Qureshi, S. A., Bell, S. D. und Jackson, S. P. (1997). Factor requirements for transcription in the archaeon *Sulfolobus shibatae*. EMBO Journal 16(10): 2927-2936.
- Redder, P. und Garrett, R. A. (2006). Mutations and rearrangements in the genome of *Sulfolobus solfataricus* P2. Journal of Bacteriology 188(12): 4198-4206.
- Reilly, M. S. und Grogan, D. W. (2001). Characterization of intragenic recombination in a hyperthermophilic archaeon via conjugational DNA exchange. Journal of Bacteriology 183(9): 2943-2946.
- Reiter, W. D., Palm, P. und Zillig, W. (1988). Analysis of transcription in the archaeobacterium *Sulfolobus* indicates that archaeobacterial promoters are homologous to eukaryotic Pol II promoters. Nucleic Acids Research 16(1): 1-19.
- Reiter, W.-D., Hüdepohl, U. und Zillig, W. (1990). Mutational analysis of an archaeobacterial promoter: essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection *in vitro*. Proceedings of the National Academy of Science USA 87: 9505-9513.
- Reznikoff, W. S. (2003). Tn5 as a model for understanding DNA transposition. Molecular Microbiology 47(5): 1199-1206.
- Robinson, N. P. und Bell, S. D. (2007). Extrachromosomal element capture and the evolution of multiple replication origins in archaeal chromosomes. Proceedings of the National Academy of Science USA 104(14): 5806-5811.
- Robinson, N., Dionne, I., Lundgren, M., Marsh, V. L., Bernander, R. und Bell, S. D. (2004). Identification of two origins of replication in the single chromosome of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Cell 116: 25-38.
- Sanz, J. L., Huber, G., Huber, H. und Amils, R. (1994). Using protein synthesis inhibitors to establish the phylogenetic relationships of the Sulfolobales order. Journal of Molecular Evolution 39: 528-532.
- Sartorius-Neef, S. und Pfeifer, F. (2004). *In vivo* studies on putative Shine-Dalgarno sequences of the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*. Molecular Microbiology 51(2): 579-588.
- Sato, T., Fukui, T., Atomi, H. und Imanaka, T. (2005). Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. Applied and Environmental Microbiology 71(7): 3889-3899.
- Schelert, J., Dixit, V., Hoang, V., Simbahan, J., Drozda, M. und Blum, P. (2004). Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* by use of gene disruption. Journal of Bacteriology 186(2): 427-437.
- Scherzinger, E., Haring, V., Lurz, R. und Otto, S. (1991). Plasmid RSF1010 DNA replication *in vitro* promoted by purified RSF1010 RepA, RepB and RepC proteins. Nucleic Acids Research 19(6): 1203-1211.
- Schleper, C., Kubo, K. und Zillig, W. (1992). The particle SSV1 from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* is a virus: demonstration of infectivity and of transfection with the viral DNA. Proceedings of the National Academy of Science USA 89: 7645-7649.
- Schleper, C., Roder, R., Singer, T. und Zillig, W. (1994). An insertion element of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* transposes into the endogenous beta-galactosidase gene. Molecular Genomics and Genetics 243(1): 91-96.
- She, Q., Peng, X., Zillig, W. und Garrett, R. A. (2001). Gene capture in archaeal chromosomes. Nature 409: 478.
- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P. M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A. C., Kozera, C. J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H. P., Redder, P., Schenk, M. E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R. A., Ragan, M. A., Sensen, C. W. und van der Oost, J. (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. Proceedings of the National Academy of Science USA 98(14): 7835-7840.

- Stedman, K. M., Schleper, C., Rumpf, E. und Zillig, W. (1999). Genetic requirements for the function of the archaeal virus SSV1 in *Sulfolobus solfataricus*: construction and testing of a viral shuttle vector. *Genetics* 152: 1397-1405.
- Stedman, K. M., She, Q., Phan, H., Holz, I., Singh, H., Prangishvili, D., Garrett, R. A. und Zillig, W. (2000). pING family of conjugative plasmids from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus*: insights into recombination and conjugation in crenarchaeota. *Journal of Bacteriology* 182(24): 7014-7020.
- Stein, J. L. und Simon, M. I. (1996). Archaeal ubiquity. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93(13): 6228-6230.
- Stetter, K.-O. (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters* 452: 22-25.
- Strößenreuther, T. (2003). Analyse der Transkription und Translation des archaealen Plasmides pRN1. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie II, Universität Bayreuth, Universitätsstr. 30, 95447 Bayreuth.
- Suzuki, S. (2002). *Sulfolobus tokodaii* sp. nov. (f. *Sulfolobus* sp. strain 7), a new member of the genus *Sulfolobus* isolated from Beppu Hot Springs, Japan. *Extremophiles* 6(1): 39-44.
- Thia-Thoong, T.-L., Roovers, M., Durbecq, V., Gigot, D., Glansdorf, N. und Charlier, D. (2002). Genes of *de novo* pyrimidine biosynthesis from the hyperthermophilic crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius*: novel organization in a bipolar operon. *Journal of Bacteriology* 184(16): 4430-4441.
- Tolstrup, N., Sensen, C. W., Garrett, R. A. und Clausen, I. G. (2000). Two different and highly organized mechanisms of translation initiation in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* 4: 175-179.
- Torarinsson, E., Klenk, H.-P. und Garrett, R. A. (2005). Divergent transcriptional and translational signals in archaea. *Environmental Microbiology* 7(1): 47-54.
- Tornabene, T. G. und Langworthy, T. A. (1979). Diphytanyl and dibiphytanyl glycerol ether lipids of methanogenic archaeobacteria. *Science* 203: 51-53.
- Tumbula, D. L., Bowen, T. L. und Whitman, W. B. (1997). Characterization of pURB500 from the archaeon *Methanococcus maripaludis* and construction of a shuttle vector. *Journal of Bacteriology* 179(9): 2976-2986.
- Vierke, G., Engelmann, A., Hebbeln, C. und Thomm, M. (2003). A novel archaeal transcriptional regulator of heat-shock response. *Journal of Biological Chemistry* 278(1): 18-26.
- Weiss, R. L. (1974). Subunit cell wall of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology* 118(1): 275-284.
- Wendoloski, D., Ferrer, C. und Dyll-Smith, M. L. (2001). A new simvastatin (mevinolin)-resistance marker from *Haloarcula hispanica* and a new *Haloferax volcanii* strain cured of plasmid pHV2. *Microbiology* 174: 959-964.
- Wiedenheft, B., Mosolf, J., Willits, D., Yeager, M., Dryden, K. A., Young, M. und Douglas, T. (2005). An archaeal antioxidant: characterization of a Dps-like protein from *Sulfolobus solfataricus*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102(30): 10551-10556.
- Woese, C. und Fox, G. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74(11): 5088-5090.
- Woese, C., Kandler, O. und Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 87(12): 4576-4579.
- Worthington, P., Hoang, V., Perez-Pomares, F. und Blum, P. (2003). Targeted disruption of the alpha-amylase gene in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology* 185(2): 482-488.
- Xiang, X., Dong, X. und Huang, L. (2003). *Sulfolobus tengchongensis* sp. nov., a novel thermoacidophilic archaeon isolated from a hot spring in Tengchong, China. *Extremophiles* 7(6): 493-498.
- Yeats, S., McWilliam, P. und Zillig, W. (1982). A plasmid in the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *EMBO Journal* 1(9): 1035-1038.

- Zhou, M., Bhasin, A. und Reznikoff, W. S. (1998). Molecular genetic analysis of transposase-end DNA sequence recognition: cooperativity of three adjacent base-pairs in specific interactions with a mutant Tn5 transposase. *Journal of Molecular Biology* 276: 913-925.
- Zillig, W., Stetter, K. O., Wunderl, S., Schulz, W., Priess, H. und Scholz, I. (1980). The *Sulfolobus*-*Caldariella* group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. *Archives of Microbiology* 125: 259-269.
- Zillig, W., Kletzin, A., Schleper, C., Holz, I., Janekovic, D., Hain, J., Lanzendörfer, M. und Kristiansson, J. K. (1994). Screening for Sulfolobales, their plasmids, and their viruses in Icelandic solfataras. *Systematic and Applied Microbiology* 16: 606-628.
- Zillig, W., Prangishvili, D., Schleper, C., Elferink, M. G. L., Holz, I., Albers, S., Janekovic, D. und Götz, D. (1996). Viruses, plasmids and other genetic elements of thermophilic and hyperthermophilic archaea. *FEMS Microbiology Reviews* 18: 225-236.

5 Publikationsliste

Teilarbeit A

Silvia Berkner und Georg Lipps.

Characterization of the transcriptional activity of the cryptic plasmid pRN1 from *Sulfolobus islandicus* REN1H1 and regulation of its replication operon.

Journal of Bacteriology, 189, 1711-1721 (2007).

Teilarbeit B

Stefan Söllner, Silvia Berkner und Georg Lipps.

Characterisation of the novel restriction endonuclease *SuiI* from *Sulfolobus islandicus*.

Extremophiles, 10, 629-634 (2006).

Teilarbeit C

Silvia Berkner und Georg Lipps.

An active nonautonomous mobile element in *Sulfolobus islandicus* REN1H1.

Journal of Bacteriology, 189, 2145-2149 (2007).

Teilarbeit D

Silvia Berkner, Dennis Grogan, Sonja-Verena Albers und Georg Lipps.

Small multicopy, non-integrative shuttle vectors based on the plasmid pRN1 for *Sulfolobus acidocaldarius* and *Sulfolobus solfataricus*, model organisms of the (cren-)archaea.

Nucleic Acids Research, doi:10.1093/nar/gkm449, 1-12 (2007).

Teilarbeit E

Silvia Berkner und Georg Lipps.

Mutation and reversion frequencies of different *Sulfolobus* species and strains.

(Manuskript in Vorbereitung).

Publikation, die nicht Teil dieser Arbeit ist:

Silvia Berkner und Georg Lipps.

Archaeal Plasmid Vector System.

Anmeldung zum Europäischen Patent (EP07009507) vom 11.05.2007 durch die Universität Bayreuth.

6 Darstellung des Eigenanteils

Teilarbeit A:

Die Ergebnisse wurden von mir erarbeitet. Die Publikation wurde von Georg Lipps und mir verfasst.

Teilarbeit B:

Die Ergebnisse wurden von Stefan Söllner im Rahmen seines Vertiefungspraktikums und mir erarbeitet. Die Publikation wurde von Georg Lipps und mir verfasst.

Teilarbeit C:

Die Ergebnisse wurden von mir erarbeitet. Die Publikation wurde von Georg Lipps und mir verfasst.

Teilarbeit D:

Alle Ergebnisse außer zur Vektorretention unter nicht selektiven Bedingungen (Abbildung 3C) wurden von mir erarbeitet. Die Experimente zur Retention der Shuttle-Vektoren unter nicht selektiven Bedingungen wurden von Dennis Grogan durchgeführt. Zur Validierung der Shuttle-Vektoren wurde ihre Funktion in *S. acidocaldarius* durch Dennis Grogan und in *S. solfataricus* durch Sonja Albers in unabhängigen Transformationsexperimenten bestätigt. Transformations-effizienzen in der Publikation beziehen sich auf die kombinierten Daten von Dennis Grogan und mir. Die Publikation wurde von Georg Lipps, Dennis Grogan und mir verfasst.

Teilarbeit E:

Die Ergebnisse wurden von mir erarbeitet. Die Publikation wurde von Georg Lipps und mir verfasst.

7 Teilarbeiten

7.1 Teilarbeit A

Silvia Berkner und Georg Lipps.

Characterization of the transcriptional activity of the cryptic plasmid pRN1 from *Sulfolobus islandicus* REN1H1 and regulation of its replication operon.

Journal of Bacteriology, 189, 1711-1721 (2007).

Characterization of the Transcriptional Activity of the Cryptic Plasmid pRN1 from *Sulfolobus islandicus* REN1H1 and Regulation of Its Replication Operon^{∇†}

Silvia Berkner and Georg Lipps*

Department of Biochemistry, University of Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany

Received 12 October 2006/Accepted 7 December 2006

The plasmid pRN1 from *Sulfolobus islandicus* REN1H1 belongs to the crenarchaeal plasmid family pRN. The plasmids in this family encode three conserved proteins that participate in plasmid replication and copy number regulation, as suggested by biochemical characterization of the recombinant proteins. In order to deepen our understanding of the molecular biology of these plasmids, we investigated the transcriptional activity of the model plasmid pRN1. We detected five major transcripts present at about 2 to 15 copies per cell. One long transcriptional unit comprises the genes for the plasmid-copy-number control protein Orf56/CopG and the replication protein Orf904. A second transcript with a long 3'-untranslated region codes for the DNA binding protein Orf80. For both transcripts, we identified countertranscripts which could play a regulatory role. The function of the fifth transcript is unclear. For the five transcripts, we determined the start site, the transcript end, the stability, and the abundance in different growth phases. Reporter gene experiments demonstrated that the copy number control protein Orf56 represses transcription of the *orf56-orf904* cotranscript in vivo.

The plasmid pRN1 (5,350 bp) has been isolated from *Sulfolobus islandicus* strain REN1H1 (47) and occurs natively together with plasmid pRN2 in its host strain but has been shown to replicate independently of pRN2 (36). It is a member of the pRN family of genetic elements, comprising pRN1, pRN2, pDL10, pHEN7, and pSSVx (3, 22, 23, 25, 34). The more recently described plasmids pTIK4, pTAU4, pORA1 (18), and pIT3 (35) also contain open reading frames with sequence similarity to open reading frames from the pRN family plasmids. The sequence of pRN1 has been determined (22), and six open reading frames have been identified. Keeling et al. also tentatively assigned functions to two of the encoded proteins based on sequence similarities to characterized proteins. Knowledge of the encoded proteins was substantially increased by the heterologous overexpression and functional as well as structural characterization of the proteins Orf56 (26), Orf80 (27), and Orf904 (28, 29). A model for the replication of pRN1 has been proposed (30), as follows. Orf56, a putative repressor protein, binds as a tetramer to an inverted repeat upstream of its own gene. If *orf56* and *orf904* are cotranscribed, the tetramer would downregulate the expression of both genes and thus control replication initiation. Orf904, a multifunctional replication protein, could melt the replication origin and then synthesize a primer to start the replication of pRN1. The role of Orf80, a sequence-specific DNA binding protein, is still unclear. Orf80 seems to play an important role in plasmid replication or maintenance, as highly conserved homologs

were found to be encoded by almost all *Sulfolobus* plasmids sequenced so far (17), and also, putative binding sites for Orf80 are present on several plasmids (31).

The regulation of plasmid copy number has been studied in detail for different bacterial plasmid families. Orf56 shows sequence similarity to CopG, a protein involved in copy number control of the bacterial plasmid pLS1 from the pMV158 family. CopG has been shown to bind to a 13-bp inverted repeat in the common promoter region (−35 box) of the *copG-repB* operon and to repress its own synthesis and that of the replication protein RepB (15). Additionally, an antisense RNA is needed as a regulatory element in pLS1. RNAII acts as a translational repressor by binding to the ribosome binding site of the *repB* mRNA (10, 13, 14).

Because of its small size, its stable maintenance in *Sulfolobus* cells without integrating into the host genome, and the fact that it does not cause any growth retardation, the multicopy plasmid pRN1 is well suited as a backbone for the construction of *Sulfolobus*-*Escherichia coli* shuttle vectors. However, up to now, information on this plasmid has been limited to bioinformatic analysis and protein function analysis. There is currently no experimental evidence on the mode of replication of pRN1, on a putative origin, or on a minimal replicon. The analysis of the transcripts of this plasmid will help to understand pRN1 in more detail and will perhaps also be useful for finding suitable interruption sites for the insertion of an *E. coli* replicon for the construction of a *Sulfolobus*-*E. coli* shuttle vector.

MATERIALS AND METHODS

Strains and culture conditions. *Sulfolobus islandicus* REN1H1 with plasmids pRN1 and pRN2 (47) was grown in Brock's medium (20) with 0.1% tryptone (BD Biosciences), 0.2% D-arabinose (Fluka), and a vitamin solution (46) in 50-ml shake flask cultures. For larger culture volumes (1.5-liter fermenter), a rich medium (36) was used. *Sulfolobus solfataricus* PH1-16 (33) as well as the parent

* Corresponding author. Mailing address: Department of Biochemistry, University of Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany. Phone: 49-921-552433. Fax: 49-921-552432. E-mail: georg.lipps@uni-bayreuth.de.

† Supplemental material for this article may be found at <http://jbb.asm.org/>.

∇ Published ahead of print on 15 December 2006.

strain *Sulfolobus solfataricus* P1 was grown in Brock's medium with 0.1% tryptone and 0.2% arabinose, with or without $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ uracil.

RNA preparation. RNAs were prepared by a Trizol method using RNAgents (Promega). RNA preparations were digested with DNase I (Roche) at room temperature for 30 min and subsequently column purified (RNeasy Mini kit; QIAGEN). This combination yielded the best reproducibility of parallel RNA preparations (coefficient of variation of RNA concentrations, 13% [$n = 4$]). A crucial problem in the preparation of RNAs from plasmid-containing *Sulfolobus* cells is the large amount of plasmid copurifying in the first step of purification (Trizol method). This amount is reduced by the DNase treatment, but there is still a very low level of residual DNA contamination that cannot be eliminated even by a second DNase digestion at 37°C. Since the second DNase digestion step increases the variability in parallel preparations and does not yield DNA-free RNA preparations, only one DNase digestion step was performed. The residual DNA does not interfere with quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) measurements because the level of DNA molecules compared to cDNA molecules is lower by several orders of magnitude. Nevertheless, a specific PCR product was sometimes also detected in control reactions containing only RNA without the RT step, but at considerably higher threshold cycle (C_T) values than in the corresponding samples.

Reverse transcription. Reverse transcription was performed using Transcriptor reverse transcriptase (Roche) at 55°C to reduce the influence of secondary structures. Initially, an RNase inhibitor (Roche) was added to the RT reactions, but it was subsequently left out because it showed an inhibitory effect on the qPCR when the RT product was used at a 25-fold dilution in the qPCR reaction mix. The inhibition could be circumvented by using a 250-fold dilution, which was commonly used for all sample quantifications.

The influence of the input amount of RNA on the transcribed cDNA amount was tested in the range of 0.5 μg to 5 μg of RNA and found to be linear in that range, allowing the use of different input amounts of RNA.

qRT-PCR. qRT-PCRs were carried out in 96-well plates (25- μl volume) with an ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems). SYBR green real-time PCR master mix (Epicenter) was used according to the instructions of the manufacturer, using ROX dye for signal normalization. The master mix and primers were premixed and dispensed into a 96-well plate, and appropriate dilutions of standards, controls, and samples were added. Primers (Metabion, Martinsried, Germany) were used at a concentration of 500 nM. An example of qRT-PCR results is shown in Fig. 1.

Primer design. Primers were designed using the program VectorNTI (Invitrogen). Several different primers were tested for their efficiency, and the best results were obtained with a primer length of around 30 nucleotides (nt), producing a product of about 150 bp. Since the GC content and the distribution of repetitive sequences change within the sequence of plasmid pRN1, it was not always possible to optimize every PCR to an efficiency of over 90%. The short open reading frames did not leave much space for alternative primer binding sites. To avoid any cross-hybridization with pRN2 present in the samples, all primers were checked to not have high sequence similarity to pRN2. In addition, PCRs performed on the pRN2 plasmid alone did not yield a product.

Standards and calibration. Standards were prepared from plasmid pUCpRN1, the pRN1 part was cut out, and the fragment was purified by agarose gel electrophoresis and extracted using the Wizard SV gel and PCR cleanup system (Promega). The concentration of the fragment was determined photometrically, and a stock dilution containing 10^9 molecules per μl was prepared and stored at -20°C. Fresh dilutions were prepared for every measuring period at concentrations ranging from $10^{8.5}$ to $10^{3.5}$ molecules per μl , yielding final standard concentrations after dilution into the well plate of $10^{7.5}$ to $10^{2.5}$ molecules per μl . For other target genes, similarly purified fragments were used.

Sample analysis was always accompanied by measurements of standards for calibration purposes. The C_T values for standards were plotted against the logarithms of the numbers of molecules per μl contained in the standards, and the calibration function was derived.

Accuracy, precision, and reproducibility. The accuracy of the developed method is difficult to assess with original samples, as the amount of a target RNA cannot be known. To quantify the recovery of a transcript after the RNA purification and reverse transcription steps, an in vitro-transcribed RNA was spiked in three parallels into three *Sulfolobus* cell pellets, and subsequently, the RNA was prepared, reverse transcribed, and quantified. To obtain the test RNA, a 300-bp fragment of the kanamycin resistance gene from *E. coli* was cloned into pGEM-T (Promega) and transcribed using T7 RNA polymerase (AmpliScribe high-yield transcription kit; Epicenter). The resulting transcript was checked for integrity on an agarose gel, and the concentration was determined photometrically. The recovery of the spiked transcript was determined to be 60%, and the precision for the three parallels was 6% (coefficient of variation).

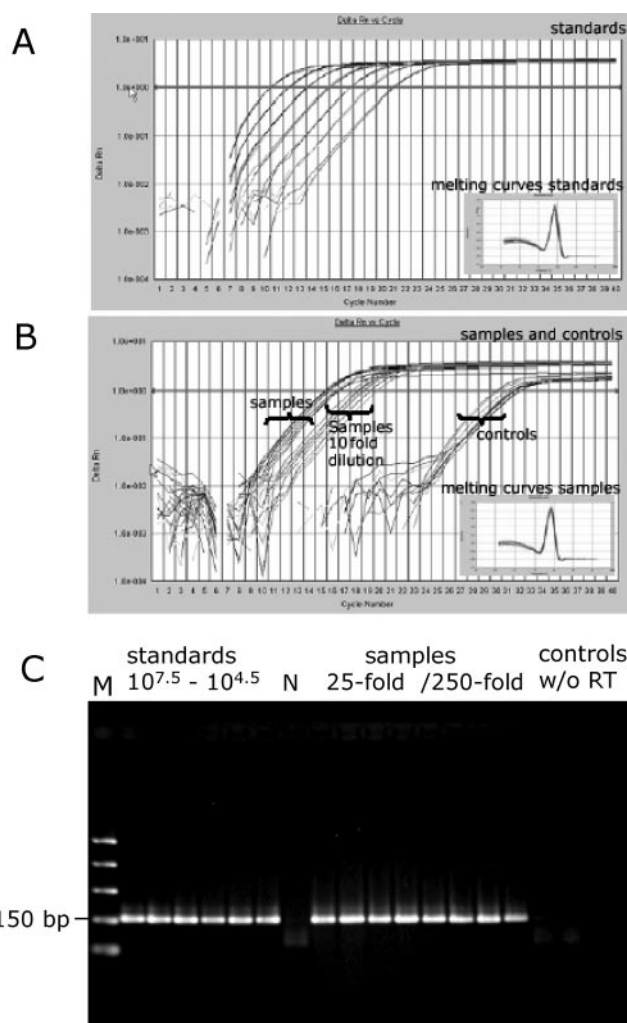


FIG. 1. Example of a qRT-PCR experiment. Standards, samples, and controls for the primer pair RT3_o56_for/rev (length of PCR product, 158 bp) were each used in three replicates. (A) Standard concentrations ranged from $10^{7.5}$ molecules μl^{-1} to $10^{4.5}$ molecules μl^{-1} , with spacing of $10^{0.5}$ molecules μl^{-1} . (B) Transcript numbers were measured in four different samples (25-fold dilution and 250-fold dilution) and in four control reactions without RT (25-fold dilution). (C) Corresponding agarose gel analysis of the qRT-PCR products from panels A and B (only one replicate). M, marker; N, no-template control.

The precision of the qPCR step alone, as judged from the three replicates that were measured for every standard concentration for every primer pair, was always in the range of 1%, with the maximum coefficient of variation being 3.5% (Table 1).

The transcript from the spiking experiment is probably much simpler to extract from the cell pellet than are real RNAs. Thus, the coefficient of variation in parallel RNA preparations for four parallel preparations was determined to be 13%. The precision of RNA extraction, reverse transcription, and qPCR was derived from the law of error propagation and was in the range of 14%. Taking into account the additional variability introduced by the normalization of the transcript levels to cell numbers (derived by measuring the optical density [OD] and calculating cell numbers by a function derived from counting cells in a Neubauer counting chamber, with an estimated error of approximately 10%), the precision of the final transcript number per cell was below 20%.

To assess the reproducibility of the procedure, several RNA transcript levels (*orf56*, *orf904*, *orf80*, *orf90a*, *orf72*, *orf90b*, and *orf90a* [4]) were quantified using cell pellets from different fermentations on different days (sampled at ODs of 1.3

TABLE 1. Summary of different qRT-PCRs^a

qRT-PCR primer	Length of product (bp)	Efficiency (%)	Precision (%)	Correlation coefficient (r ²)
RT3_o56	158	91	0.1–1.1	0.999
RT3_o904	150	95	0.2–2.0	1.000
RT3_o80	160	92	0.2–1.9	0.999
RT_o90a	204	73	0.2–1.5	0.999
RT3_72	168	86	0.2–1.2	0.999
RT2_90b	202	66	0.1–1.5	0.999
RT4_o90a	160	78	0.2–1.6	0.998
RT_no80	168	90	0.3–2.4	0.998
RT5_o904	143	96	0.1–3.5	0.994
RT_lacS	160	92	0.3–1.4	0.998
RT_o80prn2	130	80	0.2–0.7	1.000
RT_o90aprn2	177	Qualitative only	Qualitative only	
RT_kan	150	88	0.2–1.7	0.998

^a Data are from measurements of standard curves for 11 equidistant concentrations in three replicates.

to 1.4) that were extracted on different days and quantified using different standard preparations. The reproducibility was determined to be 24% (difference of two determinations divided by the mean).

Plasmid copy number determinations. Plasmid copy number was determined by qPCR as described above (with primers RT3_orf56_for and -rev). Plasmids were prepared by alkaline lysis and diluted 10⁵- to 10⁶-fold for the measurement.

Three independent replicates were sampled and analyzed for each OD. In addition, the qPCR results were found to be consistent with copy number determinations carried out by comparing band intensities of plasmid dilutions on agarose gels.

Adaptor RT-PCR. During reverse transcription, an adaptor primer consisting of 20 nt complementary to the 3' end of the target RNA and a 20-nt adaptor sequence was incorporated into the cDNA molecule. In the subsequent PCR step, only a primer matching the upstream region of the RNA and a primer consisting solely of the adaptor sequence were used, circumventing the false-positive results caused by traces of residual plasmid DNA in the RNA preparations. The adaptor primer (0.5 μM in the RT reaction) was removed after the RT step by purifying the cDNAs with the Wizard SV gel and PCR cleanup system (Promega). Control PCRs without the adaptor sequence primer and without RT were always included. Primer sequences are listed in Table 2, and additional primers used to narrow down the transcript ends can be found in Table S1 in the supplemental material.

Determination of the stability of transcripts. Actinomycin D at 10 μg ml⁻¹ was used to inhibit transcription (8). Aliquots of 10 ml were collected 0 min, 15 min, and 30 min after the addition of actinomycin D from the treated and untreated control cultures.

Primer extension. A primer (0.1 pmol) 5' end labeled with T4 polynucleotide kinase (approximately 150 nCi) and 20 to 50 μg of RNA were used in a reverse transcription reaction according to the protocol of the manufacturer (Transcriptor reverse transcriptase; Roche), using a 10-μl reaction mix. The enzyme was heat inactivated at 85°C for 5 min, and 10 μl of denaturing loading buffer was added. The sequencing reactions run alongside the primer extension reactions were prepared using a T7 sequencing kit (GE Healthcare). The influence of secondary structures, such as stem-loops, on the primer extension reaction was tested using a perfect 8+3 stem-loop structure situated directly downstream of the stop codon of *orf904*. A primer extension reaction in that region did not show

TABLE 2. Primers used for qRT-PCR and adaptor RT-PCR experiments

Primer (forward/reverse) and target	Forward sequence (5'–3') ^a	Reverse sequence (5'–3') ^a
qRT-PCR primers		
<i>orf56</i>		
RT3_o56	CCACAAATGGGTAGACCATACAACTATTAAA	TGATTGTCTAAATACTCTTTAATTGCCAGCCT
<i>orf904</i>		
RT3_o904	CGCCACACAAAATCAATCCTCTCTTTG	TGTAGTTCTGTTCTTTCCACGGGCATT
<i>orf80</i>		
RT3_o80	GGGATCCCATATGAGTGATCTGAAGGA	GCCTTTTTTATGGAGTCGTGTCAAGGT
<i>orf90a</i>		
RT_o90a	TATCGTTTTACCTGATGCGTATAC	TTAAGCAAAAGCCTGAGCAA
<i>orf72</i>		
RT3_72	TACTTTCATTATCTCTTCTTAGCTTTTGTCTC	ATTGTCTAAGATAATCAAAGATTGGGTTAGCA
<i>orf90b</i>		
RT2_90b	ATGCCGACTTCTAACAACTCTTAC	GTTGAGAGTAAGAAACAGAAGCAAA
<i>orf90a</i> plus upstream sequence		
RT4_o90a	CACATGATAAGAGTATAAAATAGGCGTAAAAG	GACGTATACAGTAAAATTTTATGATGCATTGAA
Downstream of <i>orf80</i>		
RT_no80	ACTCCTGTGAAACTCCCCAGTTTACCGTTATTA	ATAGCTGAAAGCCGTACGCTTTTACGCCATT
<i>orf904</i>		
RT5_o904	GAAAAAACAAGAAGAACGGGGTGTACATGAT	GGTCGATTGGGATAATATTAAGCCGTGTTCT
RT_lacS	GGGAACACCAGGGTCAGAAGATCCAACTACTG	TCCCATTTTTTGTGCATTATCGTGAATGTCT
RT_o80prn2	GAATGCATAAGAAGGGGCTGATATATCGTAAA	ATATTTTCAAATGAAAATGAACTCAACAATCA
RT_o90aprn2	TTGTAGGCTGATTGTTGAGTTCATTTTCATTG	TTTCTATGATATCCATATGACTAAGTACGCTG
RT_kan	ACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGC	GGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATA
Adaptor RT-PCR primers		
Adaptor sequence primer		
<i>orf56/904</i>		TAATACGACTCACTATAGGG
RT3o56-for/AA_rev	CCACAAATGGGTAGACCATACAACTATTAAA	TAATACGACTCACTATAGGG TCAATCAAACCGCACGTGCT
<i>orf80</i>		
RT3o80_for/O_rev	GGGATCCCATATGAGTGATCTGAAGGA	TAATACGACTCACTATAGGG AAGGGAGCGTGAAAAATAG
cto904		
U_for/RT3_o904_rev	TAATACGACTCACTATAGGG GACAGATTAATGGAAATCGC	TGTAGTTCTCTTCTTTCCACGGGCATT
cto90a		
V_for/RT_o90a_rev	TAATACGACTCACTATAGGG ATCTTGTCAAACCC TGGAAG	TTAAGCAAAAGCCTGAGCAA
cto90b		
J_for/RT2_o90b_rev	TAATACGACTCACTATAGGG CTTTGATTATCTTA GACAAT	GTTGAGAGTAAGAAACAGAAGCAAA

^a For the adaptor RT-PCR primers, the adaptor primer sequence is separated by a vertical line from the plasmid complementary sequence.

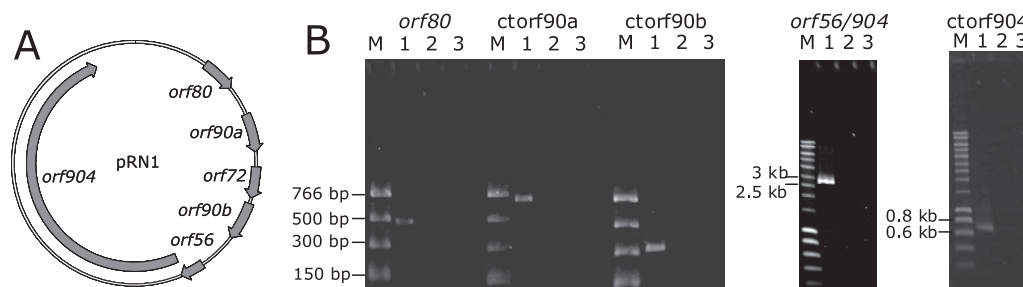


FIG. 2. (A) Map of pRN1 with open reading frames. (B) Adaptor RT-PCR (see Materials and Methods) using the last primer yielding a PCR product and a primer next to the mapped transcription start site. Lanes M, marker; lanes 1, adaptor RT-PCR; lanes 2, control without the adaptor primer; lanes 3, control without RT. The lengths of the PCR products and the exact locations of the transcript ends are listed in Table 3.

any sign of impairment by this stem-loop (results not shown); thus, secondary structures are unlikely to cause false termination bands. Another test was conducted to exclude the possibility that residual DNA could cause additional bands. A primer extension reaction with RNA without DNase I treatment showed exactly the same bands as those obtained with DNase I-digested RNA.

Plasmid construction. The promoter region of *orf56* and an upstream sequence (positions 1892 to 2162 in pRN1 [accession number NC_01771]) were PCR amplified using primers 5'-TCCTAGGCTAAGCCCGCCCTGCTAAC and 5'-CCATGGGTGGATCAAAATTGTATCCGC, introducing an *AvrII* site with the forward primer and an *NcoI* site with the reverse primer (underlined). The same promoter region plus the *orf56* coding sequence (positions 1892 to 2382 in pRN1) was PCR amplified using the same forward primer and 5'-CCA TGGACACCCCGTCTTCTTG as the reverse primer. Fragments were cloned into pGEM-T (Promega) and checked by sequencing. The inserts were cut out using the introduced *AvrII* and *NcoI* sites and then ligated into the preassembling vector pSVA10 (S. V. Albers and M. Jonuscheit, unpublished data) cut with the same enzymes, thus replacing the *tf55 α* promoter region of pSVA10 with the *orf56* promoter region or the promoter region plus the *orf56* coding sequence. From these preassembly constructs, the promoter regions, together with the *lacS* reporter gene sequence, were cut out using *BlnI* and *EagI* and ligated into pMJ05 (1), yielding pProm and pPromOrf56.

Transformation of *Sulfolobus* cells. Conditions for the transformation of cells by electroporation followed the protocol of Schleper et al. (40), as specified in the work of Jonuscheit et al. (21).

Southern blots. Single transformants of *S. solfataricus* PH1-16 containing the reporter gene constructs were tested for the presence and copy number of free and integrated forms of the shuttle vector by Southern blotting. Genomic DNA was prepared from 1 ml of a logarithmically growing culture, using a Chemagenic DNA Bacteria kit (Chemagen, Baesweiler, Germany) according to the instructions of the manufacturer. After *PvuII* digestion, the fragments were separated in a 0.8% agarose gel, transferred to a Hybond N membrane (Amersham) by capillary transfer, fixed by UV irradiation for 5 min on a UV transilluminator, and hybridized to two digoxigenin-labeled probes complementary to positions 2580 to 3432 and 7455 to 7893 of *Sulfolobus shibatae* virus 1 (SSV1) (accession number NC_001338.1), indicating either the integrated or the free form of the shuttle vector construct. Labeling and detection were done using a PCR DIG probe synthesis kit and a digoxigenin labeling and detection kit (Roche).

β -Galactosidase assay. β -Galactosidase activity was measured from crude extracts prepared by a freeze-thaw method (21). Cells from a logarithmically growing culture were resuspended in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7, and subjected to five freeze-thaw cycles ($-196^{\circ}\text{C}/+50^{\circ}\text{C}$). After centrifugation for 30 min at 10,000 rpm, the supernatant was stored at -20°C or assayed directly. All β -galactosidase assays were conducted in triplicate in a 75 $^{\circ}\text{C}$ bench-top shaker. The reaction mix consisted of 3 μl of crude extract (or water for blanks) and 90 μl of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7, and the reaction was started by the addition of 7 μl of 12-mg ml^{-1} *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside solution. Incubation was continued for 5 min before the tubes were cooled rapidly on ice, and 100 μl of 1 M Na_2CO_3 solution was added to stop the reaction. The concentration of *o*-nitrophenol was subsequently determined in a 96-well plate in a plate reader at 410 nm, using a standard curve generated with *o*-nitrophenol. The protein concentrations in the crude extracts were determined by the method of Ehresmann et al. (16).

RESULTS

Transcribed regions of plasmid pRN1. To determine which open reading frames of pRN1 (Fig. 2A) are transcribed, qRT-PCR was used because of its ability to reliably detect and quantify even transcripts of low abundance not reliably detectable in Northern blots.

For all six open reading frames identified on pRN1, primer pairs were designed (Table 2). qRT-PCRs performed on RNA preparations from cells in different growth phases showed that *orf56*, *orf904*, and *orf80* were transcribed at more than one copy per cell, whereas for *orf90a*, *orf72*, and *orf90b*, only very low (2 to 3 orders of magnitude lower) transcript levels were detected. Since RT-PCR is strand specific, we also tested the antisense direction and identified transcripts within the *orf904*, *orf90a*, and *orf90b* region, named *cto904*, *cto90a*, and *cto90b*, respectively.

Initially, RT-PCR was used to deduce information on the lengths of the transcripts but proved to be not suitable because of residual DNA contamination in RNA preparations. Thus, an adaptor RT-PCR approach (see Materials and Methods) was used to circumvent this problem. Using this approach, we could show that *orf56* and *orf904* are cotranscribed, that the sense transcript of *orf80* has a 3'-untranslated region overlapping with the antisense transcript *cto90a*, and that *cto904* overlaps with the putative Shine-Dalgarno (SD) sequence upstream of *orf904* (Fig. 2 and Table 3; also see Fig. 4).

Transcript starting points. The starting points of the identified transcripts were mapped by primer extension to deter-

TABLE 3. Adaptor RT-PCR results^a

Transcript	Start position(s) in pRN1	Ending positions	Length of adaptor RT-PCR product (bp)
<i>orf56/orf904</i>	2156	5031–5096	2,892
<i>orf80</i>	524	957–1005	454
<i>cto904</i>	2938	2231–2190	715
<i>cto90a</i>	1467, 1492	593–530	664
<i>cto90b</i>	1850	1527–1463	314

^a The lengths of the PCR products shown in Fig. 2 are given, as well as the mapped transcription start sites from primer extension analysis (Fig. 3) and the regions of the transcript ends (range between the last primer that yielded a PCR product and the first primer that did not yield a product). For *cto90a*, the PCR did not cover the first 200 nt of the transcript(s). By additional primer extension reactions, no other transcript start sites were detected in that region.

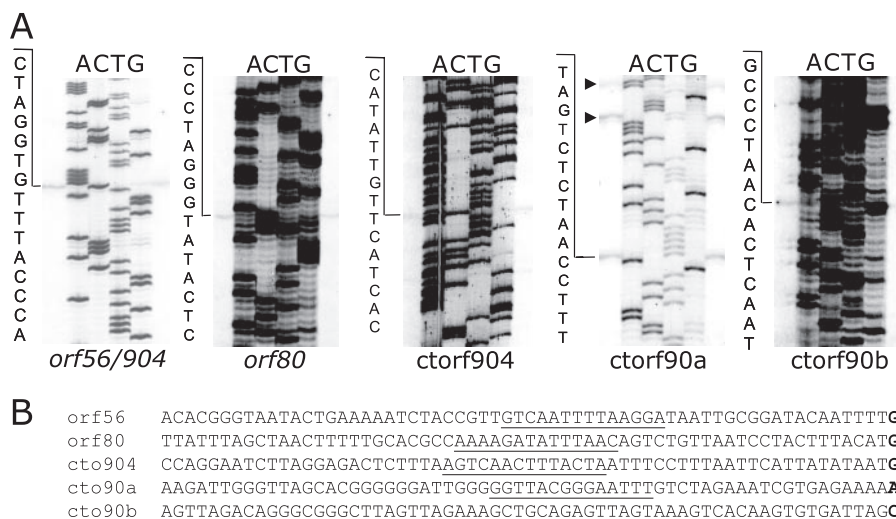


FIG. 3. (A) Primer extension analysis of transcript start sites. The primer extension reaction mix was loaded on both sides of the sequencing ladder. The sequence complementary to the beginning of the transcript is shown on the left side of each sequencing gel. Additional transcription start sites for *ctorf90a* are marked with arrowheads. (B) Aligned sequences upstream of the mapped transcription start sites (last nucleotide, shown in bold). BRE and TATA boxes are underlined and were identified using the consensus sequence of Bell et al. (4), namely, A/GNA/TAAA/TT/CTTAT/AT/AT/AT/ANNANN.

mine the exact start site of each transcript, and thus to be able to identify BRE and TATA box elements, and to verify the presence of the transcripts by an independent method.

The transcript comprising *orf56* and *orf904* starts 9 nt upstream of the ATG start codon for Orf56 at the last guanine nucleotide preceding the start codon (Fig. 3). We also searched for a potential transcript originating from a starting point downstream of *orf56*, comprising only *orf904*, but we found no indication of such an additional transcript by primer extension analysis.

The starting point of the *orf80* transcript was mapped to the G of the Orf80 ATG start codon, which had previously been identified (22). Our findings suggest that the real start codon is situated four codons downstream of the original ATG. The transcript start then maps to the first of three consecutive Gs preceding the new ATG start codon by 10 nucleotides. The name of *orf80* was kept instead of *orf76* for reasons of consistency.

The starting points of the antisense transcripts *ctorf904*, *ctorf90a*, and *ctorf90b* were also determined. Within the coding region of *orf904* and directly following the end of the coding region, two more transcription initiation sites in the antisense direction were determined by primer extension, with start sites at positions 3325 and 5088 in pRN1, starting with a C and a G nucleotide, respectively. In adaptor RT-PCR experiments, it was shown that the resulting transcripts do not run through *orf904* but terminate earlier. Upstream of the mapped transcription start site for *ctorf90b*, within a region of approximately 100 nt, four more initiation sites in the antisense direction were detected from primer extension experiments. Also, for the cotranscript and the transcript *ctorf90a*, more than one transcription initiation site could be detected in the primer extension analysis. The clearest band closest to the primer was marked as the transcription start site in these cases.

In the upstream regions of the transcript start sites, BRE

and TATA box-like elements were identified (Fig. 3B). BRE and TATA boxes of the cotranscript, the *orf80* transcript, and *ctorf904* show the highest similarity to the consensus sequence derived from different archaeal promoters (4). The identified TATA box is centered around nucleotides -26 and -27 preceding the transcription start site, as predicted by bioinformatic analysis (43). The BRE/TATA box for *ctorf90a* is only weakly similar to the consensus sequence. Comparable levels of transcripts are obtained in this case by multiple initiation sites.

Transcript endpoints. Transcript ends were estimated from the adaptor RT-PCR by using different primers spaced approximately 60 nucleotides around the supposed ends. The transcript end was assumed to be situated between the last primer that yielded a PCR product and the first primer that did not yield a product. Figure 4 and Table 3 show all compiled infor-

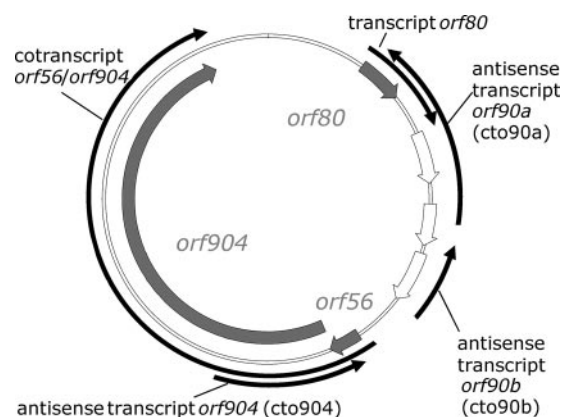


FIG. 4. Map of pRN1 showing the open reading frames (gray, conserved within the plasmid family; white, not conserved) as well as the characterized transcripts.

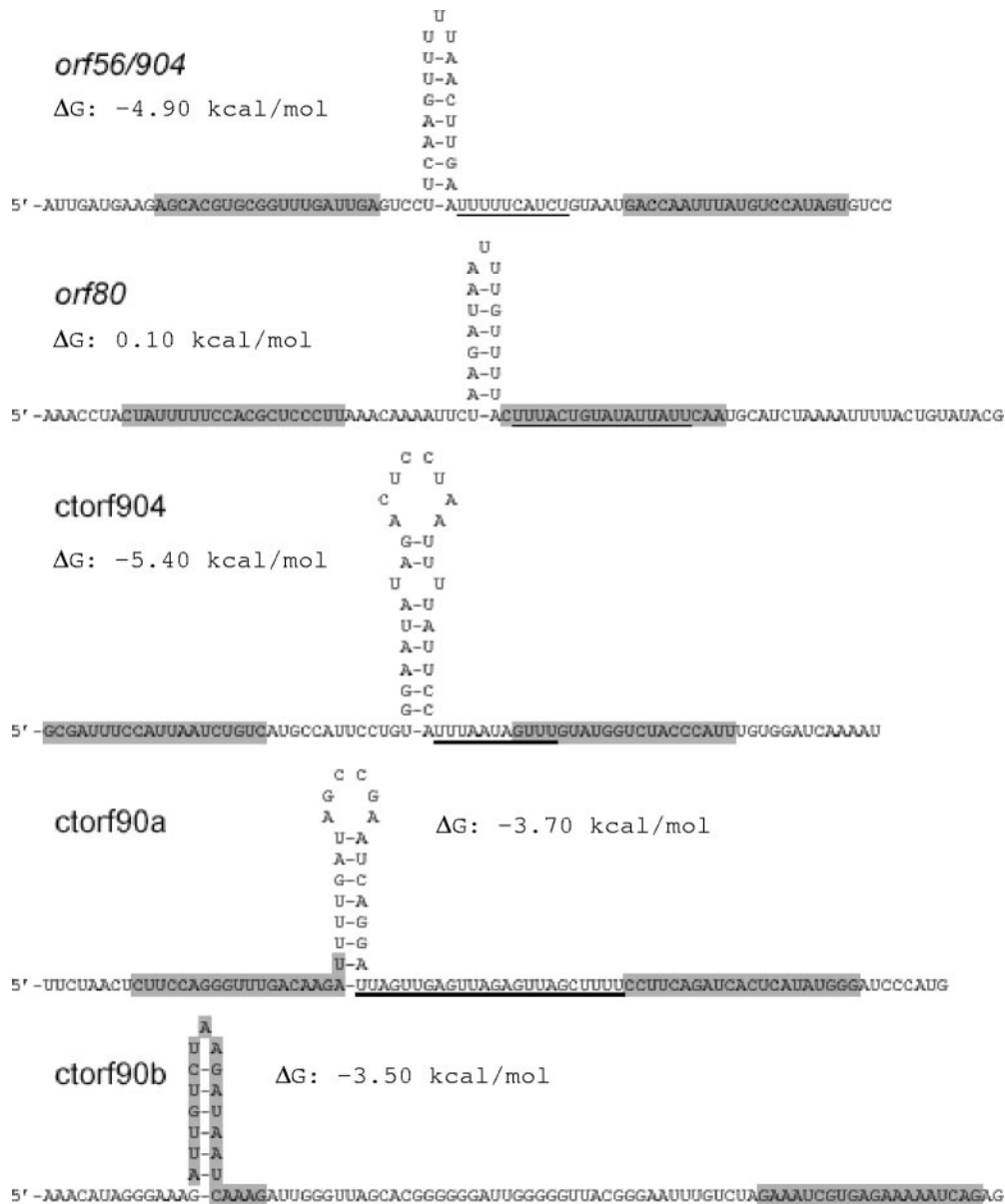


FIG. 5. Transcript ends. The region between the last primer yielding a PCR product and the first primer yielding no PCR product is shown (primer binding sites are shaded in gray). Stem-loop structures predicted using Mfold are shown, as well as U-rich sequence stretches (underlined). The ΔG values for the stem-loop structures are shown as predicted by MFold (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/) under standard conditions, i.e., 37°C and 1 M NaCl.

mation on starts and ends of the transcripts. We crosschecked the results of the adaptor PCR with the primer extension results and with additional qRT-PCR experiments performed, e.g., for the 3'-untranslated region of *orf80* (results not shown), and found all results to be consistent.

The regions of the supposed transcript ends were searched for terminator sequences. There is only very limited information on transcription termination in *Sulfolobus*. A pyrimidine-rich sequence has been identified in SSV1 as an important feature preceding transcript ends (37). Within the last 60 nt of each transcript, U-rich stretches can be identified. We used MFold (48) to predict the secondary structure of each transcript end. Stem-loop structures were found for every tran-

script (7- to 9-nt stem, 3- to 8-nt loop) (Fig. 5) but showed only limited thermodynamic stability, especially at 75°C.

Transcript levels. Having identified five major transcripts of pRN1 (Fig. 4), we wanted to determine their abundance per cell and if the transcript levels change during growth. For that reason, we first examined the time course of the plasmid copy number during a batch fermentation in a 1.5-liter fermenter with rich medium. The copy number was low directly after inoculation (2 to 4 copies per cell), increased during log phase to 23 copies per cell, and then rapidly decreased during stationary/death phase to the initial level (Fig. 6). For that reason, we chose to sample the culture in early log phase (OD, 0.3), mid-log phase (OD, 1.2), and stationary/death phase (OD, 2.2)

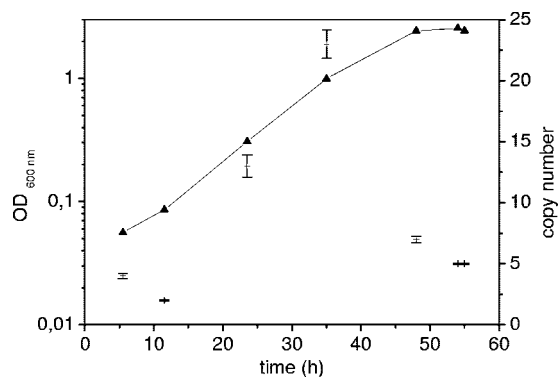


FIG. 6. Growth curve (triangles connected by line, left abscissa) and plasmid copy numbers (crosses, with standard deviations for three different preparations and measurements shown as error bars, right abscissa) of *S. islandicus* REN1H1 cells containing pRN1 and pRN2 during a batch fermentation (1.5 liters, rich medium).

because the plasmid copy number changes were largest at those times. The numbers of transcripts per cell are shown in Fig. 7. The cotranscript was probed at two sites, within *orf56* and within *orf904*, yielding comparable levels of three to eight transcripts per cell and displaying a decrease in stationary/death phase. The transcript of *orf80* showed constant levels during cell growth, at six copies per cell, and also decreased in stationary/death phase. The antisense transcripts *ctorf904* and *ctorf90a* reached the highest transcript levels and increased during logarithmic growth phase (OD 0.3 to OD 1.2). In the case of *ctorf90a*, the increase was fourfold, showing the most dynamic behavior of all transcripts. The transcript *ctorf90b* showed similar levels to those of the cotranscript.

Stability of the transcripts. Transcript stability was examined by using actinomycin D as a transcription inhibitor (8). We observed balanced growth of the treated cultures for a period of only 30 min after the addition of actinomycin D. The resulting transcript levels normalized to the control culture

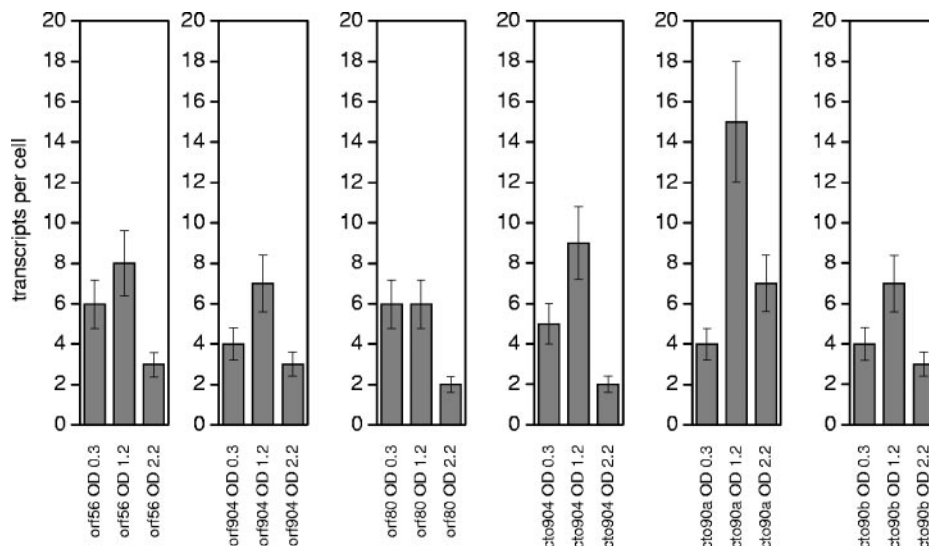


FIG. 7. Transcript levels during a batch fermentation (1.5 liters, rich medium). The error bars represent the combined uncertainties from the RNA preparation, RT, and qPCR steps and cell number determinations. The overall variation is estimated to be 20%.

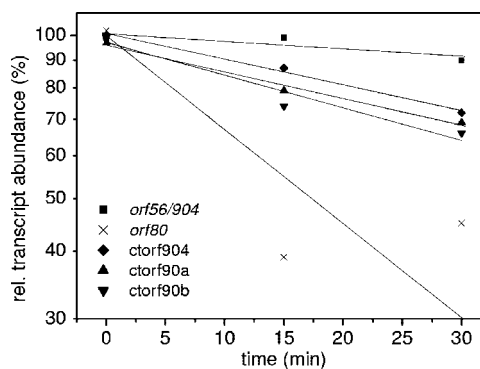


FIG. 8. Stability of transcripts. Levels are expressed as the ratio of transcript levels in actinomycin D-treated cells to transcript levels in untreated control cells for each time point.

levels (Fig. 8) show rapid decay for *orf80*, with a half-life of 15 to 30 min, intermediate decay for *ctorf904*, *ctorf90a*, and *ctorf90b* (half-life of around 1 h), and slow decay for the cotranscript (half-life of approximately 2 h).

Regulation of the *orf56/orf904* cotranscript in vivo. We showed that *orf56* and *orf904* are cotranscribed and thus wanted to test if Orf56 represses the transcription of the cotranscript and accordingly down regulates the expression of the replication protein Orf904, using two shuttle vector constructs. The construct pProm contains the *lacS* reporter gene under the control of the *orf56* promoter and thus represents the number of transcripts that originate from this promoter in the absence of a repressor. The construct pPromOrf56 additionally contains the Orf56 coding sequence, consequently representing the situation found in the native plasmid, where Orf56 can bind to its operator within the *orf56* promoter region and down regulate the number of transcripts originating from the promoter. The numbers of transcripts originating in both constructs from the *orf56* promoter were determined by qRT-PCR, and additionally, the β -galactosidase activity was measured. The *Sul*-

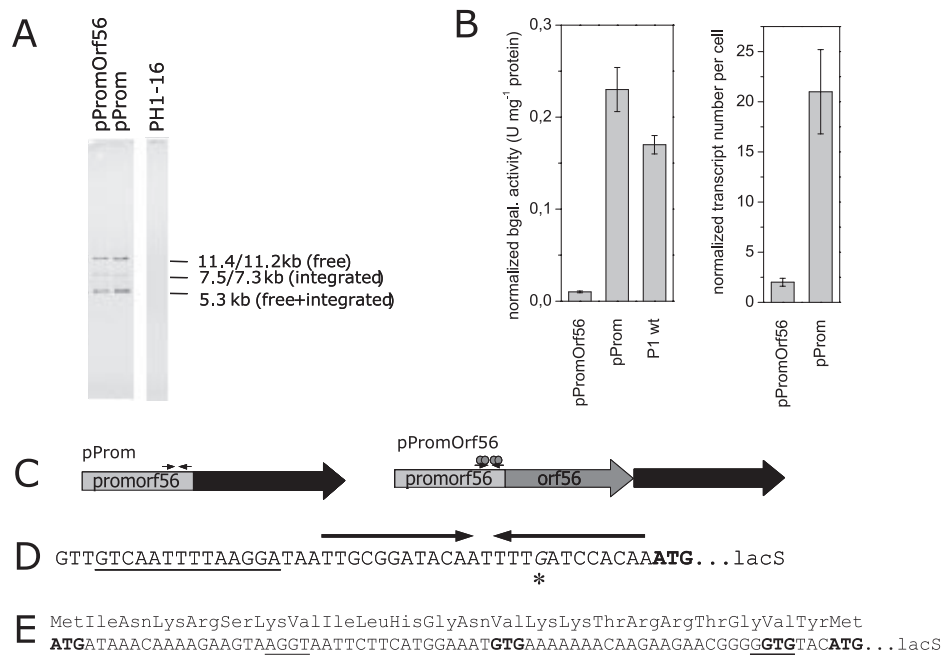


FIG. 9. (A) Southern blot showing *S. solfataricus* PH1-16 transformed with pPromOrf56, with pProm, and without a virus vector. (B) β -Galactosidase activities and transcript levels in cells transformed with the reporter gene shuttle vectors pPromOrf56 and pProm. For comparison purposes, the wild-type β -galactosidase activity of the strain *S. solfataricus* P1 (the parent strain of PH1-16) is also shown. The β -galactosidase activity/transcript number was normalized to the number of copies of the *lacS* gene present in the transformants because free vector copies were observed in addition to the integrated form shown in panel A (gene dose effect described by Jonuscheit et al. [21]). (C) Schematic view of reporter gene constructs. (D) Promoter region of the cotranscript. BRE/TATA boxes are underlined, the transcription start site is marked by an asterisk, and the inverted repeat binding site of Orf56 is indicated by arrows. (E) The first 24 amino acids of the Orf904 sequence are shown. Putative start codons are shown in bold, and putative Shine-Dalgarno sequences are underlined. Since the true start codon is not known, the last of the putative start codons was fused to the *lacS* reporter gene.

folobus cells containing the construct expressing Orf56 showed a 23-fold repression of β -galactosidase activity compared to cells carrying the construct containing only the promoter region. At the level of transcription, the repression was found to be 11-fold (Fig. 9). In a Southern blot, episomal copies of the reporter gene constructs pProm and pPromOrf56 were detected in addition to the site-specifically integrated form. Since a gene dosage effect has been described for this reporter gene system (21), the exact copy number of the reporter gene constructs was determined by qPCR to be two for pProm and three for pPromOrf56 for the same *Sulfolobus* culture that was used for determination of the number of transcripts. The transcript numbers as well as β -galactosidase activities were normalized to the different copy numbers.

DISCUSSION

All open reading frames of pRN1 coding for proteins that are conserved within the pRN family or, as for *orf80*, that are even more widely found in *Sulfolobus* genetic elements (18) have been shown to be transcribed. The three open reading frames that are not conserved show lower levels of transcription (2 to 3 orders of magnitude). A function for these transcripts, or perhaps higher transcription levels under different growth conditions, cannot be ruled out, but since for all three open reading frames the same low levels were measured, these transcript levels could also represent the background level of transcription in pRN1.

The *orf56/orf904* cotranscript and the *orf80* transcript are leaderless transcripts starting only 9 and 10 nucleotides, respectively, upstream of the ATG start codon. *Sulfolobus* has been predicted to have many leaderless transcripts from genome-wide analyses of transcription signals (42, 43). Our findings are also consistent with the report of the *orf57/orf80* transcript of pIT3 (35), which is entirely leaderless and also starts with a G nucleotide.

The cotranscript has no 3'-untranslated region, as it stops within the next 60 nt following the *orf904* stop codon. The transcript of *orf80*, in contrast, has a long (approximately 200 nt) 3'-untranslated region whose transcript levels are comparable to those of the coding region. The 3'-untranslated region and most of the coding region are overlapped by the antisense transcript *ctorf90a*. This transcript might play a regulatory role. The region downstream of *orf80* is not as well conserved as the coding and upstream regions of *orf80* (23). Additional qRT-PCR experiments with the corresponding region of pRN2 showed that a transcript running through *orf81* (equivalent to *orf80* in pRN1) and a transcript in the antisense direction downstream of *orf81* are present. For *Sulfolobus*, a survey of noncoding RNAs found transcripts targeting the 3'-untranslated regions of certain mRNAs (41). It is worth noting that the level of the *orf80* transcript is remarkably stable. It is the only transcript that does not show any changes in transcript level except for declining when cells are dying. This was observed for three different fermentations sampled at different times and

also for different locations within the transcript and might indicate that the number of *orf80* transcripts is tightly regulated.

The transcript *ctorf904*, found in the antisense direction within *orf56/orf904*, spanning about the first one-third of the *orf904* coding sequence and overlapping with the putative SD sequences of *orf904*, could also be involved in copy number control of pRN1. This RNA could act as a translational repressor similar to RNAII of pLS1. In contrast to the short, 50-nt RNAII, *ctorf904* is much longer, but like other regulatory RNAs of bacterial plasmids, it is shorter lived than the mRNA that it overlaps (10).

The transcript found in the antisense direction in the region of *orf90b* does not allow any conclusions to be drawn concerning its putative function.

We checked for the presence of putative open reading frames within the region of the countertranscripts. For *ctorf904*, two open reading frames of 207 bp to 258 bp could be identified (positions 875 to 618 and 864 to 658 in pRN1), and for *ctorf90a*, two open reading frames of 162 bp to 168 bp were found (positions 2781 to 2614 and 2509 to 2348). None of the putative open reading frames showed similarities to those encoding known proteins. We concentrated our transcript analysis on the region of pRN1 that is covered by open reading frames. For that reason, it is possible that further transcripts exist in the region between *orf904* and *orf80*.

The stem-loop structures identified in the region of the transcript ends exhibit some similarity to bacterial rho-independent transcription terminators that consist of a stem of eight or nine, mostly G-C, base pairs and a loop of four to eight bases (45). Reiter et al. (37) suggested that the pyrimidine-rich sequence stretches found in the mRNAs of SSV1 resemble eukaryotic termination signals and could not identify secondary structures near the ends of the mRNAs. In contrast to the viral termination signals, the mapped transcripts of pRN1 clearly show stem-loop structures followed by a U-rich sequence. However, this sequence does not closely resemble the consensus of Reiter et al. (UUUUUUU/CU). Termination has been shown to take place at RNA hairpin structures followed by a U-rich sequence in a *Methanothermobacter methanohalophilus* in vitro transcription system, yet with varying degrees of efficiency (38).

In contrast to the quite dynamic behavior of the pRN1 copy number during fermentation, the levels of transcripts did not show large changes over different growth phases, except for declining in stationary/death phase. One possible explanation for this observation could be that the main part of plasmid copy number control is exerted not on the transcriptional level but on the translational or even posttranslational level. It has been shown that some transcripts from *Sulfolobus* have long half-lives compared to those of bacterial transcripts (8), and it was pointed out that this renders control on the transcriptional level difficult. It was proposed that control on the translational level could play an important role in archaea. The half-lives of the pRN1 transcripts (especially the cotranscript) are in the upper range of already determined half-lives for *Sulfolobus* (2, 8), and copy number control might operate on the translational level, perhaps involving the discovered antisense transcripts. For the bacterial plasmid pLS1, the main regulatory element is the antisense transcript RNAII, which responds quickly to

copy number fluctuations, whereas the role of the CopG protein is to keep the synthesis of the *copG-repB* mRNA within narrow limits (14).

These findings are in accordance with a study on the transcription of *Sulfolobus* rod-shaped virus (SIRV1 and SIRV2), where a remarkably constant transcription pattern was observed upon infection of *Sulfolobus* cells (24).

The reporter gene assay proved that Orf56 does indeed repress transcription from its own promoter. The protein Orf56 has been shown in vitro to bind as a tetramer to a 12-bp inverted repeat situated just upstream of the *orf56* start codon. Its binding region does not overlap with BRE or TATA boxes that are found 20 to 33 nt upstream of the ATG, and thus it cannot interfere directly with binding of either transcription factor B (TFB) or TATA box-binding protein (TBP) (32). However, the Orf56 binding site overlaps the transcript start, and thus the contact of this region and the RNA polymerase might be impaired. This bacterial mechanism of RNA polymerase abrogation has been demonstrated for the archaeal species *Archaeoglobus* (MDR repressor) and *Pyrococcus* (LrpA and PhrA) (5, 12, 44). In *Sulfolobus*, transcriptional repression can also occur by blocking of the binding sites for TBP and TFB (6), and it has been suggested that derepression takes longer than in the case of RNA polymerase abrogation, where TBP and TFB can stay bound to the promoter region. To prevent plasmid loss in case of downward copy number fluctuations, it is crucial that the repression of the replication operon can be reversed quickly.

The 11-fold repression at the transcriptional level is comparable to the 10- to 20-fold repression observed in the presence of the transcriptional repressor CopR for plasmid pIP501 (9), which is also regulated by a repressor protein and an antisense RNA. Similar to the case for CopR of pIP501 and CopG of pLS1 (10), the transcription of the cotranscript is not totally blocked in the presence of Orf56.

The reporter gene assay using β -galactosidase activity yielded about two times more repression than the direct measurement of transcript levels. This could point to another mechanism at the translational level being active in the reporter gene shuttle vector constructs. It either favors the expression of the LacS protein in the pProm (without Orf56) construct or reduces its expression in the pPromOrf56 (with Orf56) construct. A mechanism that would act like the former could be the enhanced translational efficiency of a leaderless transcript (as in pProm) compared to initiation at an SD sequence (as in pPromOrf56). This has been observed for *Halobacterium salinarum* in vivo (39) and has also been described for a *Sulfolobus solfataricus* in vitro translation system (11).

The pRN family plasmids contain all homologs of Orf56/CopG and the replication protein Orf904 in their conserved regions. In the plasmids pTAU4, pTIK4, pORA1, and pIT3 as well as in conjugative plasmids and viruses of *Sulfolobus*, CopG-like proteins have been annotated preceding an open reading frame predicted to code for a replication protein (17). In some cases (e.g., pORA1 and pSSVx), the CopG-like proteins do not directly precede the replication protein but are followed by another short open reading frame encoding a protein also showing some similarity to Cop proteins (18). Inverted repeats as putative binding sites upstream of the

CopG-like proteins have been identified in pKEF9 and pARN4 but not in pORA1 and pTIK4 (18, 19). The transcription of two CopG-like proteins preceding a replication protein has been examined so far only for pIT3. Two distinct transcriptional units consisting of a transcript for the CopG-like proteins and one for the replication protein (35) have been found, unlike the case in pRN1. Therefore, care has to be taken when transferring the results obtained with pRN1 to other annotated CopG-like/replication protein couples from *Sulfolobus* plasmids.

The combined information obtained from the biochemical characterization of the proteins encoded by pRN1, the analysis of its transcription pattern, and the results of first genetic experiments has considerably improved our understanding of plasmid organization and copy number regulation. The mechanism of copy number regulation shows similarities to that of gram-positive bacterial rolling circle plasmids of the pMV158 family, whereas the replication protein encoded in the auto-regulated operon is a specific archaeal protein. Unexpectedly, in a large part of pRN1, transcriptional activity can be detected. This is reminiscent of the finding that transcripts are produced by at least half of the typical eukaryotic genome (7). The transcript levels are low, allowing the plasmid to stay inconspicuous without being a burden for the cell. Whether all of the transcripts have a function remains to be determined. Improvement of genetic systems for *Sulfolobus* will allow us to address still unresolved issues, such as the mode of replication of pRN1 or further mechanisms of regulation.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Christa Schleper for the original *S. islandicus* REN1H1 strain, to Alexandra Kessler, Monika Häring, and David Prangishvili for helpful discussions, to Sonja Albers for her advice and encouragement with the virus vector system, and to Kirsten Beck for helpful comments on the manuscript.

This work was supported by the DFG (grant Li913/3 to G.L.).

REFERENCES

- Albers, S. V., M. Jonuscheit, S. Dinkelaker, T. Ulrich, A. Kletzin, R. Tampé, A. J. M. Driessen, and C. Schleper. 2006. Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:102–111.
- Andersson, A., M. Lundgren, S. Eriksson, M. Rosenlund, R. Bernander, and P. Nilsson. 2006. Global analysis of mRNA stability in the archaeon *Sulfolobus*. *Genome Biol.* **7**:R99.
- Arnold, H. P., Q. She, H. Phan, K. M. Stedman, D. Prangishvili, I. Holz, J. K. Kristiansson, R. A. Garrett, and W. Zillig. 1999. The genetic element pSSVx of the extremely thermophilic crenarchaeon *Sulfolobus* is a hybrid between a plasmid and a virus. *Mol. Microbiol.* **34**:217–226.
- Bell, S. D., P. L. Kosa, P. B. Sigler, and S. P. Jackson. 1999. Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:13662–13667.
- Bell, S. D., S. S. Cairns, R. L. Robson, and S. P. Jackson. 1999. Transcriptional regulation of an archaeal operon in vivo and in vitro. *Mol. Cell* **4**:971–982.
- Bell, S. D., and S. P. Jackson. 2000. Mechanism of autoregulation by an archaeal transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.* **275**:31624–31629.
- Bickel, K. S., and D. R. Morris. 2006. Silencing the transcriptome's dark matter: mechanisms for suppressing translation of intergenic transcripts. *Mol. Cell* **22**:309–316.
- Bini, E., V. Dikshit, K. Dirksen, M. Drozda, and P. Blum. 2002. Stability of mRNA in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *RNA* **8**:1129–1136.
- Brantl, S. 1994. The copR gene product of plasmid pIP501 acts as a transcriptional repressor at the essential repR promoter. *Mol. Microbiol.* **14**:473–483.
- Brantl, S. 2004. Plasmid replication control by antisense RNAs, p. 47–62. *In* B. E. Funnell and G. J. Phillips (ed.), *Plasmid biology*. ASM Press, Washington, DC.
- Condo, I., A. Ciammaruconi, D. Benelli, D. Ruggero, and P. Londei. 1999. Cis-acting signals controlling translational initiation in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol. Microbiol.* **34**:377–384.
- Dahlke, I., and M. Thomm. 2002. A Pyrococcus homolog of the leucine-responsive regulatory protein, LrpA, inhibits transcription by abrogating RNA polymerase recruitment. *Nucleic Acids Res.* **30**:701–710.
- del Solar, G., P. Acebo, and M. Espinosa. 1997. Replication control of plasmid pLS1: the antisense RNAII and the compact rnaII region are involved in translational regulation of the initiator RepB synthesis. *Mol. Microbiol.* **23**:95–108.
- del Solar, G., and M. Espinosa. 2000. Plasmid copy number control: an ever growing story. *Mol. Microbiol.* **37**:492–500.
- del Solar, G., and M. Espinosa. 1992. The copy number of plasmid pLS1 is regulated by two trans-acting plasmid products: the antisense RNAII and the repressor protein, RepA. *Mol. Microbiol.* **6**:83–94.
- Ehresmann, B., P. Imbault, and J. H. Weil. 1973. Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal. Biochem.* **54**:454–463.
- Garrett, R. A., P. Redder, B. Greve, K. Brügger, L. Chen, and Q. She. 2004. Archaeal plasmids, p. 377–392. *In* B. E. Funnell and G. J. Phillips (ed.), *Plasmid biology*. ASM Press, Washington, DC.
- Greve, B., S. Jensen, H. Phan, K. Brügger, W. Zillig, Q. She, and R. A. Garrett. 2004. Novel RepA-MCM proteins encoded in plasmids pTAU4, pORA1 and pTIK4 from *Sulfolobus neozealandicus*. *Archaea* **1**:319–325.
- Greve, B., S. Jensen, K. Brügger, W. Zillig, and R. A. Garrett. 2004. Genomic comparison of archaeal conjugative plasmids from *Sulfolobus*. *Archaea* **1**:231–239.
- Grogan, D. W. 1989. Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *J. Bacteriol.* **171**:6710–6719.
- Jonuscheit, M., E. Martusewitsch, K. M. Stedman, and C. Schleper. 2003. A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle vector. *Mol. Microbiol.* **48**:1241–1252.
- Keeling, P. J., H.-P. Klenk, R. K. Singh, O. Feeley, C. Schleper, W. Zillig, W. F. Doolittle, and C. W. Sensen. 1996. Complete nucleotide sequence of the *Sulfolobus islandicus* multicopy plasmid pRN1. *Plasmid* **35**:141–144.
- Keeling, P. J., H.-P. Klenk, R. K. Singh, M. E. Schenk, C. W. Sensen, W. Zillig, and W. F. Doolittle. 1998. *Sulfolobus islandicus* plasmids pRN1 and pRN2 share distant but common evolutionary ancestry. *Extremophiles* **2**:391–393.
- Kessler, A., A. B. Brinkman, J. van der Oost, and D. Prangishvili. 2004. Transcription of the rod-shaped viruses SIRV1 and SIRV2 of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus*. *J. Bacteriol.* **186**:7745–7753.
- Kletzin, A., A. Lieke, T. Ulrich, R. L. Charlebois, and C. W. Sensen. 1999. Molecular analysis of pDL10 from Acidianus ambivalens reveals a family of related plasmids from extremely thermophilic and acidophilic archaea. *Genetics* **152**:1307–1314.
- Lipps, G., M. Stegert, and G. Krauss. 2001. Thermostable and site-specific DNA binding of the gene product ORF56 from the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1, a putative archaeal plasmid copy control protein. *Nucleic Acids Res.* **29**:904–913.
- Lipps, G., P. Ibanez, T. Stroessenreuther, K. Hekimian, and G. Krauss. 2001. The protein ORF80 from the acidophilic and thermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* binds highly site-specifically to double-stranded DNA and represents a novel type of basic leucine zipper protein. *Nucleic Acids Res.* **29**:4973–4982.
- Lipps, G., S. Röther, C. Hart, and G. Krauss. 2003. A novel type of replicative enzyme harboring ATPase, primase and DNA polymerase activity. *EMBO J.* **22**:2516–2525.
- Lipps, G., A. O. Weinzierl, G. von Scheven, C. Buchen, and P. Cramer. 2004. Structure of a bifunctional DNA primase-polymerase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:157–162.
- Lipps, G. 2004. The replication protein of the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1. *Biochem. Soc. Trans.* **32**:240–243.
- Lipps, G. 2006. Plasmids and viruses of the thermoacidophilic crenarchaeote *Sulfolobus*. *Extremophiles* **10**:17–28.
- Littlefield, O., Y. Korkhin, and P. B. Sigler. 1999. The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:13668–13673.
- Martusewitsch, E., C. W. Sensen, and C. Schleper. 2000. High spontaneous mutation rate in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by transposable elements. *J. Bacteriol.* **182**:2574–2581.
- Peng, X., I. Holz, W. Zillig, R. A. Garrett, and Q. She. 2000. Evolution of the family of pRN plasmids and their integrase-mediated insertion into the chromosome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* **303**:449–454.
- Prato, S., R. Cannio, H.-P. Klenk, P. Contursi, M. Rossi, and S. Bartolucci. 2006. pIT3, a cryptic plasmid isolated from the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* IT3. *Plasmid* **56**:35–45.
- Purschke, W. G., and G. Schäfer. 2001. Independent replication of the

- plasmids pRN1 and pRN2 in the archaeon *Sulfolobus islandicus*. FEMS Microbiol. Lett. **200**:97–102.
37. **Reiter, W.-D., P. Palm, and W. Zillig.** 1988. Transcription termination in the archaeobacterium *Sulfolobus*: signal structures and linkage to transcription initiation. Nucleic Acids Res. **16**:2445–2459.
 38. **Santangelo, T. J., and J. N. Reeve.** 2006. Archaeal RNA polymerase is sensitive to intrinsic termination directed by transcribed and remote sequences. J. Mol. Biol. **355**:196–210.
 39. **Sartorius-Neef, S., and F. Pfeifer.** 2004. In vivo studies on putative Shine-Dalgarno sequences of the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum*. Mol. Microbiol. **51**:579–588.
 40. **Schleper, C., K. Kubo, and W. Zillig.** 1992. The particle SSV1 from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* is a virus: demonstration of infectivity and of transfection with the viral DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**:7645–7649.
 41. **Tang, T.-H., N. Polacek, M. Zywicki, H. Huber, K. Brügger, R. A. Garrett, J. P. Bachellerie, and A. Hüttenhofer.** 2005. Identification of novel non-coding RNAs as potential antisense regulators in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Mol. Microbiol. **55**:469–481.
 42. **Tolstrup, N., C. W. Sensen, R. A. Garrett, and I. G. Clausen.** 2000. Two different and highly organized mechanisms of translation initiation in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Extremophiles **4**:175–179.
 43. **Torarinsson, E., H.-P. Klenk, and R. A. Garrett.** 2005. Divergent transcriptional and translational signals in archaea. Environ. Microbiol. **7**:47–54.
 44. **Vierke, G., A. Engelmann, C. Hebbeln, and M. Thomm.** 2003. A novel archaeal transcriptional regulator of heat-shock response. J. Biol. Chem. **278**:18–26.
 45. **Wilson, K. S., and P. H. von Hippel.** 1995. Transcription termination at intrinsic terminators: the role of the RNA hairpin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**:8793–8797.
 46. **Wolin, E. A., M. J. Wolin, and R. S. Wolfe.** 1963. Formation of methane by bacterial extracts. J. Biol. Chem. **238**:2882–2886.
 47. **Zillig, W., A. Kletzin, C. Schleper, I. Holz, D. Janekovic, J. Hain, M. Lanzendörfer, and J. K. Kristiansson.** 1994. Screening for Sulfolobales, their plasmids, and their viruses in Icelandic solfataras. Syst. Appl. Microbiol. **16**:606–628.
 48. **Zuker, M.** 1989. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. Science **244**:48–52.

Table S1: Adaptor primers for adaptor RT-PCR experiments. The adaptor primer sequence is separated by a vertical line from the sequence complementary to the plasmid. Yes/no in the last column indicates if a PCR product was obtained using the specified adaptor primer.

cotranscript <i>orf56/orf904</i>	F_rev	TAATACGACTCACTATAGGG CTTATGTCCATAGTGCCAA	no
	L_rev	TAATACGACTCACTATAGGG TTATCACGGTTGTCATGCTG	no
	S_rev	TAATACGACTCACTATAGGG ACTATGGACATAAATTGGTC	no
	T_rev	TAATACGACTCACTATAGGG TTATTGTCCCACCGTGTATC	no
	AA_rev	TAATACGACTCACTATAGGG TCAATCAAACCGCACGTGCT	yes
transcript <i>orf80</i>	K_rev	TAATACGACTCACTATAGGG ACGCATCAGGTAAAACGATA	no
	X_rev	TAATACGACTCACTATAGGG TTGAATAATATACAGTAAAG	no
	O_rev	TAATACGACTCACTATAGGG AAGGGAGCGTGGAAAAATAG	yes
transcript cto904	Y_for	TAATACGACTCACTATAGGG AATGGGTAGACCATACAAAC	no
	G_for	TAATACGACTCACTATAGGG AAAGAGTATTTAGACAATCA	yes
	R_for	TAATACGACTCACTATAGGG GCAGGCTGGCAATTAAGAG	yes
	U_for	TAATACGACTCACTATAGGG GACAGATTAATGGAAATCGC	yes
transcript cto90a	P_for	TAATACGACTCACTATAGGG CCATATGAGTGATCTGAAGG	no
	I_for	TAATACGACTCACTATAGGG CAGACTCCATAAAAAAGGC	yes
	V_for	TAATACGACTCACTATAGGG ATCTTGTCAAACCCTGGAAG	yes
transcript cto90b	Q_for	TAATACGACTCACTATAGGG CTTACTCTTTATCTACAGC	no
	W_for	TAATACGACTCACTATAGGG CTGATTTTTCTCACGATTC	no
	J_for	TAATACGACTCACTATAGGG CTTTGATTATCTTAGACAAT	yes
control primer (<i>orf72</i>)	M_for	TAATACGACTCACTATAGGG TCTTCTTAGCTTTTGCTCTC	neg. control
	N_rev	TAATACGACTCACTATAGGG AATCAAAGATTGGTTAGCA	

7.2 Teilarbeit B

Stefan Söllner, Silvia Berkner und Georg Lipps.

Characterisation of the novel restriction endonuclease *SuiI* from *Sulfolobus islandicus*.

Extremophiles, 10, 629-634 (2006).

Stefan Söllner · Silvia Berkner · Georg Lipps

Characterisation of the novel restriction endonuclease *SuiI* from *Sulfolobus islandicus*

Received: 13 March 2006 / Accepted: 10 July 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract A restriction endonuclease activity from *Sulfolobus islandicus* REN2H1 was purified by phosphocellulose and cation exchange chromatography. The enzyme cuts DNA at the recognition site GCwGC as could be shown by restriction analysis of plasmids and short synthetic duplex DNA. The cleavage occurs after the first guanosine base and is inhibited by 5-methylcytosine methylation. The restriction activity is salt-sensitive and has an optimal activity around 70°C.

Keywords *Sulfolobus islandicus* · Restriction endonuclease type II · *SuiI* · *TseI* · Methylation

Introduction

Restriction endonucleases recognize specific DNA sequences and are able to cleave double-stranded DNA either within the recognition site or outside. Their physiological function is to restrict foreign DNA which has a different methylation pattern than the host DNA. Therefore, restriction endonucleases and methylases are the two principal components of restriction-modification (R-M) systems.

Four types of restriction endonucleases can be distinguished. Type I restriction endonucleases form a multimeric complex with three different subunits which are capable of sequence recognition, modification and restriction, respectively. The enzyme complex can translocate along DNA fuelled by the hydrolysis of ATP. Cleavage usually occurs distant to the recognition site. A typical example is *EcoKI*.

Restriction endonucleases of type II are the most abundant type. They recognize short DNA sequences of 4–8 bases length. Most recognition sites are palindromic. The DNA is cut on both strands either within the recognition site or in its close neighbourhood. In many cases compatible ends are produced which result in the efficient ligation of DNA fragments produced by restriction with type II enzymes.

Type III restriction endonucleases consist of two subunits with recognition/restriction and modification activity. Like type I enzymes they may also translocate along DNA in an ATP-dependant manner. Cleavage occurs close to the recognition site. A typical example is *EcoPI*.

Type IV restriction endonucleases are not a component of a restriction-modification system. These enzymes cleave DNA between two recognition sites containing a methylated or hydroxymethylated cytosine. The best studied examples is *McrBC* from *Escherichia coli*.

Most restriction enzymes have been isolated from bacteria. However an increasing number of restriction enzymes can be recognized in sequenced archaeal genomes. According to the current release of Rebase (Roberts et al. 2005) *Haloarcula marismortui* appears to have a R-M type IV system and three methyltransferases of type II. *Methanosarcina acetivorans* C2A seems to have two complete RM systems of type I and one complete R-M system of type IV as well as several additional methylase and restriction endonuclease genes. *Pyrococcus furiosus* has two methyltransferase genes. *Sulfolobus acidocaldarius* has a complete R-M system of type II and additional restriction and methylase genes.

For most of these predicted archaeal R-M enzymes no biochemical studies have been undertaken. Therefore it is not known whether the genes are expressed and whether the enzymes are functional in vivo. Also the sequence specificity is not known for the majority of these enzymes. So far only very few archaeal restriction enzymes have been investigated. To our knowledge the first archaeal restriction enzyme, *ThaI*, was purified from *Thermoplasma acidophilum* in 1978 (McConnell et al.

Communicated by G. Antranikian

S. Söllner · S. Berkner · G. Lipps (✉)
Institute of Biochemistry, University of Bayreuth,
Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth, Germany
E-mail: Georg.Lipps@uni-bayreuth.de
Tel.: +49-921-554358
Fax: +49-921-552432

1978). From *Pyrococcus* sp. strain GI-H the type II restriction endonuclease *PspGI* has been isolated and characterized (Morgan et al. 1998; Pingoud et al. 2003) and from *Pyrococcus abyssi* the restriction endonuclease *PabI* has recently been identified and its cleavage site has been determined (Ishikawa et al. 2005). Three restriction endonucleases were found in *Methanococcus aeolicus* (Ishikawa et al. 2005) and a R-M system was identified on the plasmid pFV1 from *Methanobacterium thermoformicicum* (Nolling et al. 1992). Among the *Crenarchaeota*, one of the two major branches of archaea, so far only the restriction endonuclease *SuaI* from *S. acidocaldarius* has been studied (Prangishvili et al. 1985) and the *ApeKI* restriction endonuclease from *Aeropyrum pernix* K1 is commercially available. For the former enzyme its methylation sensitivity has been analysed. The enzyme is inactive on DNA substrate where the inner cytosine of the recognition sequence GGCC is methylated at the N4 position. However the enzyme is active on substrates with methylation at the C5 position of the cytosine base (Grogan 2003). This suggests that in the thermophile *S. acidocaldarius* the cytosines are modified at the N4 position and not at the C5 position. Spontaneous deamination of 5-methyl-cytosine leads to the formation of thymidine in a GT mismatch which might be less well repaired than an uridine base which is produced when N4-methyl-cytosine deaminates. Since deamination is favoured at higher temperatures it might be advantageous for thermophiles to methylate cytosine at the N4 position.

In an ongoing project to develop a *Sulfolobus-E. coli* shuttle vector we studied whether several *Sulfolobus islandicus* strains contain restriction endonucleases which could hinder the transformation of *Sulfolobus* with plasmids prepared in *E. coli*. In this report we describe an endonuclease activity which we isolated from *S. islandicus* strain REN2H1 (Zillig et al. 1994). The palindromic recognition sequence of the enzyme is GCwGC (w = A or T) and the enzyme cleaves after the first guanosine leaving a 5' overhang of three bases. We suggest to name this enzyme *SuiI*, to differentiate against *SisI*, a type II restriction endonuclease from *Salmonella isangi*. The enzyme is an isoschizomer of *TseI* isolated from the thermophilic bacterium *Thermus* sp. and of *ApeKI* from the crenarchaeote *A. pernix* K1.

Experimental

Purification of *SuiI*

Sulfolobus cells were grown in Brock medium (Grogan 1989) with 0.1% tryptone and 0.2% arabinose at 75°C up to an OD₆₀₀ of 1. The cells (1 g wet weight) were harvested by centrifugation. The frozen cell pellet was resuspended in 50 mM sodium phosphate, pH 7.0 and the cells were lysed by seven cycles of freezing in liquid nitrogen and thawing at 60°C. The cell debris was pelleted by centrifugation for 30 min at 14,000g at 4°C.

2.5 ml of the crude extract was adjusted to 100 mM NaCl, supplemented with 1 mM β -mercaptoethanol and 2 mM MgCl₂ and loaded onto 4 ml P1 phosphocellulose (Whatman) column equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 2 mM MgCl₂, 1 mM β -mercaptoethanol, 100 mM NaCl (buffer T + 100 mM NaCl). The column was developed with a 40 ml linear salt gradient up to 1 M NaCl. *SuiI* restriction activity eluted at about 500 mM NaCl. The fractions were dialysed against 20 mM Tris-acetate pH 7.0, 10 mM MgCl₂, 1 mM β -mercaptoethanol (buffer TA). Activity containing fractions were combined and loaded onto a 1 ml EMD-sulphate (Merck) column equilibrated with buffer T + 100 mM NaCl. The column was eluted with a 10 ml salt gradient. *SuiI* eluted at about 400 mM NaCl. The fractions were dialysed against buffer TA. Protein concentrations were determined by UV spectroscopy.

Restriction assay

Five-hundred nanograms of plasmid pUC-pRN1 (Keeling et al. 1996) was incubated with *SuiI* in a 10 μ l reaction in 20 mM Tris-acetate pH 7.0, 50 mM potassium acetate, 10 mM MgCl₂, 1 mM β -mercaptoethanol (NEB 4) for 1 h at 65°C. After the restriction the samples were eventually treated with proteinase K in order to digest further DNA binding proteins present in the samples. Then the digests were analysed on a 1% agarose gel and stained with ethidium bromide. The activity of the enzyme was estimated to be 0.5 U when the plasmid was completely restricted.

Cloning of restriction fragments

A restriction digest of pUC-pRN1 was purified over a silica membrane (Promega), incubated with 5 U Klenow fragment (NEB) in the presence of 40 μ M dCTP/dGTP/dTTP and 200 μ M dATP in order to remove potential 3' overhangs or to fill up potential 5' overhangs. The Klenow fragment was heat inactivated and then the sample was incubated with 5 U *Taq* DNA polymerase (Peqlab). The latter incubation will generate a single base 3' overhang with adenine which can now be ligated into the pGEM-T vector (Promega). A clone containing a restriction fragment was sequenced and allowed to identify the cleavage site of *SuiI*.

Restriction of methylated DNA and genomic DNA

To investigate the methylation sensitivity of *SuiI* we prepared synthetic duplex DNA by hybridising two complementary 33 base long oligodeoxynucleotides (5'-ACGCGTTCGGCCTGGCACGTCGGCCGCTGCCGCC-3' and 5'-GGCCGCAGCGGCCGTCGTGCCAGGCCGACGCGT-3', recognition site underlined). The

latter oligodeoxynucleotide was labelled with γ -[32 P]-ATP at the 5' end with T4 polynucleotide kinase. As substrates we used the unmodified DNA as well as DNA symmetrically methylated at the inner cytosine or the outer cytosine of the recognition sequence. The digests were analysed on a denaturing polyacrylamide gel.

Genomic DNA from the *S. islandicus* strains was prepared by phenol/chloroform extraction of crude extracts followed by ethanol precipitation.

Results and discussion

Purification

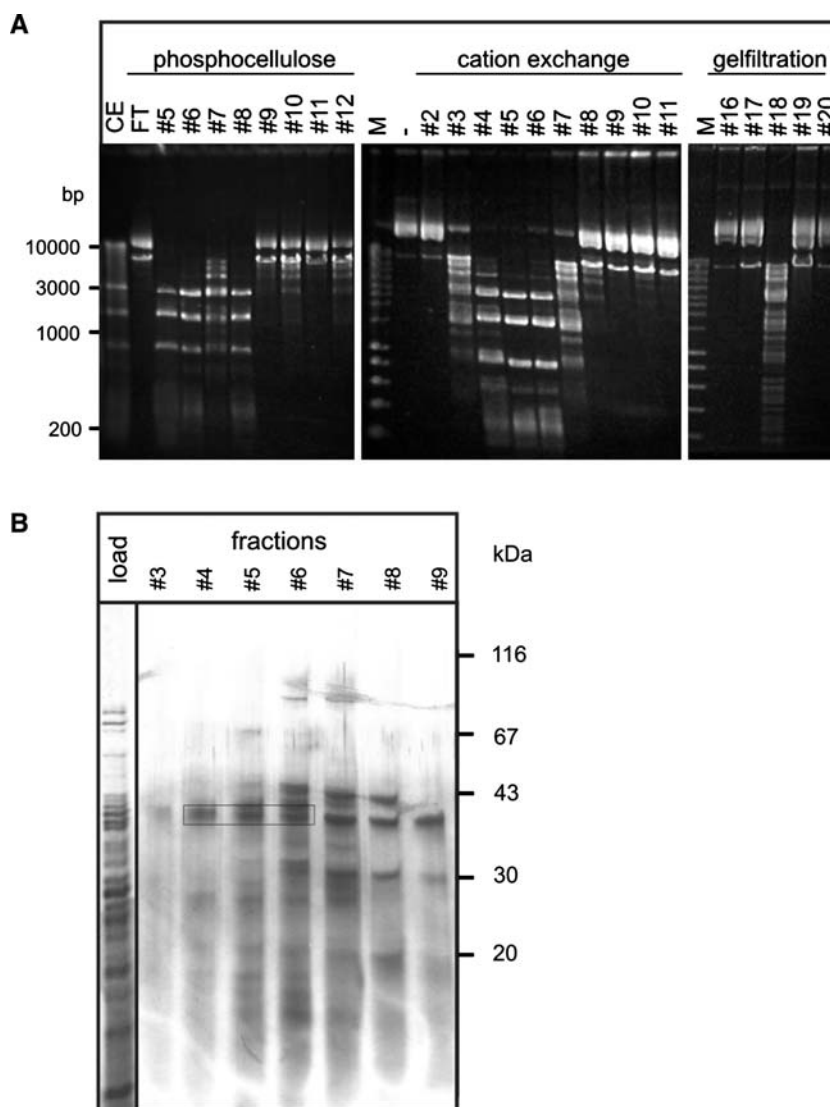
When we screened several *S. islandicus* strains for restriction endonuclease activity we found that the strain REN2H1 has a restriction endonuclease activity. Preliminary experiments showed that the plasmid pUC-pRN1 (8036 bases) is cut into three larger fragments of the sizes 3, 1.6 and 0.9 kb by a crude extract prepared from *S. islandicus* REN2H1. A comparable activity was not seen for the strains *S. islandicus* REN1H1 nor HVE10/4 (Zillig et al. 1994) nor in *Sulfolobus solfataricus* P1 (ATCC 35091). As substrate in these initial screening test we used the plasmid pUC-pRN1. This

Table 1 Purification of *SuiI*

	Protein (mg)	Spec. activity (U/ μ g)	Total activity (kU)
Crude extract	27	\sim 0.05	\sim 1.4
Phosphocellulose	2	1.25	2.5
Cation exchange	0.4	4.1	1.6

The restriction activity was purified approximately 80-fold by phosphocellulose and cation exchange chromatography. Total yield from 1 g of cells was 1,600 U after cation exchange chromatography

Fig. 1 Purification. **a** The restriction enzyme *SuiI* was purified by phosphocellulose, cation exchange and gelfiltration chromatography. The fractions of the respective columns were assayed by digestion of pUC-pRN1 plasmid DNA. The digests contained about 11 μ g protein (CE crude extract), 0.4 μ g (phosphocellulose) and 0.2 μ g (cation exchange), respectively. The recovery of activity after the gelfiltration was rather low and only an incomplete restriction was obtained. We therefore used the cation exchange fractions to characterize the restriction activity of *SuiI*. **b** Silverstained SDS-PAGE protein gel from the cation exchange chromatography. The pool from the phosphocellulose column (load) and the fractions of the salt gradient were analysed. The boxed region highlights a protein which coelutes with the restriction activity



pUC18 derivative contained the complete sequence of the plasmid pRN1 isolated from *S. islandicus* (Keeling et al. 1996). The GC content of the plasmid pRN1 (37%) was rather low and comparable to the GC content of the *Sulfolobus* chromosomes. We used this substrate as we reasoned that a restriction endonuclease isolated from *Sulfolobus* is less likely to contain an AT-rich recognition sequence.

In order to characterize the restriction endonuclease activity from *S. islandicus* strain REN2H1 in more detail we purified the enzyme through several chromatographic steps. The enzymatic activity could be enriched about 80-fold by purification over phosphocellulose and cation exchange chromatography (Table 1). SDS-PAGE analysis showed that several polypeptides are present in the activity containing fractions after the ion exchange chromatography (Fig. 1). In an attempt to further purify the activity we fractionated the protein mixture on a gel-filtration column. We were able to find restriction endonuclease activity in one single fraction. In this fraction proteins of about 40 kDa would elute. However the remaining restriction endonuclease activity was very low and we were not able to identify a protein band in the corresponding SDS-PAGE. We therefore used the material purified by phosphocellulose and cation

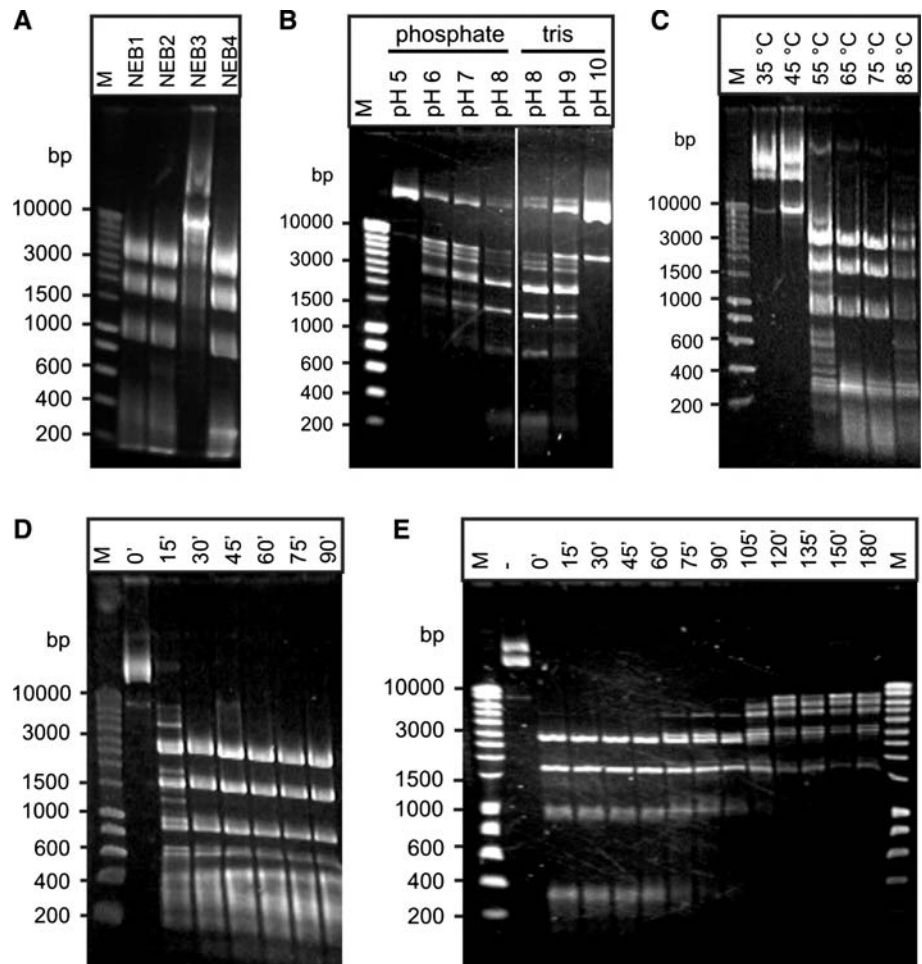
exchange chromatography for studying the enzyme's properties.

SuiI is a thermophilic restriction endonuclease with the recognition site GCwGC

During our studies we found that we cannot detect the restriction endonuclease activity in the fractions from both columns prior to dialysis. The enzyme is inhibited by the salt present in these eluates. We found that *SuiI* is inhibited by sodium chloride and ammonium sulphate (data not shown). Consequently *SuiI* is not active in NEB3 which contains 100 mM sodium chloride (Fig. 2a). Furthermore *SuiI* is most active at a pH around 8 (Fig. 2b). Next we investigated in which temperature range *SuiI* is active. *SuiI* is isolated from a thermophilic archaeon which grows around 75°C. When assaying the activity of *SuiI* at different temperatures we clearly find that *SuiI* is thermophilic enzyme which works best around 65–75°C (Fig. 2c). The kinetics of the plasmid digestion shows that 0.5 µg of plasmid are completely digested in about 30 min at 65°C. At a three fold overdigestion (time point 90 min) we did not observe additional restriction fragments indicative of star

Fig. 2 Restriction endonuclease activity of *SuiI*. **a** *SuiI* is a salt-sensitive restriction enzyme.

SuiI is active in the buffers NEB1,2 and 4, but is not active in a buffer containing 100 mM NaCl (NEB3). The digests contained 0.24 µg protein (1 U) and were incubated for 1 h at 65°C. **b** DNA substrate and 0.18 µg protein (0.7 U) were incubated in phosphate buffer (pH 5–8) and Tris buffer (pH 8–10) for 1 h at 65°C. **c** *SuiI* is a thermophilic enzyme with a temperature optimum around 70°C. 1 U of *SuiI* was incubated with plasmid DNA for 30 min in the temperature range from 35 to 85°C. **d** Time course of the plasmid digestion at 65°C. The digests contained 0.24 µg (1 U) and were performed in NEB4 buffer. **e** Heat inactivation of *SuiI*. 0.36 µg of *SuiI* (1.5 U) were incubated for various time spans at 95°C. Then the DNA substrate was added and the reaction was incubated for 30 min at 65°C. The half-life of the enzyme is about 1 h at 95°C (compare lane 60' with lane 120'). Lane—did not contain any enzyme



activity of *SuiI* (Fig. 2d). The enzyme appears to be quite thermostable as we did not find any inactivation after 3 h at 75°C (data not shown). The half-life of the enzyme at 95°C is approximately 1 h (Fig. 2e). Furthermore these and other partial digestions do not indicate that some sites on this DNA substrate are cut more slowly than others.

In order to find the recognition site of *SuiI* we digested pUC-pRN1 and pMJ05 (22 kb). The latter

plasmid is a pBluescript derivative containing the complete sequence of the *Sulfolobus shibatae* virus SSV1 (Jonuscheit et al. 2003) and has also a rather low GC content of 39%. The main fragments of pUC-pRN1 are 3.000, 1.600, 950 and 600 base pairs long. The restriction of pMJ05 by *SuiI* yielded fragments of 10.000, 5.000, 1.600, 1.400 and 550 base pairs (Fig. 3b). The observed restriction fragments are compatible with the restriction recognition site of *TseI* (GCwGC). *TseI* would produce

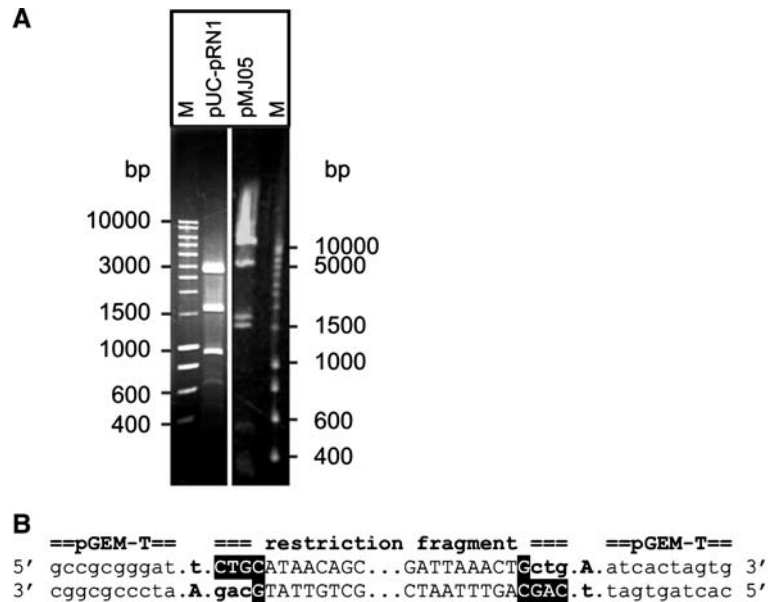


Fig. 3 Determination of the recognition sequence and cutting site of *SuiI*. **a** *SuiI* was incubated with pUC-pRN1 and pMJ05 and the digestion products were separated in an agarose gel. The obtained restriction fragments (see text for details) suggest that *SuiI* recognizes the sequence GCwGC. **b** The restriction fragments were cloned and one clone was sequenced. Shown are the sequences at both vector-insert borders. The sequence in capitals is the sequence of the restriction fragment with the recognition sequence high-

lighted with black background. Before ligation the DNA polymerase filled in the 5' overhang generated by *SuiI* and added an extra adenine base (shown in bold letters) at the 3' ends of the fragment. The first G of the recognition sequence is lost since the enzyme cuts after the first G. The sequence indicates that *SuiI* cuts within the recognition sequence GCwGC after the first G symmetrically on both strands

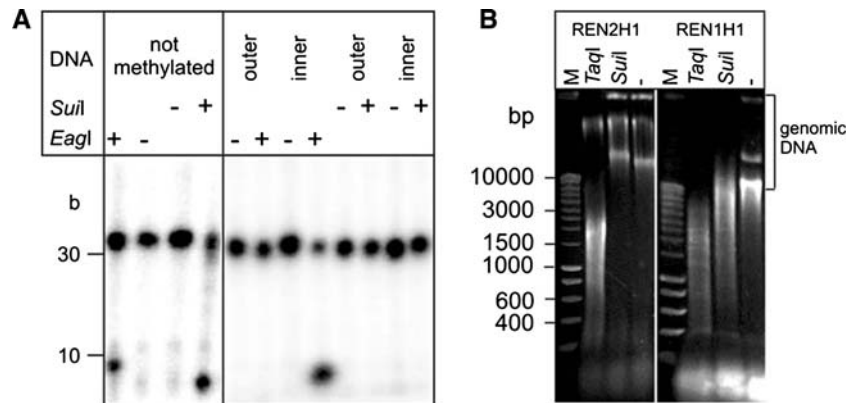


Fig. 4 Restriction of methylated DNA and genomic DNA. **a** Synthetic duplex radioactively labelled DNA was incubated with *SuiI* and *EagI* and analysed in a denaturing polyacrylamide gel. Unmethylated DNA yields restriction fragments of 5 and 9 bases respectively. As expected DNA methylated at the C5 position of the outer cytosine of the recognition sequence is not cut by *EagI*, as

the recognition sites overlap. *SuiI* is not able to restrict either of the methylated DNA substrates. **b** Genomic DNA of *S. islandicus* strain REN2H1 is not cut by *SuiI*. In contrast genomic DNA isolated from strain REN1H1 does not appear to be appropriately methylated and is digested by *SuiI*. Control digestions were performed with *TaqI*

fragments of 2,843, 1,555, 895 and 611 bp as well as smaller fragments from pUC–pRN1 and the major fragments of 10,911, 4,876, 1,591, 1,441 and 611 bp from pMJ05. The observed fragments are in good agreement with the fragments expected from *TseI*. We can exclude the more relaxed recognition site GCnGC of *Fnu4HI*, since this enzyme would produce more fragments. This analysis suggests that *SuiI* has the same recognition site as *TseI*. In order to identify the exact cleavage site of *SuiI* we cloned the restriction fragments of a pUC–pRN1 digestion and sequenced one clone. Before cloning we treated the fragments with Klenow fragment and *Taq* DNA polymerase to polish the ends and to create a single base adenosine 3' overhang. The sequence we obtained is in perfect agreement with a restriction of *SuiI* after the first guanosine of the recognition sequence GCwGC (Fig. 3b). The palindromic sequence is cut symmetrically leaving a three base 5' overhang. The cloned restriction fragment does not contain a further internal recognition site.

Next we investigated the methylation sensitivity of *SuiI*. For this purpose we used complementary deoxynucleotides which had a C5 methylation at the inner and outer cytosine of the recognition sequence. Whereas *SuiI* is able to restrict the unmodified DNA, no restriction is seen with the DNA methylated at the inner nor the outer cytosine. This assay does not allow to conclude whether the corresponding methylase carries out a methylation at the C5 position of the cytosine. In contrast Grogan and coworkers (Grogan 2003) found that *SuaI* is able to restrict C5 methylated cytosine but not N4 methylated cytosine suggesting that the respective methylase does not methylate the C5 position of cytosine.

We were neither able to detect a restriction endonuclease activity in the crude extract of *S. islandicus* strain REN1H1 nor after an attempted purification over phosphocellulose (data not shown). This strain is the host of the plasmids pRN1 and pRN2 which are suitable starting points to construct a *Sulfolobus*–*E. coli* shuttle vector. As a further indication that this strain does not contain *SuiI* restriction activity we could show that genomic DNA of this strain is restricted by *SuiI* (Fig. 4).

In summary, we report the purification and characterisation of the restriction endonuclease *SuiI* from *S. islandicus*. The properties of the enzyme suggest that *SuiI* is a restriction endonuclease of type II. The enzyme is an isoschizomer of *TseI* and *ApeKI* and shares with these enzymes a high temperature optimum. In contrast

SuiI is rather salt-sensitive whereas *TseI* and *ApeKI* have the highest activity in high-salt restriction buffers.

Acknowledgments G. Lipps thanks the DFG for the grant Li 913/3 and G. Krauss for continuing support.

References

- Grogan DW (1989) Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *J Bacteriol* 171:6710–6719
- Grogan DW (2003) Cytosine methylation by the *SuaI* restriction-modification system: implications for genetic fidelity in a hyperthermophilic archaeon. *J Bacteriol* 185:4657–4661
- Ishikawa K, Watanabe M, Kuroita T, Uchiyama I, Bujnicki JM, Kawakami B, Tanokura M, Kobayashi I (2005) Discovery of a novel restriction endonuclease by genome comparison and application of a wheat-germ-based cell-free translation assay: *PabI* (5'-GTA/C) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Nucleic Acids Res* 33:e112
- Jonuscheit M, Martusewitsch E, Stedman KM, Schleper C (2003) A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle vector. *Mol Microbiol* 48:1241–1252
- Keeling PJ, Klenk HP, Singh RK, Feeley O, Schleper C, Zillig W, Doolittle WF, Sensen CW (1996) Complete nucleotide sequence of the *Sulfolobus islandicus* multicopy plasmid pRN1. *Plasmid* 35:141–144
- McConnell DJ, Searcy DG, Sutcliffe JG (1978) A restriction enzyme *ThaI* from the thermophilic mycoplasma *Thermoplasma acidophilum*. *Nucleic Acids Res* 5:1729–1739
- Morgan R, Xiao J, Xu S (1998) Characterization of an extremely thermostable restriction enzyme, *PspGI*, from a *Pyrococcus* strain and cloning of the *PspGI* restriction-modification system in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 64:3669–3673
- Nolling J, van Eeden FJ, Eggen RI, de Vos WM (1992) Modular organization of related archaeal plasmids encoding different restriction-modification systems in *Methanobacterium thermoformicicum*. *Nucleic Acids Res* 20:6501–6507
- Pingoud V, Conzelmann C, Kinzebach S, Sudina A, Metelev V, Kubareva E, Bujnicki JM, Lurz R, Luder G, Xu SY, Pingoud A (2003) *PspGI*, a type II restriction endonuclease from the extreme thermophile *Pyrococcus* sp.: structural and functional studies to investigate an evolutionary relationship with several mesophilic restriction enzymes. *J Mol Biol* 329:913–929
- Prangishvili DA, Vashakidze RP, Chelidze MG, Gabriadze IY (1985) A restriction endonuclease *SuaI* from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEBS Lett* 192:57–60
- Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D (2005) REBASE—restriction enzymes and DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 33:D230–D232
- Zillig W, Kletzin A, Schleper C, Holz I, Janekovic D, Hain J, Lanzendoerfer M, Kristjansson JK (1994) Screening for *Sulfolobales*, their plasmids and their viruses in Icelandic solfataras. *Syst Appl Microbiol* 16:609–628

7.3 Teilarbeit C

Silvia Berkner und Georg Lipps.

An active nonautonomous mobile element in *Sulfolobus islandicus* REN1H1.

Journal of Bacteriology, 189, 2145-2149 (2007).

An Active Nonautonomous Mobile Element in *Sulfolobus islandicus* REN1H1[∇]

Silvia Berkner and Georg Lipps*

Department of Biochemistry, University of Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany

Received 10 October 2006/Accepted 26 November 2006

In the crenarchaeote *Sulfolobus islandicus* REN1H1, a mobile element of 321 bp length has been shown to be active. It does not contain terminal inverted repeats and transposes by a replicative mechanism. This newly discovered element has been named SMN1 (for *Sulfolobus* miniature noninverted repeat transposable element).

Transposable elements are found in all three domains of life, i.e., *Bacteria*, *Eukarya*, and *Archaea*. Especially in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2, a high number of insertion sequence (IS) elements have been identified (5, 6, 11, 13, 17), and so far four of them have been shown to be active in vivo (11). Besides these full-length IS elements, which carry a gene coding for a transposase and thus are able to catalyze their own excision and insertion, mobile elements that are too short to harbor a transposase gene also exist. These elements are called nonautonomous elements, because they can transpose only if a suitable transposase is supplied in *trans* by an autonomous IS element.

Nonautonomous mobile elements were first discovered to be present in *Sulfolobus* by use of a bioinformatic approach. They were identified by searching for small repeat elements in the genome sequence of *S. solfataricus* P2 (13). The detected short elements were classified as miniature inverted repeat transposable elements (MITEs), and the corresponding full-length IS elements were identified based on the similarity of the terminal inverted repeats. The first observation of an active MITE in *Sulfolobus* was made by Blount and Grogan (3), who detected the insertion of a MITE related to ISC1057 and ISC1058 and homologous to an element in the *Sulfolobus solfataricus* P2 genome classified as SM3A (13) in a *Sulfolobus* strain typed as conspecific to *Sulfolobus islandicus* (23).

Besides mobile elements that carry inverted repeats and are thus more easily identified by a bioinformatic approach, there are other types of mobile elements that do not exhibit terminal inverted repeats. Elements with subterminal inverted repeats have been reported (22), as have some classes of IS elements that do not contain inverted repeats at all and that transpose not by a cut-and-paste mechanism but by a mechanism similar to the rolling-circle (RC) replication of some bacterial plasmids, such as the members of the IS91 and IS605/IS200 families (10). Nonautonomous mobile elements that lack terminal inverted repeats are very difficult to detect by bioinformatic approaches, and so far none has been described for *Sulfolobus*.

Sulfolobus solfataricus strains P1 and P2 and *Sulfolobus*

islandicus strains REN1H1, REN2H1, and HVE10/4 (23), and S1 (a *lacS* mutant strain derived from REN1H1) were grown in Brock's basal salts medium at pH 3.5 (4) supplemented with 0.2% arabinose (Fluka) and 0.1% tryptone (BD Biosciences) for liquid medium and with 0.2% dextrin 10 (Fluka) and 0.1% tryptone for plates. For growth of *pyrEF* mutant strains PH1-16 (11), R20, R21, R22, S1R1, and R1 (derived from REN1H1), 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of uracil was added to the medium. Plates were solidified by addition of 0.6% Gelrite (Sigma) and 10 mM CaCl_2 .

Mobile elements were detected by screening for insertions into the *pyrEF* genes, coding for orotidine phosphoribosyltransferase and orotidine-5'-monophosphatedecarboxylase, after plating of *Sulfolobus* cells on Gelrite plates containing 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 5'-fluoroorotic acid (FOA) (Apollo Scientific) and 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ uracil. Colonies obtained after 5 to 7 days of growth at 75°C were cultivated in 200 μl of nonselective medium for 2 to 3 days before genomic DNA was prepared by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation. *pyrEF* genes were amplified by PCR using primers 5'-TTCACCTTTTGTCTATC GAAG and 5'-GTTTATAAAGACCGGCTATT, resulting in a fragment of 1,584 bp containing the promoter region of *pyrB* and the *pyrE* and *pyrF* genes. PCR products differing in length from the wild-type PCR fragment were cloned and sequenced.

Genomic DNA for Southern blots was prepared from 25 ml of exponentially growing *Sulfolobus* cells. Cell pellets were resuspended in 1 ml Tris-EDTA buffer–0.06% *N*-laurylsarcosine–0.8% Triton X-100 and incubated at room temperature for 30 min (18). Cell debris was removed by centrifugation at 15,000 $\times g$ for 30 min at 4°C. The supernatant was treated with RNase for 60 min at room temperature, and then the preparation was extracted once with phenol, with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1), and finally with chloroform. After isopropanol precipitation, the DNA was resuspended in 100 μl of Tris-EDTA buffer. Five micrograms of HindIII-digested DNA was separated on a 0.8% agarose gel. The gel was stained with ethidium bromide before denaturation and capillary transfer to a Hybond N membrane as described by Sambrook and Russel (16). Probes spanning 319 bp of the 321 bp of the insertion sequence were generated using a digoxigenin PCR labeling kit (Roche). Hybridization (50% formamide) and stringency washes (0.5 \times SSC [1 \times SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate]) were carried out either at 42°C and 60°C or at 53°C and 68°C. UV cross-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Biochemistry, University of Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany. Phone: 49-921-552433. Fax: 49-921-552432. E-mail: georg.lipps@uni-bayreuth.de.

[∇] Published ahead of print on 8 December 2006.

linking hybridization was carried out overnight. Detection was done using antidigoxigenin antibodies coupled to alkaline phosphatase with nitroblue tetrazolium-5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Roche) as the substrate. Color development was stopped after 1 to 5 h.

Detection of insertion sequences. Two hundred thirty FOA-resistant colonies of *Sulfolobus islandicus* REN1H1 were screened by PCR. In nine cases, PCR products longer than expected for the wild-type *pyrEF* sequence were observed. All other observed FOA-resistant colonies did not show any difference in PCR product length and were assumed to carry point mutations. Three of the nine insertions showed a length of about 0.3 kb. Sequencing revealed that they are all identical and have a length of 321 bp. This element was named SMN1 (for *Sulfolobus* miniature noninverted repeat transposable element). Two of the other six insertions correspond to an insertion sequence related to ISC796, and the other four correspond to an insertion sequence related to ISC735 (94%/91% transposase sequence identity).

The 321-bp insertions are thought to be nonautonomous, as they are too short to contain a transposase-encoding open reading frame (ORF). The shortest transposases so far described (e.g., TnpA from ISHP608) comprise around 150 amino acid residues (15), which is much longer than a putative open reading frame corresponding to 59 amino acids found in SMN1. Another remarkable feature is the high GC content of SMN1 (54%).

Related sequences. We were not able to identify related characterized IS elements by a standard nucleotide BLAST search or protein BLAST search (1) using only the putative ORF59 sequence (nucleotides [nt] 104 to 280). However, by this database search we found two highly similar sequences in the *Sulfolobus islandicus* plasmids pARN4 and pHVE14 (8) (only one nucleotide mismatch each). In pHVE14 (accession number AJ748324), SMN1 is inserted after nucleotide 31457. It overlaps with the annotated ORF46. All ORFs surrounding SMN1 are annotated as encoding hypothetical proteins. In pARN4 (accession number AJ748323) it is found inserted after nucleotide 25272 (see Fig. 2).

In the *Sulfolobus solfataricus* P2 genome, several similar sequences were detected, but they never spanned the full length of SMN1 and had a lower degree of similarity (five hits spanning more than 50 nt with 81% to 89% similarity). These hits did not map to annotated open reading frames, nor were any ORFs found repeatedly adjacent to the sequences similar to SMN1. No similar sequences of more than 50 nt in length were found in the other sequenced *Sulfolobus* genomes.

Presence in other species and strains. The occurrence of the insertion sequence in other, not-yet-sequenced *S. islandicus* and *S. solfataricus* strains was examined by Southern blotting (Fig. 1). At least eight copies of the element could be identified in the *Sulfolobus islandicus* REN1H1 wild-type strain and a variety of mutant strains. In the three mutant strains showing the insertion of SMN1 in the *pyrEF* genes (R20, R21, and R22), three additional bands in comparison to those in the wild-type strain were detected. The presence of the same three additional bands in the three different isolates makes it very probable that they all originate from one transposition event. As none of the bands present in the wild type disappeared, the element probably moves not by a cut-and-paste mechanism but

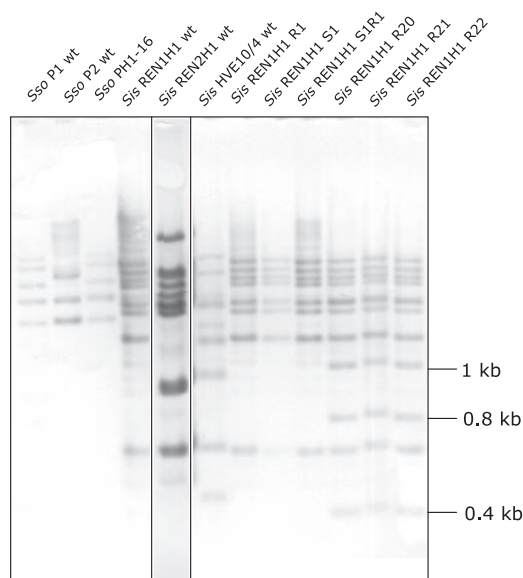


FIG. 1. Southern blotting using a probe spanning nucleotides 2 to 321 of the SMN1 sequence with several different *Sulfolobus* species, strains, and mutants. Genomic DNA was digested with HindIII. PH1-16 has been described by Martusewitsch et al. (11). R1 is a *pyrEF* mutant, S1 is a *lacS* mutant, and S1R1 is a *pyrEF lacS* double mutant (unpublished).

by some process involving the replication of the element. One of the additional bands has a predicted length of about 1.1 kb, corresponding to the HindIII fragment of the *pyrB* and *pyrE* genes (755 bp) plus the insertion sequence (321 bp). The other observed restriction fragments are 0.8 and 0.4 kb long and correspond to insertions of the element in other unidentified genomic regions. Other *pyrEF* or *lacS* mutants of strain REN1H1 were also examined by Southern blotting but showed the same pattern as the wild type, indicating that the element had not been active. In *S. islandicus* strains REN2H1 and HVE10/4, eight copies of similar sequences were identified by the blot. For *S. solfataricus*, strain P1 and the derived *pyrEF/lacS* mutant PH1-16 as well as strain P2 were examined. Both P1 strains produced the same five bands, whereas for P2 three similar sequences were detected. For P2 the genomic sequence and the size of the restriction fragments on the blot were compared and found to correspond to the best BLAST hits. Hybridization and stringency washes were carried out under standard conditions (42°C/60°C). Additional experiments were done using more stringent conditions yielding only a positive signal at about 90% similarity. Under the higher-stringency conditions all *S. islandicus* REN1H1 strains, as well as REN2H1 and HVE10/4, showed the same bands as in Fig. 1, while no bands were detected for *S. solfataricus* P1, P2, or PH1-16.

Insertion sites and target site duplication. The three different insertion sites are shown in Fig. 2. The consensus for insertion of SMN1 shown by all three target sites is TTT/A. In the case of the *pyrB* and *pyrEF* genes, the promoter region has been studied in detail and BRE and TATA boxes have been identified (20). SMN1 has inserted into the TATA box of the *pyrEF* genes and probably blocks the transcription of the genes causing the FOA-resistant phenotype. In plasmids pARN4 and

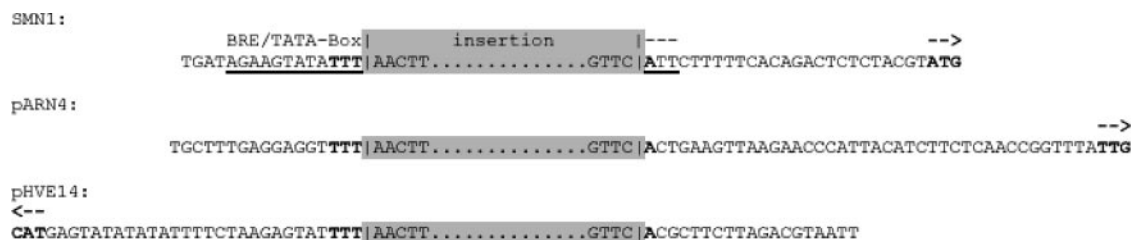


FIG. 2. Alignment of sequences adjacent to the insertion sites of SMN1 in the three identical insertions reported here and in the plasmids pHVE14 and pARN4. For SMN1 inserted into the *pyrE* promoter region, the BRE and TATA boxes are underlined and the start codon of *pyrE* is indicated by an arrow and boldface. For both plasmid sequences the starts of putative open reading frames downstream and upstream of the insertion site are also indicated by arrows and boldface. The consensus sequence of the insertion site (TTT/A) is also shown in boldface.

pHVE14 the elements are also found in intergenic regions, and putative open reading frames start 40 bp downstream of the insertion in pARN4 and 28 bp upstream in pHVE14. Thus, the element likely also inserted into the promoter regions of these putative open reading frames.

As all known right-end flanking sequences of SMN1 show an A (Fig. 2) and the sequence of the element also starts with an A, it is impossible to distinguish whether a single base is duplicated or no target site duplication occurs at all. So far, no insertion sequence that produces a target site duplication of one

nucleotide has been described (10; IS Finder [http://www-is.biotoul.fr/]).

Similarities to known elements. As no terminal inverted repeats are present in the element and no characterized sequences showed similarity to SMN1, we tried to find some characteristics that would allow classification of the element. The lack of terminal inverted repeats narrowed down the number of IS families under consideration to the IS91 family of RC transposons, which have as eukaryotic counterparts the helitrons (9), and the IS605/IS200 family.

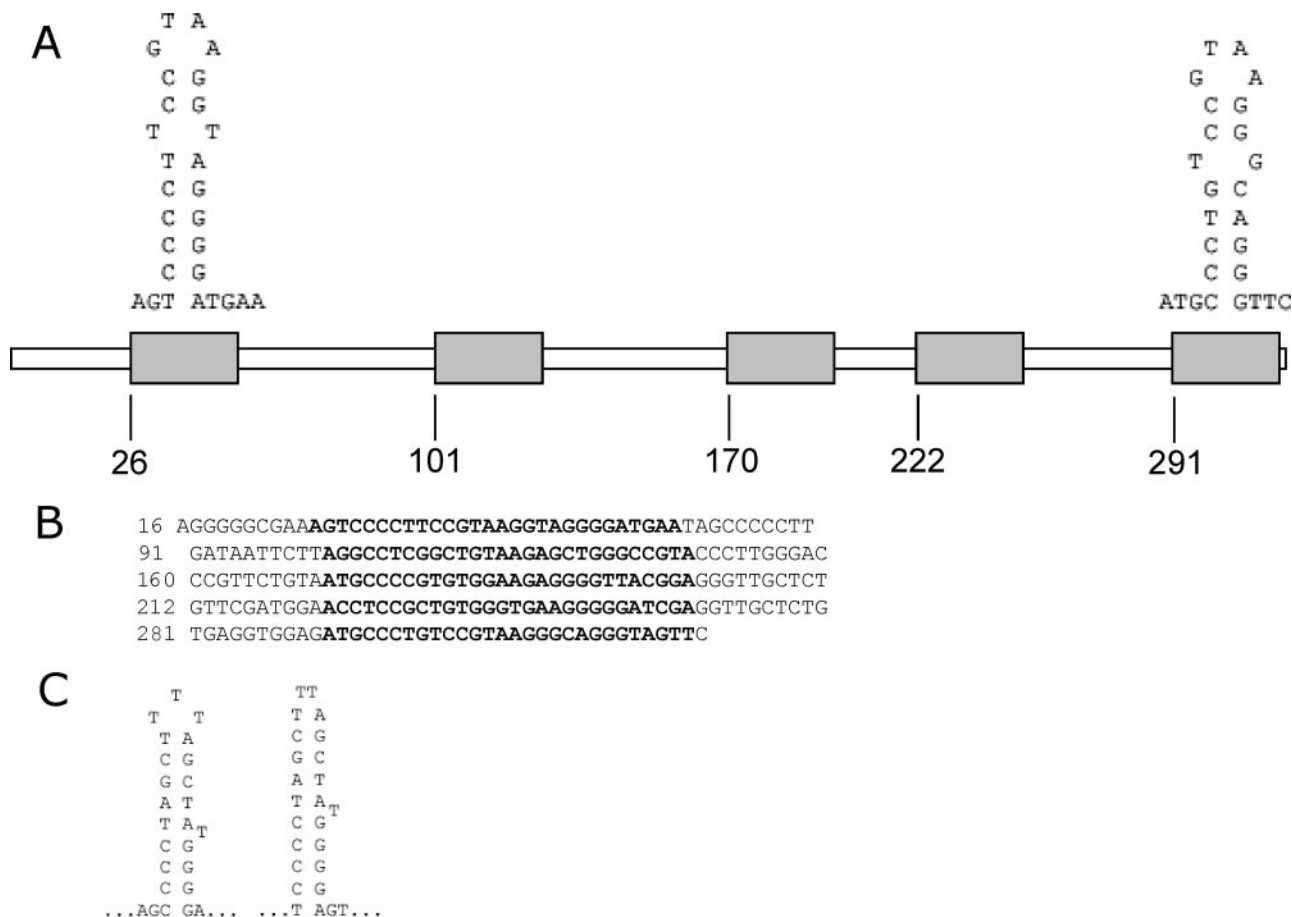


FIG. 3. (A) Distribution of the 28-bp repeats identified by MEME search (gray boxes) within SMN1. For the first and the last repeats, possible hairpin structures are shown above. (B) Alignment of the sequences of the repeats (boldface) from panel A. (C) Hairpin structures from ISHp608 (15).

Characteristics of the members of IS family IS91 (10, 12, 14, 19) are relatively constant 3' ends (right ends in Fig. 2 and 3) and variations in 5' ends except for a well-conserved 20- to 25-bp stretch. The IS inserts behind a specific tetranucleotide sequence identical to the last four nucleotides found on the other end of the element (19). No target site duplication occurs upon insertion. RC transposons also have been described for eukaryotes (7, 9). Common features are the target site 5' A/T, no target site duplication, and no terminal inverted repeats. They begin with the sequence 5'-TC and end with CTRR-3'. Palindromes of 16 to 20 nt separated by 10 to 12 nt from the 3' ends are found. The majority of family members are nonautonomous internal deletion variants of small size (0.5 to 3 kb), whereas intact variants are large (5.5 to 15 kb).

When comparing SMN1 to the above-described mobile elements one can conclude that SMN1 shows features of both prokaryotic and eukaryotic RC transposons. The target site (TT)T/A is similar to eukaryotic RC transposons. Probably no target site duplication occurs, and no terminal inverted repeats are found, like for IS91 and eukaryotic RC transposons. The right-end sequence (GTTC) of SMN1 is identical to the sequence found in the IS91 family (IS1294) (19); the left-end sequence does not fit any known IS. Subterminal hairpin structures can be found on the right end, as has been described for the IS91 family (e.g., for nucleotides 316 to 296 a 6-bp stem and 9-nt loop or for nucleotides 315 to 292 a 10-bp stem [two imperfect] and 4-nt loop). Also on the left end subterminal hairpin structures can be found, reminiscent of helitrons, which have palindromic sequences on their 3' ends (e.g., for nucleotides 13 to 40 an 11-bp stem [two imperfect] and 6-nt loop, which matches the given numbers for helitrons).

Another possibility for classifying SMN1 is to put it into the IS605/IS200 group, the other IS family that does not show terminal inverted repeats and has no target site duplication. By use of a MEME motif search (2), subterminal imperfect direct repeats of 28 bp in length were identified, which are able to form hairpin structures. These subterminal hairpin structures show some similarity to IS605 family transposons from *Helicobacter pylori* (ISHp608) (21) (Fig. 3). The transposase of ISHp608 has been shown to bind to these hairpin structures (21) and catalyze single-strand breaks at each hairpin. The mechanism of replication of ISHp608 is not identical to the rolling-circle mode of replication, but they might have some steps in common (15).

Excision of SMN1. The excision of SMN1 appears to be a very rare event. We were not able to obtain any revertants of the *pyrEF* mutants by plating on selective medium without uracil. However, when we used the mutant strain with SMN1 inserted into the *pyrEF* genes as the recipient strain for transformation by electroporation, several colonies were obtained on selective medium. The length of the *pyrEF* PCR product had decreased to the wild-type *pyrEF* length. Sequencing of this PCR product showed that SMN1 had been completely removed, restoring the original *pyrEF* sequence.

There are two possible ways for a miniature transposable element to be created. One possible way is the loss of internal sequence parts and thus the sequence coding for the transposase gene. The other possibility is the acquisition of the flanking regions necessary as recognition sites for transposition by an internal unrelated sequence region, which can then be

mobilized (6). Since database searches of the P2 genome comprising the whole 321-bp sequence of SMN1 reveal only sequences that do not comprise the terminal parts of the element and since searches conducted only with the terminal sequences yield different hits, the latter possibility might be true for SMN1. The availability of the genome sequence of an *S. islandicus* strain will probably help to unravel the element responsible for mobilization of SMN1.

Nucleotide sequence accession number. The sequence of SMN1 has been deposited in GenBank under accession number EF127252.

This work was supported by the DFG (grant Li913/3 to G.L.).

REFERENCES

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
- Bailey, T. L., and C. Elkan. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers, p. 28–36. *In* R. Altman, D. Brutlag, P. Karp, R. Lathrop, and D. Searls (ed.), *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. AAAI Press, Menlo Park, CA.
- Blount, Z. D., and D. W. Grogan. 2005. New insertion sequences of *Sulfolobus*: functional properties and implications for genome evolution in hyperthermophilic archaea. *Mol. Microbiol.* **55**:312–325.
- Brock, T. D., K. M. Brock, R. T. Belly, and R. L. Weiss. 1972. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Microbiol.* **84**:54–68.
- Brügger, K., P. Redder, Q. She, F. Confalonieri, Y. Zivancovic, and R. A. Garrett. 2002. Mobile elements in archaeal genomes. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**:131–141.
- Brügger, K., E. Torarinsson, P. Redder, L. Chen, and R. A. Garrett. 2004. Shuffling of *Sulfolobus* genomes by autonomous and non-autonomous mobile elements. *Biochem. Soc. Trans.* **32**:179–183.
- Feschotte, C., and S. R. Wessler. 2001. Treasures in the attic: rolling circle transposons discovered in eucaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:8923–8924.
- Greve, B., S. Jensen, K. Brügger, W. Zillig, and R. A. Garrett. 2004. Genomic comparison of archaeal conjugative plasmids from *Sulfolobus*. *Archaea* **1**:231–239.
- Kapitonov, V., and J. Jurka. 2001. Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:8714–8719.
- Mahillon, J., and M. Chandler. 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:725–774.
- Martusewitsch, E., C. W. Sensen, and C. Schleper. 2000. High spontaneous mutation rate in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by transposable elements. *J. Bacteriol.* **182**:2574–2581.
- Mendiola, M. V., I. Bernales, and F. de la Cruz. 1994. Differential roles of the transposon termini in IS91 transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:1922–1926.
- Redder, P., Q. She, and R. A. Garrett. 2001. Non-autonomous mobile elements in the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* **306**:1–6.
- Richter, G. Y., K. Bjöklöf, M. Romantschuk, and D. Mills. 1998. Insertion specificity and trans-activation of IS801. *Mol. Gen. Genet.* **260**:381–387.
- Ronning, D. R., C. Guynet, B. Ton-Hoang, Z. N. Perez, R. Ghirlando, M. Chandler, and F. Dyda. 2005. Active site sharing and subterminal hairpin recognition in a new class of DNA transposases. *Mol. Cell* **20**:143–154.
- Sambrook, J., and D. Russel. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schleper, C., R. Roder, T. Singer, and W. Zillig. 1994. An insertion element of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* transposes into the endogenous beta-galactosidase gene. *Mol. Gen. Genet.* **243**:91–96.
- She, Q., X. Peng, W. Zillig, and R. A. Garrett. 2001. Gene capture in archaeal chromosomes. *Nature* **409**:478.
- Stedman, K. M., C. Schleper, E. Rumpf, and W. Zillig. 1999. Genetic requirements for the function of the archaeal virus SSV1 in *Sulfolobus solfataricus*: construction and testing of a viral shuttle vector. *Genetics* **152**:1397–1405.
- Tavakoli, N., A. Comanducci, H. M. Dodd, M.-C. Lett, B. Albiger, and P. Bennett. 2000. IS1294, a DNA element that transposes by RC transposition. *Plasmid* **44**:66–84.
- Thia-Toong, T.-L., M. Roovers, V. Durbecq, D. Gigot, N. Glansdorf, and D. Charlier. 2002. Genes of de novo pyrimidine biosynthesis from the hyper-

- thermophilic crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius*: novel organization in a bipolar operon. *J. Bacteriol.* **184**:4430–4441.
21. **Ton-Hoang, B., C. Guynet, D. R. Ronning, B. Cointin-Marty, F. Dyda, and M. Chandler.** 2005. Transposition of *ISHp608*, member of an unusual family of bacterial insertion sequences. *EMBO J.* **24**:3325–3338.
22. **Tu, Z., and S. P. Orphanides.** 2001. Microuli, a family of miniature sub-terminal inverted-repeat transposable elements (MSITES): transposition without terminal inverted repeats. *Mol. Biol. Evol.* **18**:893–895.
23. **Zillig, W., A. Kletzin, C. Schleper, I. Holz, D. Janekovic, J. Hain, M. Lanzendörfer, and J. K. Kristiansson.** 1994. Screening for Sulfolobales, their plasmids, and their viruses in Icelandic solfataras. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**:606–628.

7.4 Teilarbeit D

Silvia Berkner, Dennis Grogan, Sonja-Verena Albers und Georg Lipps.

Small multicopy, non-integrative shuttle vectors based on the plasmid pRN1 for *Sulfolobus acidocaldarius* and *Sulfolobus solfataricus*, model organisms of the (cren-)archaea.

Nucleic Acids Research, doi:10.1093/nar/gkm449, 1-12 (2007).

Small multicopy, non-integrative shuttle vectors based on the plasmid pRN1 for *Sulfolobus acidocaldarius* and *Sulfolobus solfataricus*, model organisms of the (cren-)archaea

Silvia Berkner¹, Dennis Grogan², Sonja-Verena Albers³ and Georg Lipps^{1,*}

¹Department of Biochemistry, University of Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany, ²Department of Biological Sciences, University of Cincinnati, OH 45221-0006, USA and ³Department of Molecular Microbiology, University of Groningen, 9751 NN Haren, The Netherlands

Received March 20, 2007; Revised May 14, 2007; Accepted May 18, 2007

ABSTRACT

The extreme thermoacidophiles of the genus *Sulfolobus* are among the best-studied archaea but have lacked small, reliable plasmid vectors, which have proven extremely useful for manipulating and analyzing genes in other microorganisms. Here we report the successful construction of a series of *Sulfolobus*–*Escherichia coli* shuttle vectors based on the small multicopy plasmid pRN1 from *Sulfolobus islandicus*. Selection in suitable uracil auxotrophs is provided through inclusion of *pyrEF* genes in the plasmid. The shuttle vectors do not integrate into the genome and do not rearrange. The plasmids allow functional overexpression of genes, as could be demonstrated for the β -glycosidase (*lacS*) gene of *S. solfataricus*. In addition, we demonstrate that this β -glycosidase gene could function as selectable marker in *S. solfataricus*. The shuttle plasmids differ in their interruption sites within pRN1 and allowed us to delineate functionally important regions of pRN1. The *orf56/orf904* operon appears to be essential for pRN1 replication, in contrast interruption of the highly conserved *orf80/plrA* gene is tolerated. The new vector system promises to facilitate genetic studies of *Sulfolobus* and to have biotechnological uses, such as the overexpression or optimization of thermophilic enzymes that are not readily performed in mesophilic hosts.

INTRODUCTION

Sulfolobus, a genus of thermoacidophilic crenarchaeotes, has provided much of the information currently available

on the physiology and molecular biology of archaea from geothermal environments. Seminal studies of *Sulfolobus* spp. have addressed, for example, chromatin-binding proteins (1,2), replication (3), cell cycle (4), repair (5), transcription (6), translation (7,8) as well as metabolism (9). The genome sequences of three species, *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus tokodaii* and *Sulfolobus acidocaldarius*, have been published (10–12). Microarrays for these organisms are commercially available and proteomic studies have been undertaken (13,14).

On a practical level, these advances reflect the relative ease with which *Sulfolobus* spp. are manipulated in the laboratory. *Sulfolobus* cells can be grown aerobically and heterotrophically on a variety of complex and defined carbon sources, either in liquid media or on plates, with doubling times as short as a few hours. Since *Sulfolobus* spp. are hyperthermophiles with optimal growth temperatures around 80°C, their proteins are intrinsically stable and resistant to proteolysis. As a result, *Sulfolobus* enzymes expressed in mesophilic hosts can often be purified with the aid of a heat step, which removes most proteins of the host. The structural rigidity of thermophilic proteins also appears to be an advantage for crystallization, which is a prerequisite for X-ray analysis of 3D structure.

Ultimately, however, the comprehensive study of molecular phenomena in any organism requires genetic analysis and manipulation *in vivo*. Although numerous plasmids and viruses have been reported in *Sulfolobus* spp., the development of these natural genetic elements into experimentally useful tools for *Sulfolobus* has lagged behind the corresponding progress made with methanogenic and halophilic archaea (15). Although different plasmid and virus-based vectors have been constructed (16–21), to our knowledge only SSV1-based viral vectors (20–22) have been successfully applied by other groups to analyze genes *in vivo*.

*To whom correspondence should be addressed: Tel: +49 921 552433, Fax: +49 921 552432, Email: Georg.Lipps@uni-bayreuth.de

We used the plasmid pRN1 as starting point to construct shuttle vectors for *Sulfolobus*. This plasmid is notable for its relatively small size (5.4 kb), copy numbers ranging from 10 to 20 in mid-log phase, and the three genes (*orf56*, *orf80* and *orf904*) that are conserved in other *Sulfolobus* plasmids. In previous work, we have analyzed the three conserved proteins (representing two DNA-binding proteins and the replication protein) and the transcriptional activity of the plasmid (23–25). Those studies revealed that ORF56 binds upstream of its own gene and down-regulates the expression of the co-transcript *orf56/orf904* (26). It therefore appears that ORF56 could be involved in regulating the copy number of the plasmid. Similarly, ORF80 is a sequence-specific DNA-binding protein, but the physiological function of this protein has remained unclear. *Orf904* encodes the third conserved protein, a multifunctional 110-kDa replication enzyme that appears to play a central role in replication. However, neither the exact molecular mechanism of replication nor the replication origin is known for pRN1.

These questions would be open to experimental study *in vivo* by the availability of successful *Escherichia coli*–*Sulfolobus* shuttle vectors, but the lack of this information also makes it difficult to predict which features of pRN1 must be preserved in constructing such vectors. We therefore took an empirical approach, in which an artificial transposon was inserted at many locations around pRN1. The resulting plasmids provided a series of potential shuttle vectors differing only in the relative location and orientation of inserted genes, from which the best-performing constructs were identified. The series also provided a way to reveal experimentally which regions of pRN1 may be important for successful propagation in *Sulfolobus* hosts.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions

This study used *S. solfataricus* strains PH1-16 (27) and PBL2025 (28), *S. islandicus* strains REN1H1 (29) R1, R20, S1, R1S1 and HVE10/4 H1 (this study), and *S. acidocaldarius* MR31 (30). Liquid cultures were grown in Brock's basal salts medium at pH 3.5 (31) or the mineral base of Grogan and Gunsalus (32), supplemented with different carbon and nitrogen sources as indicated. Acid-hydrolyzed casein, i.e. NZAmine AS (Sigma), or enzymatically hydrolyzed casein, i.e. tryptone (BD Biosciences), were added at 0.1%. D-(+)-xylose was added at 0.2%, and D-(+)-lactose in 'lactose-only' medium at 0.4%. For growth of untransformed *pyrEF* mutant strains PH1-16, R20, S1R1, R1, H1 and MR31, 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of uracil was added to the medium. Plates were solidified by addition of 0.6% Gelrite (Sigma) and 10 mM CaCl_2 . Plates and shake flask cultures were incubated at 75°C.

Random insertion into pRN1

The Tn5-derived transposon TnPA21 (33) was amplified by PCR using a primer (5'-CTGTCTCTTATACAC ATCT) complementary to the mosaic end sequence, the

terminal inverted repeat sequence found on both ends of the transposon. Native pRN1 (accession number NC 001771) was isolated from a culture of *S. islandicus* REN1H1 containing only the pRN1 plasmid (34) using the Nucleo Spin plasmid extraction Kit (Macherey Nagel). Plasmid preparations from ~100 ml of culture were combined and ethanol-precipitated to obtain 0.1 μg of pRN1 for the transposition reaction. The transposition reaction was carried out *in vitro* using the EZ-Tn5 transposase (Epicentre) according to the instructions of the manufacturer. Transposon and plasmid were mixed at a molar ratio of 1:1. The transposition reaction products were transformed into *E. coli* EC100 *pir*⁺ (Epicentre). The resulting transformants were screened for correctly inserted transposons by restriction digestion with *SacI* and *NotI*. Twenty percent of the screened colonies (a total of 80 plasmids) showed two restriction bands with a combined length of 7.2 kb and were kept for further analysis.

Construction of pA–pN and pJlacS

Thirteen of the 80 constructs were chosen after more precise mapping of the insertion sites by restriction digestion. From these, the *E. coli* replicon (R6K γ origin of replication and *cat* gene) introduced by TnPA21 was excised using the *NotI* and *PspOMI* sites present on the ends of the transposon sequence. The resulting pRN1 fragments interrupted at different sites were then cloned into the *NotI* linearized vector delta2pyrEF. The plasmid delta2pyrEF is a derivative of pBluescript with the *lacZ* and *f1* origin regions deleted. Specifically, pBluescriptSKII(+) was cut with *SspI* and *KpnI*, re-ligated, cut with *SacI* and *SapI* and re-ligated. The *pyrEF* genes from *S. solfataricus* P2 (plasmid pBSKP-pyrEF, generously provided by Christa Schleper) were cloned into the *SaI* and *PstI* sites. For constructs pA to pN the transitional region from the delta2pyrEF part to the pRN1 part was sequenced to determine the exact insertion site and the direction of the transposon insertion and the direction of the cloning into the *NotI* site of delta2pyrEF. In construct pG, by restriction analysis using *HindIII* an additional *HindIII* site was found to be present and confirmed by sequencing. As the pRN1 part was not PCR-amplified, but stems from the native plasmid, we conclude that pRN1 had this mutation already when isolated, or that this mutation was introduced in *E. coli* during propagation of pG. Except for this point mutation, pG corresponds to the expected sequence.

To construct pJlacS we cloned the *tf55alacS* expression cassette (20) into the unique *SacII* restriction site of pJ.

Methylation of plasmids

For transformation into *S. acidocaldarius* shuttle constructs were methylated at the N4-position of the inner cytosine residues of GGCC recognition sequences to circumvent restriction by the *SuaI* restriction enzyme (35). Plasmids were methylated *in vivo* as previously described (36) by transforming the shuttle constructs into *E. coli* ER1821 (New England Biolabs) bearing the

additional plasmid pM.EsaBC4I (New England Biolabs). Complete methylation was confirmed by the absence of any cutting after incubation with 5 U HaeIII for 1–4 h.

Electroporation

Constructs were electroporated either using a Gene Pulser I or Gene Pulser II (BioRad) following the protocol of Schleper *et al.* (1992) or using a Gene Pulser Xcell (BioRad) with a constant time protocol with input parameters 1500 V, 10.2 ms, 2 mm cuvettes or using the protocol described by Kurosawa and Grogan (36) (1250 V, 1000 Ω , 25 μ F, 1 mm cuvettes). For *S. acidocaldarius*, regeneration was done for 30–40 min in tryptone/xylose medium, water or recovery solution before plating on tryptone/xylose plates or NZAmine/xylose plates. Best results were obtained with recovery solution. Recovery solution was prepared as a 2 \times concentrated solution (= 1% sucrose, 20 mM β -alanine/1.5 mM malate buffer, pH 4.5, 10 mM MgSO₄). Directly after electroporation the 50 μ l cell suspension was mixed in the cuvette with 50 μ l of 2 \times recovery solution (room temperature), transferred into a 1.5-ml tube and incubated for 30 min at 75°C in a benchtop shaker at 600 r.p.m. before plating the cells. For lactose utilization in *S. solfataricus*, plating after electroporation was not feasible. Instead, electroporated cells were regenerated for 10 min in 1 ml of Millipore water (pre-warmed) at 75°C and then directly transferred into pre-heated lactose medium and cultivated in 50 ml flasks.

Retransformation

One microliter of genomic DNA preparation or 1–5 μ l of plasmid prepared from *Sulfolobus* by alkaline lysis were transformed into RbCl-competent *E. coli* XL1-Blue cells or into the *mcrBC* deficient *E. coli* strain ER2267 (New England Biolabs).

Plasmid copy number determination

Copy numbers of the different shuttle constructs were determined as already described (26) by qPCR and cell number determination through plating, respectively.

Southern blots

Genomic DNA was prepared from 1 ml of culture using the Chemagic DNA Bacteria Kit (Chemagen, Baesweiler, Germany) according to the instructions of the manufacturer. After digestion with either HindIII for constructs pA–pN or SacI for pJlacS restriction fragments were resolved in 1% agarose gels, transferred to a Hybond N membrane (Amersham) by capillary transfer, fixed by UV irradiation for 5 min on a UV transilluminator and hybridized to digoxigenin-labeled probes complementary to the *pyrE* gene (position 9–320 from the start of the *pyrE* gene from *S. solfataricus* P2) and pRN1 (position 4892–5048 in pRN1) for pA to pN or *lacS* (position 1124–1438 from the start of the *lacS* gene from *S. islandicus* REN1H1) and pRN1 for pJlacS. Labeling, hybridization (50% formamide, 42°C), washing (0.5 \times SSC, 60°C) and detection was done using the

PCR DIG Probe Synthesis Kit and the Digoxigenin Labeling and Detection Kit (Roche).

Colony hybridization

Colonies from plates were transferred to Hybond N membranes and subsequently incubated for 10 min on a filter paper soaked with 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl then for 10 min on a filter paper soaked with 1 M Tris–HCl (pH 7.5), 1.5 M NaCl, then for 5 min on a filter paper soaked with 10 \times SSC. Membranes were cross-linked for 5 min on the 10 \times SSC filter paper using a transilluminator. Hybridization and detection were done as described for Southern blots with pRN1-specific probes.

β -Galactosidase assay

For convenience, the broad-specificity β -D-glycosidase (37,38) encoded by the *S. solfataricus lacS* gene was assayed as β -galactosidase activity. Crude extracts were prepared by a freeze–thaw method (20) in which cells were re-suspended in 50 mM Na-phosphate buffer, pH 7, and subjected to five freeze–thaw cycles (–196°C/+50°C). After centrifugation for 30 min at 13 000 r.p.m. the supernatant was stored at –20°C, or assayed directly. All β -galactosidase assays were conducted in triplicate in a 75°C bench top shaker. The reaction mixture consisted of 1 μ l of crude extract (or water for blanks), 92 μ l of 50 mM Na-phosphate buffer, pH 7 and the assay was started by addition of 7 μ l of 12 mg ml^{–1} ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) solution. Incubation was continued for 5 min before the tubes were rapidly cooled on ice and 100 μ l of 1 M Na₂CO₃ solution was added to stop the reaction. Concentration of ONPG was subsequently determined in a 96-well plate in a plate reader at 410 nm using a standard curve generated with ONPG. Protein concentration of the crude extracts was determined by the method of Ehresmann (39).

X-gal staining

A qualitative β -galactosidase assay was based on hydrolysis of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal). For liquid cultures, 200 μ l of culture were mixed with 20 μ l of substrate solution (20 mg/ml in dimethylformamide) and incubated at 75°C until color development was observed. To score colonies, plates were sprayed with the same X-gal solution and incubated at 75°C.

Stability measurements

Small cultures (0.2-ml each) were produced under selective conditions by transferring colonies from selective plates to xylose/tryptone medium without uracil. After 2 days of incubation, the cultures ($n = 2$ to 4 per construct) were sampled, diluted in sterile buffer and plated on plates with and without uracil supplementation; from the resulting colony counts, the numbers of Pyr⁺ and Pyr[–] cells in the population was determined. The process was repeated after two cycles of transfer to uracil-supplemented liquid medium (3% inoculum), each involving growth to a final density of $\sim 4 \times 10^8$ CFU/ml. This resulted in a total of three measurements per population

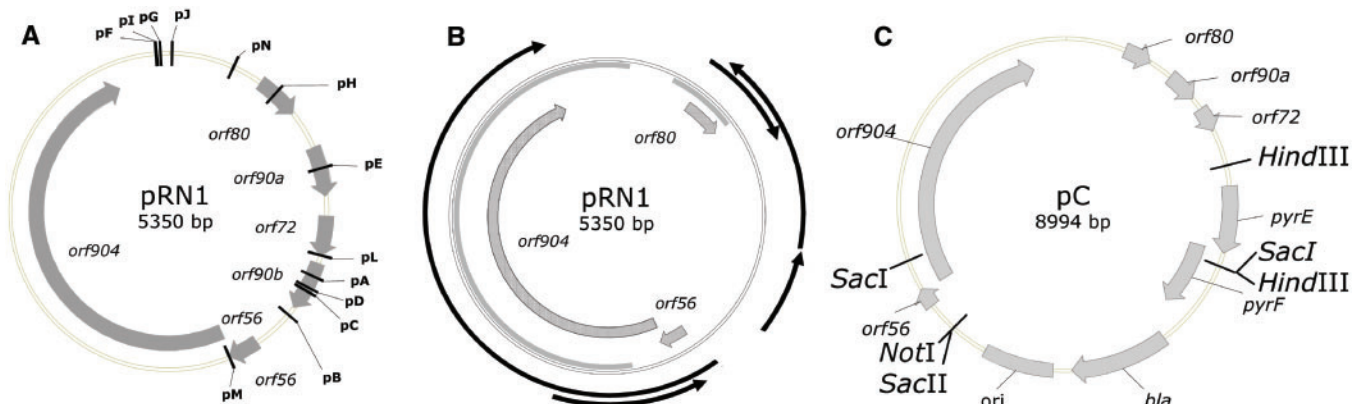


Figure 1. Physical maps. (A) Positions of the insertion sites of the *E. coli* replicon and the *pyrEF* marker genes for shuttle vectors pA–pN. (B): Conserved features of pRN1: thick arrows: conserved open reading frames, gray area: conserved on the nucleotide level within the pRN family plasmids, black arrows: transcripts. (C) Vector map of the shuttle construct pC. Positions of the restriction sites are (clockwise from the top): HindIII (1849), SacI (2792), HindIII (2833), SacII (5374), NotI (5380), SacI (6349).

and an overall numerical expansion under non-selective conditions of $\sim 10^3$.

RESULTS

Construction of shuttle vectors

In principle, shuttle vectors can be constructed from two plasmids that replicate in different hosts simply by fusing them at two points that preserve all the important functions of each plasmid. However, in the case of pRN1, it was not clear which ORFs or intergenic regions may be important for successful replication in *Sulfolobus* hosts. We therefore used transposition to generate pRN1 constructs interrupted at a number of different sites without regard to the location or its sequence context. From the initial transposition mixture, 13 distinct insertion points were chosen for further development, which included addition of the *pyrEF* genes of *S. solfataricus* as selectable marker (Figure 1, Table 1). In addition to providing more chances for a successful construct, this unbiased approach allowed us to evaluate possible differences in the performance of the vector constructs in *Sulfolobus*. This would provide some of the first functional data regarding which of the conserved open reading frames are important for plasmid replication and maintenance.

As we expected the replication operon *orf56/orf904* to be essential, only one construct interrupted within this region was chosen for analysis. The other constructs were chosen to have the interruption sites distributed as evenly as possible over the remaining part of pRN1. The open reading frames *orf80*, *orf90a*, *orf72* and *orf90b* are also interrupted in at least one construct. We have already shown that *orf90a*, *orf72* and *orf90b* are very unlikely to play a role in plasmid replication or maintenance in view of their very low levels of expression (26).

Recipient strains

The plasmids pA–pN were electroporated into *Sulfolobus* strains representing different species. As the *S. solfataricus*

Table 1. Insertion sites of the transposon in constructs pA–pN

Plasmid	Direction of <i>pyrEF</i> genes	Insertion of transposon (position in pRN1)	Interruption	Adjacent unique restriction sites for cloning of inserts
pA	+	1693 1694	<i>orf90b</i>	NotI/SacII
pB	–	1940 1939	intergenic	NotI/XmaI
pC	+	1778 1779	<i>orf90b</i>	NotI/SacII
pD	+	1758 1759	<i>orf90b</i>	NotI/XmaI
pE	+	1098 1099	<i>orf90a</i>	NotI/SacII
pF	–	5284 5283	intergenic	NotI/SacII
pG	+	5309 5310	intergenic	NotI/SacII
pH	+	621 622	<i>orf80</i>	NotI/SacII
pI	–	5290 5289	intergenic	NotI/XmaI
pJ	+	12 13	intergenic	NotI/SacII
pL	–	1573 1572	<i>orf72</i>	NotI/XmaI
pM	+	2334 2335	<i>orf56/orf904</i>	NotI/SacII
pN	+	355 356	intergenic	NotI/SacII

Direction of the *pyrEF* genes (+ same direction as *orf56/orf904*) as well as two unique adjacent restriction sites are given.

pyrEF genes provide the selectable marker, stable uracil auxotrophs were needed as recipient strains. Table 2 gives an overview of the *Sulfolobus pyrEF* mutants tested as recipients for the various pRN1 constructs.

For *S. solfataricus* PH1-16 and the different *S. islandicus* mutants, the vectors seemed to be unstable, as only very low amounts of shuttle vector could be detected in some experiments. We did observe growth under selective conditions and positive PCR reactions with pRN1-specific primer pairs, but never observed positive results in Southern blots. Thus, the transformed cells seemed to lose the vector rapidly, and the continued growth observed on uracil-free medium may have been due to reversion, or recombinational conversion of the *pyrEF* mutations to the wild-type sequence.

For *S. acidocaldarius* MR31, electroporation yielded distinct, rapidly growing colonies on uracil-deficient plates, and growth of these primary transformants was maintained in uracil free-liquid medium (tryptone/xylose

Table 2. *Sulfolobus* species and strains tested as recipient strains for the shuttle constructs pA–pN

<i>Sulfolobus</i> species and strain	Mutant name	Gene	Type of mutation		Reference	Successful with
<i>S. acidocaldarius</i>	MR31	<i>pyrE</i>	Deletion	18-bp deleted	(30)	pA–pN, p <i>lacS</i>
<i>S. islandicus</i> REN1H1	R1	<i>pyrE</i>	Point mutations		S. Berkner and G. Lipps, unpublished results	
<i>S. islandicus</i> REN1H1	R20	<i>pyrEF</i>	Insertion sequence	SMN1 in promoter region	(43)	
<i>S. islandicus</i> REN1H1	S1R1	<i>pyrEF/lacS</i>	Point mutations/ frame shift		S. Berkner and G. Lipps, unpublished results	p <i>lacS</i>
<i>S. islandicus</i> HVE10/4	H1	<i>pyrEF</i>	Point mutations		S. Berkner and G. Lipps, unpublished results	
<i>S. solfataricus</i> P1	PH1-16	<i>pyrF/lacS</i>	Insertion sequences	ISC1359 ISC1217	(27)	p <i>lacS</i>
<i>S. solfataricus</i> 98/2	PBL2025	<i>lacS</i>	Deletion	SSO3004-SSO3050 deleted	(40)	

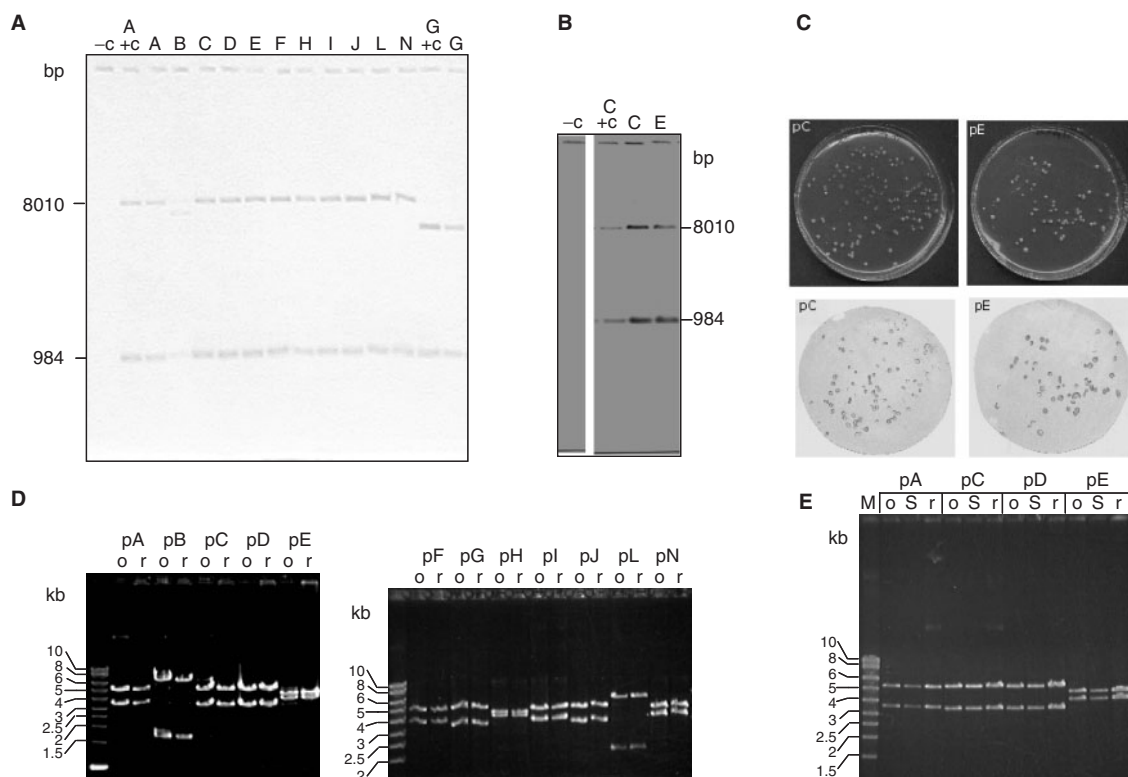


Figure 2. Analysis of *S. acidocaldarius* transformants. (A) Southern blot of HindIII digested genomic DNA preparations; the probes complementary to *pyrE* and a pRN1-fragment (see the Materials and Methods section) were used concurrently. –c: untransformed MR31, A+c: positive control: plasmid pA from *E. coli*, G+c: separate positive control (plasmid pG from *E. coli*) because of the additional HindIII restriction site present in pG. (B) Southern blot like in A for controls and cultures transformed with pC and pE after 200 generations of consecutive cultivation. (C) Colony hybridizations for *S. acidocaldarius* cultures transformed with pC and pE with pRN1 specific probes. (D) Restriction analysis (SacI) of retransformation experiments for all shuttle constructs, o: original plasmid prepared from *E. coli*, r: retransformed plasmid. (E) Restriction analysis (SacI) of shuttle vectors isolated directly from *S. acidocaldarius*: o: Plasmid from *E. coli*, S: plasmid from *Sulfolobus* (~40 times more concentrated than from *E. coli*), r: retransformed plasmid.

or NZAmine/xylose). Sequencing of the chromosomal *pyrE* locus revealed that no reversion of the mutated *pyrE* sequence had occurred in these clones, consistent with the nature of this mutation (an 18-bp deletion). Only one shuttle construct, pM (disrupted replication operon *orf56/orf904*), consistently failed to yield Pyr⁺ transformants in MR31.

Shuttle constructs are stable and do not integrate or rearrange

Using Southern blots we examined whether the shuttle constructs pA–pN were present in the *S. acidocaldarius* clones selected after electroporation (Figure 2A). This analysis confirmed that the vector constructs had the correct size and did not integrate into the host genome, as

no bands in addition to the expected ones for the episomal form of the vectors were observed. In addition, none of the vector constructs were observed to undergo large rearrangements in *S. acidocaldarius*, with the exception of pB. For this construct, an additional band of ~6kb was observed in the Southern blot, which indicated a rearrangement occurring in the *Sulfolobus* host. The Southern blot was repeated with a second enzyme (SacI) and again we did not have any indication for rearrangement of the plasmid constructs except pB or for integration into the host genome (data not shown).

Next, we tested by retransformation experiments if the original shuttle plasmids could be recovered intact from *S. acidocaldarius* transformants. As shown in Figure 2D, 2 to 30 retransformants per construct were checked by restriction analysis and only the correct restriction pattern was observed. In the case of pA, pC, pD and pE, the shuttle plasmids were also isolated directly from transformed *Sulfolobus* cultures and analyzed by restriction digestion (Figure 2E).

From the initial set of constructs, plasmids pC and pE were chosen to evaluate long-term stability under selective conditions. Cultures of pC and pE transformants were cultivated continuously for ~200 generations without uracil supplementation. Then retransformation experiments and Southern blots were repeated (Figure 2B), with the same results.

The direction of the insertion in a given region does not influence performance of the vector. The vectors pF, pI and pG, for example, have insertion sites within 15nt of each other. In pG, the *pyrEF* genes are oriented clockwise, in pI and pF counter clockwise, without detectable effects on plasmid stability or growth (Figure 3). In addition, the growth phenotype of transformed cells is comparable to that of the untransformed recipient strain when supplemented with uracil.

To test if the selection for uracil prototrophy ensures that every cell contains a shuttle vector, cells were plated on selective NZAmine/xylose medium and on non-selective tryptone/xylose medium supplemented with uracil. In eight different experiments comparable colony numbers were obtained on selective and non-selective plates showing that no cells escaped the selection. To prove that the vast majority of cells contained a shuttle vector, cells transformed with constructs pC and pE were plated on non-selective plates and examined by colony hybridizations with pRN1 specific probes (Figure 2C).

Vector retention and copy number

The facile generation of Pyr⁺ colonies by electroporation and direct plating on selective medium indicated that all the constructs tested, except for construct pM, could replicate in *S. acidocaldarius* under appropriate selection. In order to provide a more stringent and quantitative comparison of these constructs, we monitored their retention in populations growing in non-selective, uracil-supplemented liquid medium. Specifically, the fraction of Pyr⁺ cells in the population at three different times

was determined, by dilution and plating on uracil-supplemented and unsupplemented plates.

Figure 3C shows the retention of 13 constructs over ~10 generations, corresponding to ~1000-fold numerical expansions of the host cell populations. Most constructs showed measurable loss under these conditions, resulting in ~10% Pyr⁺ cells in the cultures. In a few cases, however, plasmid retention was much lower. The most severe instability was seen in construct pH, in which the *orf80* gene is interrupted. This result provided evidence that the small DNA-binding protein encoded by *orf80* has an important role in the stable maintenance of pRN1 and related plasmids. Intermediate instability was observed for construct pJlacS (described below). We suspect that this construct with the very strong *tf55α* promoter is a burden for the cell. Both pJlacS and pH yielded small or heterogeneous colonies when streaked on selective plates, consistent with the observed instability under non-selective conditions.

According to qPCR results, all constructs showed copy numbers within the range of 2–8 copies per cell, except for pB that showed low copy numbers around one. For pC and pE, the time course of the copy number during batch fermentation was also determined (Figure 4). The copy number increased in early and mid-log phase and decreased in stationary/death phase. This behavior has also been observed for the wild-type pRN1 plasmid (26). The copy number of the wild-type plasmid in its original host strain (together with pRN2) is higher, reaching 20 copies per cell when grown on rich media containing yeast extract (26) and 10 copies per cell when grown on tryptone media. When pRN1 alone is present in its original host (34) the copy number is only about two. The shuttle vectors therefore maintain a similar copy number in *S. acidocaldarius* as the native plasmid pRN1 in the original host strain *S. islandicus* REN1H1.

Suitability for protein expression or reporter gene tests

To test whether the vector tolerates the insertion of sequences containing expressed *Sulfolobus* genes we cloned the rather strong *tf55α* promoter (20) together with the *lacS* gene into shuttle construct pJ generating the vector pJlacS. The stability of this construct was tested by retransformation into *E. coli* and Southern blotting (Figure 5A and B). The construct turned out to be stably replicated in *S. acidocaldarius*. Staining with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal) revealed that the β-glycosidase was expressed under the control of the heat shock promoter (Figure 5C). This test could be done without prior isolation of a *lacS* mutant of strain MR31 because the endogenous β-glycosidase activity is very low, i.e. ~0.01 U/mg protein, in *S. acidocaldarius* (37). The enzyme activity was also measured quantitatively (as β-galactosidase) at different ODs of a MR31 culture transformed with pJlacS. Copy numbers were determined simultaneously and it was found that measured β-galactosidase activities correlated well with vector copy numbers (Figure 5E), as previously observed (16,20). It should be noted that the β-galactosidase activity

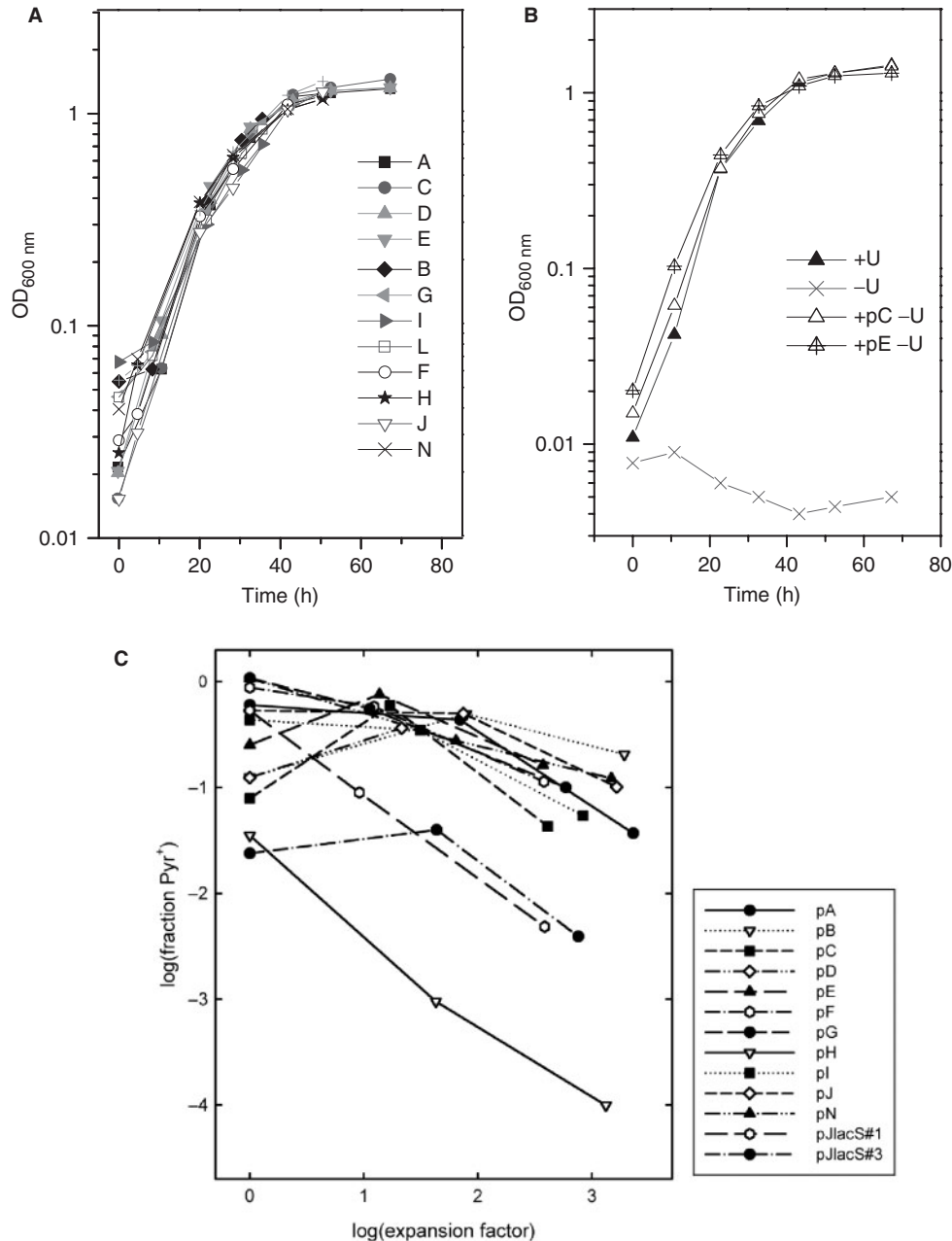


Figure 3. Growth of transformants. (A) Growth curves for MR31 transformed with pA to pN. (B) Growth curves for the recipient strain MR31 without addition of uracil (U), with the addition of uracil and transformed with pC and pE. (C) Retention of the shuttle vectors under non-selective conditions.

of MR31 transformed with pJlacS (2–11 U/mg) is much higher than the wild-type β -galactosidase activity of *S. solfataricus* (0.2 U/mg) (26) and is comparable to the β -galactosidase activity in a viral overexpression system (1.5–5 U/mg) (20).

Replication in *S. solfataricus*

Demonstration of *lacS* expression in *S. acidocaldarius* pJlacS transformants suggested the possibility of a selection by conferring, or restoring, the ability to catabolize lactose or other β -glycosides. The *S. solfataricus* 98/

2 *lacS* deletion mutant PBL2025 (40) was therefore tested for complementation by plasmid pJlacS. After three rounds of selection in liquid medium (0.4% lactose), >95% of all cells contained a shuttle vector, as shown by plating on selective lactose versus non-selective tryptone plates, and X-gal staining of colonies. On both plates equal numbers of colonies were observed, on the non-selective plate in addition to ~300 colonies also seven white colonies were observed (Figure 6). Southern blot, retransformation, growth and copy number determinations for pJlacS in *S. solfataricus* are summarized in

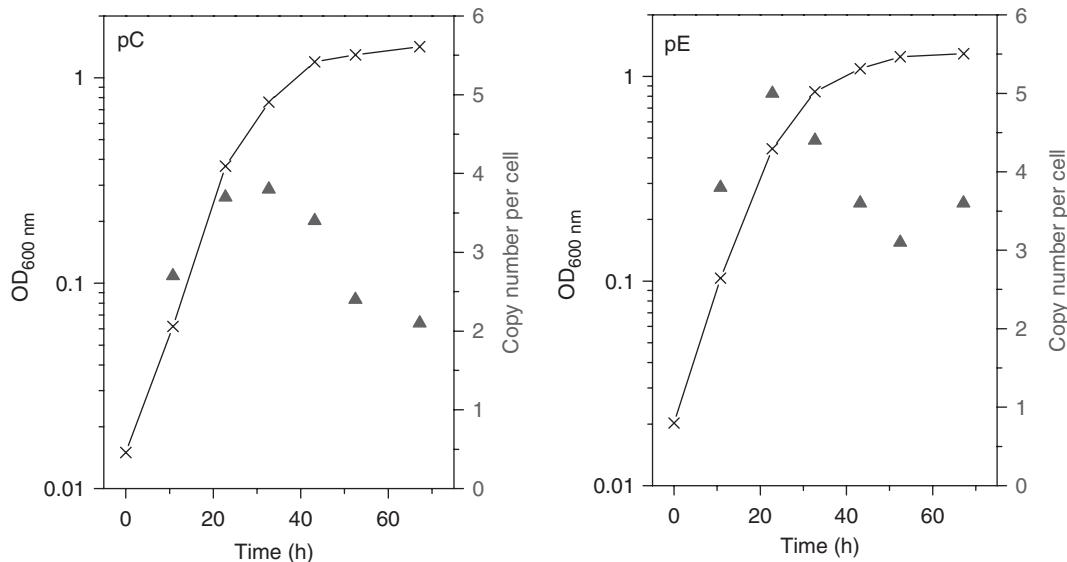


Figure 4. Plasmid copy number per cell (triangles) for MR31 transformed with pC (left panel) and pE (right panel) and corresponding growth curves (line).

Figure 6 and indicate that p*lacS* is stably replicated in *S. solfataricus*.

Transformation efficiencies

For *S. acidocaldarius* direct determination of transformation efficiencies is possible, because plating of the primary electroporation mixture can be done after only 30 min of regeneration. Considering all transformations performed in the current study ($n = 150$), the efficiencies range from 1×10^2 to 6×10^4 transformants per microgram plasmid DNA. The batch of electrocompetent cells, electroporation protocol and regeneration procedure have an influence on the transformation efficiency, as already described (36).

On tryptone/xylose plates, the formation of very small colonies—that did not contain a shuttle vector—was observed in addition to the colonies of normal size that were able to grow in selective liquid medium. Controls without electroporation or without addition of shuttle vector also yielded small colonies, which were not able to grow when re-streaked on selective plates or cultivated in liquid medium. Based on their phenotype and frequency in strain MR31, we hypothesize that these ‘pseudo-transformants’ contain spontaneous mutations elsewhere in the *S. acidocaldarius* chromosome that partially suppress the *pyrE* phenotype.

Finally, we confirmed that complete methylation of the shuttle vectors is essential for efficient transformation of *S. acidocaldarius*. None of the constructs pA–pN yielded transformants when unmethylated or partly protected plasmids were electroporated.

DISCUSSION

Selection

Based on our results with various constructs and recipient strains, we conclude that the primary obstacle

to establishing stably replicating shuttle vectors derived from *Sulfolobus* plasmid pRN1 is not preservation of critical plasmid functions or identification of a required host species, but creation of a suitably reliable selection. For example, point and transposon mutants of *S. islandicus* or *S. solfataricus* that showed low reversion frequencies in small scale fluctuation tests (15×10^{-9} – $<6 \times 10^{-9}$ reversions per cell division, unpublished data) displayed for unknown reasons higher reversion frequencies after electroporation with a shuttle construct. These problems could be avoided by the use of a *pyrE* deletion mutant of *S. acidocaldarius*. In contrast to *S. solfataricus* and *S. islandicus*, background growth on selective plates was not observed with *S. acidocaldarius*. Although the basis of this difference has not been established, *S. acidocaldarius* lacks homologs of the cytosine/uracil/thiamine/allantoin permeases (SSO1905, SSO2042) present in *S. solfataricus* and *S. tokodaii* (ST1564) that might facilitate growth on medium with very low uracil concentrations.

Essential regions of pRN1

Under selective conditions, the vectors could be faithfully propagated in *Sulfolobus*. Rearrangements occurred in only two cases, pB and p*lacS*, and only after many generations. We do not know why pB behaves differently in this respect, although it is the only construct interrupted in between *orf90b* and *orf56*. This region of pRN1 contains several repeats and other remarkable features like a stretch of 17 consecutive C residues (41). An interruption in this region is obviously not as well tolerated as in other regions. The only interruption site that abolished shuttle vector replication completely was that of construct pM, and is situated within the co-transcribed replication operon *orf56/orf904*. For pM no viable transformants could be isolated. The other conserved open reading frame, *orf80*, also called *plrA*

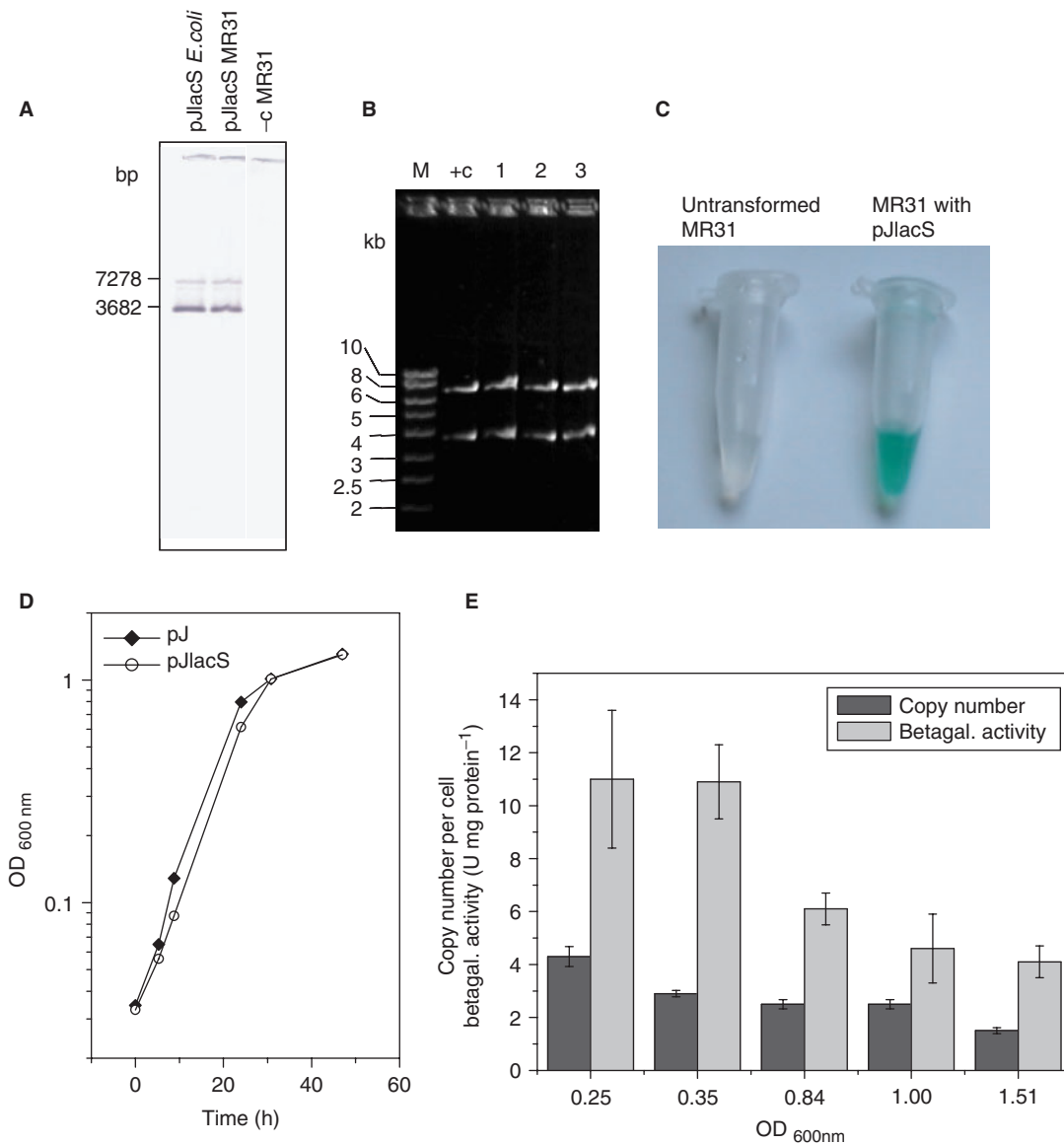


Figure 5. Replication of *pJlacS* in *S. acidocaldarius* (A) Southern blot (SacI) of plasmid *pJlacS* from *E. coli*, MR31 transformed with *pJlacS* and untransformed MR31 (-c). The pRN1 specific probe detects the 3.7-kb restriction fragment, the *lacS* probe detects the 7.3-kb fragment. (B) Retransformation of *pJlacS* (SacI), +c: *pJlacS* from *E. coli*, 1,2,3: retransformants. (C) X-gal test with untransformed MR31 and MR31 transformed with *pJlacS* (10 min at 75°C). (D) Growth curves for MR31 transformed with pJ (control) and with *pJlacS*. (E) Reporter gene experiment showing copy numbers of *pJlacS* per cell and the corresponding β -galactosidase activities.

(*plasmid_regulatory*), that is present on almost all sequenced genetic elements of *Sulfolobus* (42) is interrupted in pH. Interestingly, pH shows growth comparable to the other constructs and yields the same transformation efficiencies. Therefore *orf80* seems not to be essential for replication of pRN1, at least not when selective pressure is applied. However, under non-selective conditions, construct pH was lost at a much faster rate than any other construct that could be successfully established in *S. acidocaldarius*. The relative instability of this construct provides the first experimental evidence that the DNA-binding protein ORF80 has an important role in stable maintenance A of pRN1. The instability of this construct may also have practical uses. For example, it may

facilitate transfer of *pyrEF*-marked genes to the host chromosome, by allowing such genes to be first established on an episome, and then stabilized in the population by recombinational integration at the homologous locus.

Stability in *E. coli*

Many shuttle constructs developed so far for hyperthermophilic archaea have been observed to rearrange in *E. coli* (18), which hampers the use of these systems. Some of these problems may, in principle, be circumvented by the use of *E. coli* strains designed specially for dealing with unstable constructs. Additionally reducing the growth temperature to 30°C and using only 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$

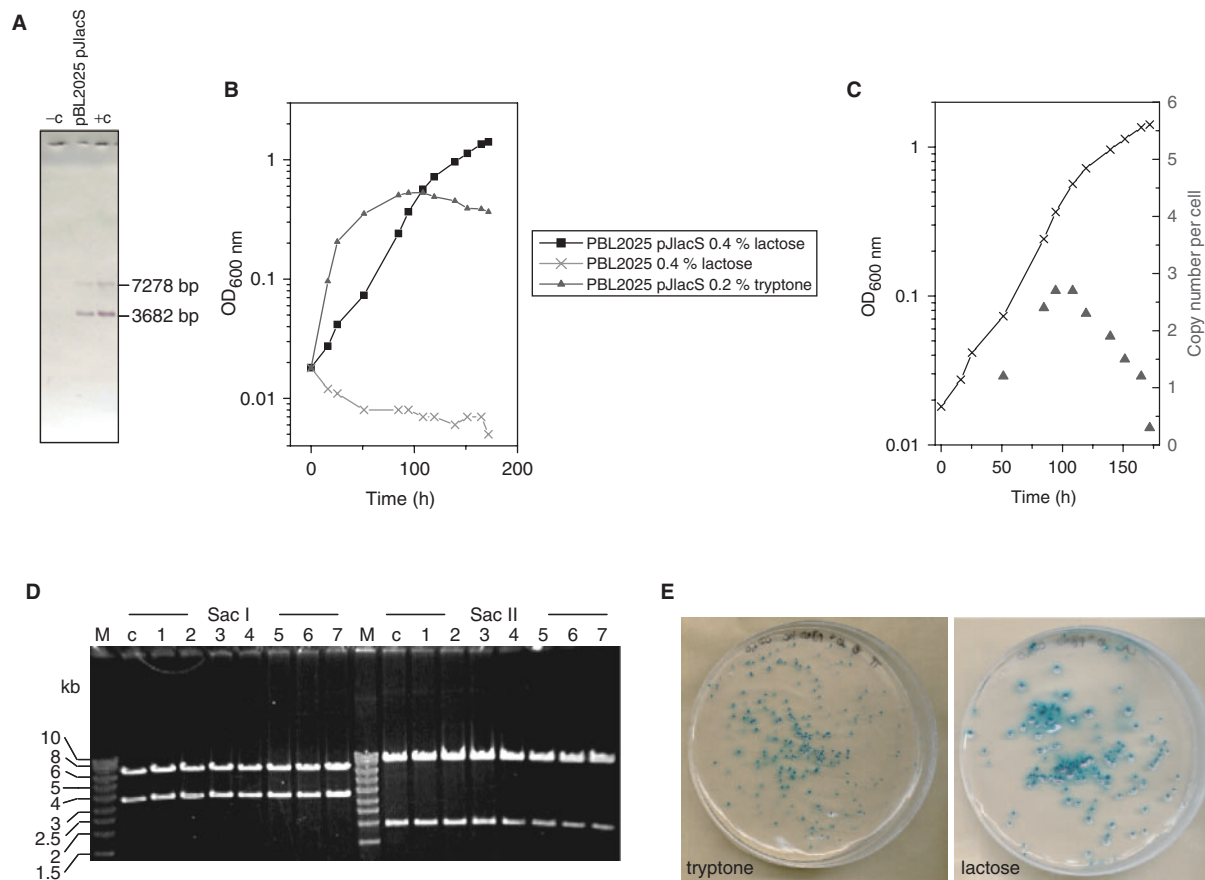


Figure 6. Replication of pJlacS in *S. solfataricus* (A) Southern blot (SacI) of untransformed PBL2025 (-c), PBL2025 transformed with pJlacS and pJlacS from *E. coli* (+c). The pRN1-specific probe detects the 3.7-kb restriction fragment, the lacS probe detects the 7.3-kb fragment. (B) Growth curves of untransformed PBL2025 in 0.4% lactose medium, PBL2025 transformed with pJlacS in 0.4% lactose medium and in 0.2% tryptone medium. (C) Copy number per cell for pJlacS in PBL2025 in 0.4% lactose medium. (D) Retransformation of pJlacS back into *E. coli*. (E) Plating of PBL2025 transformed with pJlacS after 100 generations of consecutive cultivation on non-selective tryptone and selective lactose plates stained with X-gal.

of ampicillin is necessary to prevent rearrangements in the pMJ vector system (22). We observed rearrangements for the construct pJlacS in one out of 10 preparations of this plasmid in *E. coli* XL1-Blue cells at 37°C and 100 µg ml⁻¹ of ampicillin. In general, however, the constructs pA to pN seemed to be fully stable in *E. coli*. In particular, we never detected rearrangements in retransformed plasmids. In Southern blots, faint traces of plasmid rearrangements were visible for some preparations from *E. coli* but did not interfere with successful transformation of *Sulfolobus*.

CONCLUSIONS

We have developed multicopy, non-integrative, plasmid-based *Sulfolobus*-*E. coli* shuttle vectors that are very stable in both hosts, and are suitable for the use in protein expression and reporter gene studies. Transformation is rapid and simple, involving electroporation of stable *pyrE* mutants and plating on uracil-deficient media. The constructs are small, enabling direct cloning into unique SacII/XmaI and NotI restriction sites. The host range so far comprises *S. acidocaldarius* and *S. solfataricus*, the two

most widely used and best-studied species of *Sulfolobus* for which genome sequence information is available. The presence of the shuttle constructs in the cells does not cause significant growth retardation and there is limited risk of accidentally contaminating cultures because the vectors are not infectious. It should be emphasized that performance of these shuttle constructs has now been confirmed independently in three different laboratories using slightly different electroporation and cultivation protocols.

In addition, the use of *S. acidocaldarius* as recipient strain has certain practical advantages which somewhat mitigate the inconvenience of requiring specific DNA methylation. *Sulfolobus acidocaldarius* does not contain any integrated copies of pRN1 or genes homologous to pRN1 genes. This enables detailed experiments on essential regions and proteins for pRN1 replication and maintenance without interference from plasmid-gene homologs located on the host chromosome. Because of the low sequence similarity between *S. acidocaldarius* and *S. solfataricus* there is also minimal risk of undesired homologous recombination when cloning genes of *S. solfataricus* into the shuttle vector, e.g. for protein

expression. *Sulfolobus acidocaldarius* is the only *Sulfolobus* species so far that does not contain active insertion sequences and seems to be genetically stable (12). In addition, it is the *Sulfolobus* species showing the highest growth rate with doubling times of around 3–4 h during exponential growth, and exhibits efficient homologous recombination (36). In this context, the series of pRN1 shuttle vectors we have constructed promises to add detailed genetic analyses to the already advanced biochemical characterization of various *Sulfolobus* gene products.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the DFG (Li913/4) in the framework of the Schwerpunktprogramm Archaea to G.L., an NSF grant MCB0543910 to DG and a VIDI grant of the Dutch Science Organization (NWO) to S.-V.A. We are grateful to New England Biolabs for providing us with the plasmid pM.EsaBC4I for methylation of the shuttle constructs, to Christa Schleper for the plasmid pBSKP-pyrEF and the strain *S. solfataricus* PH1-16, and to Paul Blum for the strain *S. solfataricus* PBL2025 and Peter Agron for the plasmid pPA21. In addition, DG. thanks R. Cho and C. Sakofsky for communicating unpublished results. Funding to pay the Open Access publication charges for this article was provided by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Agback,P., Baumann,H., Knapp,S., Ladenstein,R. and Hard,T. (1998) Architecture of nonspecific protein-DNA interactions in the Sso7d-DNA complex. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 579–584.
- Bell,S.D., Botting,C.H., Wardleworth,B.N., Jackson,S.P. and White,M.F. (2002) The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. *Science*, **296**, 148–151.
- Robinson,N.P., Dionne,I., Lundgren,M., Marsh,V.L., Bernander,R. and Bell,S.D. (2004) Identification of two origins of replication in the single chromosome of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Cell*, **116**, 25–38.
- Lundgren,M. and Bernander,R. (2007) Genome-wide transcription map of an archaeal cell cycle. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 2939–2944.
- Ling,H., Boudsocq,F., Woodgate,R. and Yang,W. (2001) Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: a mechanism for error-prone and lesion-bypass replication. *Cell*, **107**, 91–102.
- Qureshi,S.A., Bell,S.D. and Jackson,S.P. (1997) Factor requirements for transcription in the Archaeon *Sulfolobus shibatae*. *EMBO J.*, **16**, 2927–2936.
- Condo,I., Ciannamaroni,A., Benelli,D., Ruggero,D. and Londei,P. (1999) Cis-acting signals controlling translational initiation in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol. Microbiol.*, **34**, 377–384.
- Rosendal,K.R., Wild,K., Montoya,G. and Sinning,I. (2003) Crystal structure of the complete core of archaeal signal recognition particle and implications for interdomain communication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 14701–14706.
- Brouns,S.J., Walther,J., Snijders,A.P., van de Werken,H.J., Willemens,H.L., Worm,P., de Vos,M.G., Andersson,A., Lundgren,M. *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 27378–27388.
- She,Q., Singh,R.K., Confalonieri,F., Zivanovic,Y., Allard,G., Awayez,M.J., Chan-Weiher,C.C., Clausen,I.G., Curtis,B.A. *et al.* (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 7835–7840.
- Kawarabayashi,Y., Hino,Y., Horikawa,H., Jin-no,K., Takahashi,M., Sekine,M., Baba,S., Ankai,A., Kosugi,H. *et al.* (2001) Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain7. *DNA Res.*, **8**, 123–140.
- Chen,L., Brugger,K., Skovgaard,M., Redder,P., She,Q., Torarinsson,E., Greve,B., Awayez,M., Zibat,A. *et al.* (2005) The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the Crenarchaeota. *J. Bacteriol.*, **187**, 4992–4999.
- Snijders,A.P., Walther,J., Peter,S., Kinnman,I., de Vos,M.G., van de Werken,H.J., Brouns,S.J., Van der,O.J. and Wright,P.C. (2006) Reconstruction of central carbon metabolism in *Sulfolobus solfataricus* using a two-dimensional gel electrophoresis map, stable isotope labelling and DNA microarray analysis. *Proteomics*, **6**, 1518–1529.
- Barry,R.C., Young,M.J., Stedman,K.M. and Dratz,E.A. (2006) Proteomic mapping of the hyperthermophilic and acidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Electrophoresis*, **27**, 2970–2983.
- Allers,T. and Mevarech,M. (2005) Archaeal genetics - the third way. *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 58–73.
- Aucelli,T., Contursi,P., Girfoglio,M., Rossi,M. and Cannio,R. (2006) A spreadable, non-integrative and high copy number shuttle vector for *Sulfolobus solfataricus* based on the genetic element pSSVx from *Sulfolobus islandicus*. *Nucleic Acids Res.*, **34**, e114.
- Cannio,R., Contursi,P., Rossi,M. and Bartolucci,S. (1998) An autonomously replicating transforming vector for *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.*, **180**, 3237–3240.
- Aravalli,R.N. and Garrett,R.A. (1997) Shuttle vectors for hyperthermophilic archaea. *Extremophiles*, **1**, 183–191.
- Contursi,P., Pisani,F.M., Grigoriev,A., Cannio,R., Bartolucci,S. and Rossi,M. (2004) Identification and autonomous replication capability of a chromosomal replication origin from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles*, **8**, 385–391.
- Jonuscheit,M., Martusewitsch,E., Stedman,K.M. and Schleper,C. (2003) A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle vector. *Mol. Microbiol.*, **48**, 1241–1252.
- Stedman,K.M., Schleper,C., Rumpf,E. and Zillig,W. (1999) Genetic requirements for the function of the archaeal virus SSV1 in *Sulfolobus solfataricus*: construction and testing of viral shuttle vectors. *Genetics*, **152**, 1397–1405.
- Albers,S.V., Jonuscheit,M., Dinkelaker,S., Urich,T., Kletzin,A., Tampe,R., Driessen,A.J. and Schleper,C. (2006) Production of Recombinant and Tagged Proteins in the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 102–111.
- Lipps,G., Rother,S., Hart,C. and Krauss,G. (2003) A novel type of replicative enzyme harbouring ATPase, primase and DNA polymerase activity. *EMBO J.*, **22**, 2516–2525.
- Lipps,G., Stegert,M. and Krauss,G. (2001) Thermostable and site-specific DNA binding of the gene product ORF56 from the *Sulfolobus islandicus* plasmid pRN1, a putative archaeal plasmid copy control protein. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 904–913.
- Lipps,G., Ibanez,P., Stroessenreuther,T., Hekimian,K. and Krauss,G. (2001) The protein ORF80 from the acidophilic and thermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* binds highly site-specifically to double-stranded DNA and represents a novel type of basic leucine zipper protein. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4973–4982.
- Berkner,S. and Lipps,G. (2007) Characterization of the transcriptional activity of the cryptic plasmid pRN1 from *Sulfolobus islandicus* REN1H1 and regulation of its replication operon. *J. Bacteriol.*, **189**, 1711–1721.
- Martusewitsch,E., Sensen,C.W. and Schleper,C. (2000) High spontaneous mutation rate in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by transposable elements. *J. Bacteriol.*, **182**, 2574–2581.
- Schelert,J., Drozda,M., Dixit,V., Dillman,A. and Blum,P. (2006) Regulation of mercury resistance in the crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.*, **188**, 7141–7150.
- Zillig,W., Kletzin,A., Schleper,C., Holz,I., Janekovic,D., Hain,J., Lanzendoerfer,M. and Kristjansson,J.K. (1994) Screening for *Sulfolobales*, their plasmids and their viruses in Icelandic solfataras. *Syst. Appl. Microbiol.*, **16**, 609–628.

30. Reilly, M.S. and Grogan, D.W. (2001) Characterization of intragenic recombination in a hyperthermophilic archaeon via conjugational DNA exchange. *J. Bacteriol.*, **183**, 2943–2946.
31. Brock, T.D., Brock, K.M., Belly, R.T. and Weiss, R.L. (1972) *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Mikrobiol.*, **84**, 54–68.
32. Grogan, D.W. and Gunsalus, R.P. (1993) *Sulfolobus acidocaldarius* synthesizes UMP via a standard de novo pathway: results of biochemical-genetic study. *J. Bacteriol.*, **175**, 1500–1507.
33. Agron, P.G., Sobecky, P. and Andersen, G.L. (2002) Establishment of uncharacterized plasmids in *Escherichia coli* by in vitro transposition. *FEMS Microbiol. Lett.*, **217**, 249–254.
34. Purschke, W.G. and Schaefer, G. (2001) Independent replication of the plasmids pRN1 and pRN2 in the archaeon *Sulfolobus islandicus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **200**, 97–102.
35. Grogan, D.W. (2003) Cytosine methylation by the *SuaI* restriction-modification system: implications for genetic fidelity in a hyperthermophilic archaeon. *J. Bacteriol.*, **185**, 4657–4661.
36. Kurosawa, N. and Grogan, D.W. (2005) Homologous recombination of exogenous DNA with the *Sulfolobus acidocaldarius* genome: properties and uses. *FEMS Microbiol. Lett.*, **253**, 141–149.
37. Grogan, D.W. (1991) Evidence that beta-Galactosidase of *Sulfolobus solfataricus* is only one of several activities of a thermostable beta-d-Glycosidase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1644–1649.
38. Corbett, K., Fordham-Skelton, A.P., Gatehouse, J.A. and Davis, B.G. (2001) Tailoring the substrate specificity of the beta-glycosidase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Lett.*, **509**, 355–360.
39. Ehresmann, B., Imbault, P. and Weil, J.H. (1973) Spectrophotometric determination of protein concentration in cell extracts containing tRNA's and rRNA's. *Anal. Biochem.*, **54**, 454–463.
40. Schelert, J., Dixit, V., Hoang, V., Simbahan, J., Drozda, M. and Blum, P. (2004) Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* by use of gene disruption. *J. Bacteriol.*, **186**, 427–437.
41. Keeling, P.J., Klenk, H.P., Singh, R.K., Feeley, O., Schleper, C., Zillig, W., Doolittle, W.F. and Sensen, C.W. (1996) Complete nucleotide sequence of the *Sulfolobus islandicus* multicopy plasmid pRN1. *Plasmid*, **35**, 141–144.
42. Greve, B., Jensen, S., Brugger, K., Zillig, W. and Garrett, R.A. (2004) Genomic comparison of archaeal conjugative plasmids from *Sulfolobus*. *Archaea*, **1**, 231–239.
43. Berkner, S. and Lipps, G. (2007) An active nonautonomous mobile element in *Sulfolobus islandicus* REN1H1. *J. Bacteriol.*, **189**, 2145–2149.

7.5 Teilarbeit E

Silvia Berkner und Georg Lipps.

Mutation and reversion frequencies of different *Sulfolobus* species and strains.

Manuskript in Vorbereitung.

Mutation and reversion frequencies of different *Sulfolobus* species and strains

Silvia Berkner and Georg Lipps*

Department of Biochemistry, University of Bayreuth, Universitätsstr. 30, 95447
Bayreuth, Germany

for correspondence: email: georg.lipps@uni-bayreuth.de, tel.: ++49-921-552433, fax.:
++49-921-552432

Keywords: mutation frequencies, reversion frequencies, uracil selection, lactose
selection, small scale fluctuation tests

Abstract

We have determined apparent and actual spontaneous mutation frequencies for different species and strains of the thermoacidophilic crenarchaeote *Sulfolobus*. The proportion of mutations caused by insertion sequences has also been analyzed. Mutation frequencies for *S. islandicus* (0.6 – 0.08 mutations per cell division and 10^7 cells) were below those determined for *S. solfataricus* and comparable to or lower than those of *S. acidocaldarius*. The proportion of insertion sequence mutations for the *S. islandicus* strains REN1H1 (9 out of 230) and HVE10/4 (0 out of 24) was found to be considerably lower than in *S. solfataricus* P1 and P2 and also low in comparison to other *S. islandicus* strains. Mutants defective in either the *pyrEF* genes or the *lacS* gene have been isolated. Their growth phenotype on selective and non-selective medium was examined and the inactivating mutations in either of the genes were determined. In addition the reversion frequencies for these mutants were measured and found to be in the range of <0.6-1.5 mutations per cell division and 10^8 cells. However, when being subjected to electroporation as a transformation procedure, increased reversion was observed.

Introduction

Recently it has become obvious, that some widely used *Sulfolobus* strains show high genomic plasticity. Especially *S. solfataricus* P2, that is used throughout many biochemical and molecular biology studies, has been shown to be prone to genomic rearrangements (Redder and Garrett, 2006). Furthermore, also the strain *S. solfataricus* P1, the parent strain of a recipient mutant for a genetic system for *Sulfolobus* (Jonuscheit et al., 2003) is known to show high spontaneous mutation rates mediated by insertion sequences (Schleper et al., 1994, Martusewitsch et al., 2000). Caution is required when using these *Sulfolobus* strains in molecular biology experiments (Redder and Garret, 2006). These strains were mainly used because, *S. solfataricus* P2 was the first *Sulfolobus* strain for which genome sequence information was available (Sensen et al., 1998, Charlebois et al., 2000, She et al., 2001) and *S. solfataricus* P1 was used in pioneering molecular biology studies, e.g. in the demonstration that *Sulfolobus* can be transformed by electroporation (Schleper et al., 1992). With evidence for genomic instabilities in these strains accumulating, it is crucial to identify more genetically stable *Sulfolobus* strains as recipients for genetic systems for this organism, that are being developed at an increasing pace (Stedman et al., 1999, Jonuscheit et al., 2003, Worthington et al., 2003, Schelert et al., 2004, Kurosawa and Grogan, 2005, Aucelli et al., 2006, Berkner et al., 2007).

The determination of the mutation frequency of the *pyrEF* locus allows to draw conclusions about the overall genomic stability of a *Sulfolobus* species or strain. For *S. solfataricus* P2 it has been shown that a large number of insertion sequences are present in its genome (She, et al., 2001, Brügger, et al., 2002, Brügger, et al., 2003). In fact it is the sequenced prokaryotic genome that contains the largest number of insertion sequence elements (Redder and Garrett, 2006). The observed genomic instability in *S. solfataricus* P2 has been attributed to the high number of insertion sequences present (Redder and Garrett, 2006). On the other hand, *S. acidocaldarius* contains no active insertion

sequences (Grogan et al., 2001, Chen, et al., 2005) and mutation frequencies determined for the *pyrE* and *pyrF* genes show 1-2 orders of magnitude lower values than for *S. solfataricus* (Jacobs and Grogan, 1997, Martusewitsch et al., 2000). For different *S. islandicus* strains isolated from Iceland (Zillig, et al., 1994), that are increasingly being used in biochemical and genetic studies besides *S. solfataricus* and *S. acidocaldarius*, almost no information is available.

The *pyrEF* genes are suitable as model genes for the determination of spontaneous mutation frequencies and examination of the activity of insertion sequences, because their mutation frequency can reliably and sensitively be determined (Jacobs and Grogan, 1997, Grogan et al., 2001) and insertion sequences can be trapped (Blount and Grogan, 2005, Redder and Garrett, 2006). The cotranscribed *pyrEF* genes (Thia-Thoong, et al., 2002) code for orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) and orotidin-5'-monophosphatedecarboxylase, (ODC) respectively. These enzymes form part of the *de novo* uridine-5'-monophosphate (UMP) synthesis pathway (Grogan and Gunsalus, 1993). OPRT catalyzes the addition of phosphoribosyl pyrophosphate to orotate, ODC catalyzes the decarboxylation of orotidin-5'-monophosphate to uridine-5'-monophosphate. Loss of function mutations in the *pyrE* or *pyrF* gene lead to uracil auxotrophic mutants. *pyrEF* deficient mutants can be selected for by the use of the fluorinated substrate analogon 5'-fluoro-orotic acid (FOA) (Kondo, et al., 1991, Grogan, 1991).

We were interested in the mutation frequencies of the *pyrEF* genes of different *Sulfolobus* species for two reasons, namely the assessment of the genetic stability and the isolation and characterization of *pyrEF* and *lacS* deficient mutant strains with regard to the development of genetic systems for *Sulfolobus spp.* The emphasis was put on the characterization of *Sulfolobus* strains for which information was lacking, to gain a coherent view for the most important laboratory strains of *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius* and *S. islandicus*.

Experimental

Strains and growth conditions

S. solfataricus strain P1 (Zillig, et al., 1980) and PBL2025 (Schelert, et al., 2004), *S. islandicus* strains REN1H1, REN2H1 and HVE10/4 (Zillig, et al., 1994) and mutant strains REN1H1 R1, R20, R21, R22 (Berkner and Lipps, 2007b), S1, R1S1, REN2H1 DM, and HVE10/4 H1, and *Sulfolobus acidocaldarius* (Brock, et al., 1972) were grown in Brock's basal salts medium at pH 3.5 (Brock, et al., 1972) supplemented with 0.1% tryptone and 0.2% arabinose for liquid culture and 0.2% dextrin for plates. For growth of *pyrEF* mutant strains 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of uracil was added to the medium. The completely uracil free "20AS" medium is composed of the 20 amino acids (0.5 mM each except for tryptophan (0.25 mM) and tyrosine (0.1 mM)). The lactose medium contained 0.2 % lactose as sole carbon and energy source. Plates were solidified by addition of 0.6 % Gelrite (Sigma) and 10 mM CaCl_2 . Plates and shake flask cultures were incubated at 75°C.

Determination of apparent mutation frequencies

An aliquot of 100 μL of an exponentially growing culture (supplemented with uracil) was plated undiluted on plates containing FOA at concentrations indicated for each experiment. The number of viable cells was determined by plating appropriate dilutions on plates without FOA. The apparent mutation frequency is the number of FOA resistant cells divided by the number of viable cells. Experiments were conducted at least in triplicate.

Small scale fluctuation tests

A culture was grown without addition of uracil to prevent the occurrence of mutations during this culture period. This culture was diluted to contain only 5000 cells per mL and was divided into 10 parallel cultures and cultivated to mid-exponential phase with addition of uracil to the medium. Then an aliquot of each culture was spread on plates

containing 250 µg/mL FOA. Mutation events were determined from these small scale fluctuation tests (Luria and Delbrück, 1943) by the methods described by Lea and Coulson (1949) with the aid of graphs and formulas given in Koch (1982). From the numbers of colonies obtained in the ten parallel cultures, the first, second and third quartile of the frequency distribution were calculated using spreadsheet software. For each quartile the corresponding number of mutations was deduced from the graphs given in Koch (1982). In case no colonies were observed, the upper limit of the number of mutations was estimated by the p0 method (Lea and Coulson, 1949) as described in Koch (1982). Mutational events are reported normalized to the cell number and the number of cell divisions. Cell numbers were determined by plating appropriate dilutions on non-selective plates. A prerequisite for the applicability of these methods is the equal growth rate of the mutants and wildtype cells. For this reason the medium was supplemented with uracil during growth for the small scale fluctuation experiments.

Screening and sequencing of *pyrEF* mutants

The *pyrEF* genes from *S. islandicus* REN1H1, REN2H1 and HVE10/4 were amplified by PCR using primers 5'-TTCACCTTTTGCTATCGAAG and 5'-GTTTATAAAGACCGGCTATT yielding a fragment of 1584 bp containing the promoter region of *pyrB* and the *pyrE* and *pyrF* genes. The different *pyrEF* PCR products were examined for the presence of insertions or deletions by screening for changes in the length of the PCR products on a 1 % agarose gel. 230 mutants were examined for *S. islandicus* REN1H1 and 24 mutants for *S. islandicus* HVE10/4. PCR products differing in length from the wild-type PCR fragment were cloned and sequenced.

UV-mutagenesis and Xgal staining

S. islandicus REN1H1 cells were grown to an OD of 0.8, cooled on ice and 1 mL of cells was transferred to different wells of a 24 well plate. The plate was irradiated with UV light (55 W, 10 cm distance to samples, 254 nm) for the indicated periods. Then

appropriate dilutions of the cells were plated (app. 10^4 colonies per plate, 120 plates) and screened for white colonies after staining with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (Xgal). Plates were sprayed with Xgal solution (20 mg/mL in dimethylformamide) and incubated for up to 30 min at 75°C.

Sequencing of the *lacS* gene

The *lacS* gene from *S. islandicus* REN1H1 and REN2H1 was amplified using primers 5'-AGATACTCGCTCAAAGCTTN and 5'-GAAGGTATGAAAGTATTGCN yielding a 1602 bp fragment containing 43 bp of upstream sequence. PCR fragments were cloned and sequenced.

Results and Discussion

Mutation frequencies of the *pyrEF* genes

The spontaneous mutation rates of the *pyrEF* genes were determined for different *Sulfolobus* strains as apparent mutation frequencies and as actual mutational events per cell and cell cycle from small scale fluctuation tests. The apparent mutation rate counts all FOA selectable *pyrEF* deficient mutants whereas by small scale fluctuation tests the overall number of mutants obtained is corrected for the number of mutants that are descendants of already mutated cells. Small scale fluctuation tests therefore allow to determine the exact number of mutations. The apparent mutation frequency was nevertheless determined to be able to compare the obtained values to published results obtained with either one of the above mentioned methods.

The apparent mutation frequencies (table 1) determined for *S. islandicus* species show comparable values for *S. islandicus* REN1H1 and REN2H1. The value for REN1H1 approximately agrees with previous determinations (Martusewitsch, et al., 2000). For *S. islandicus* HVE10/4 lower apparent mutation frequencies were determined. The values for *S. islandicus* were one to two orders of magnitude below the values determined for *S. solfataricus* P1 and P2 (Martusewitsch et al., 2006, Redder and Garret et al., 2006).

However the apparent mutation frequency for *S. solfataricus* PBL2025 was found to be in the same range as for most *S. islandicus* strains. *S. acidocaldarius* showed comparable apparent mutation frequencies to the *S. islandicus* strains.

Small scale fluctuation tests were performed to be able to measure more accurately the number of mutations that is occurring in the different strains (table 2). The highest mutation rate was again determined for *S. solfataricus*. It becomes obvious that the difference between *S. solfataricus* and *S. islandicus* strains is overestimated by determining only the apparent mutation frequency. However with both methods the same ranking order of the mutation frequencies was obtained. *S. islandicus* REN2H1 shows a slightly lower frequency than REN1H1 followed by HVE10/4 which again showed the lowest frequency observed. In comparison to previously conducted small scale fluctuation for isolates typed as conspecific to *S. islandicus* from Yellowstone, Lassen and Kamtchatka (Blount and Grogan, 2005) the icelandic *S. islandicus* strains showed lower mutation frequencies and also lower fractions of insertion sequence mutations.

We can not exclude that different FOA concentrations may have an effect on the results of the different small scale fluctuation studies. For that reason only studies are compared that used approximately the same FOA concentrations (table 2). However, from the determinations of apparent and actual mutation frequencies it can be deduced that *S. solfataricus* shows the highest mutation rates equaled by some of the *S. islandicus* isolates from Blount and Grogan (2005).

Isolation and characterization of *pyrEF* and *lacS* mutants

To obtain suitable recipient strains for uracil selection or lactose selection or for the use in reporter gene experiments, mutants defective in the *pyrEF* genes and/or defective in the *lacS* gene were isolated.

Isolation of *pyrEF* mutants was done by picking single colonies from FOA containing plates (250 µg/mL) and subsequently characterizing the mutants phenotypically and

genotypically to determine their suitability to serve as potential recipient strains in the establishment of genetic systems. Two criteria that suitable mutants should meet were i) comparable growth to wild type strains under non-selective conditions and ii) most preferably negligible growth under selective conditions. Strains that showed the best behavior in growth tests (figure 1) were then chosen and the *pyrEF* genes were sequenced to determine the mutations responsible for the inactivation of the *pyrEF* genes. We noticed that the tested mutants, as well as other *pyrEF* mutants (e. g. PH1-16, (Martusewitsch, et al., 2000)) showed residual growth in tryptone medium, probably because traces of uracil are present in tryptone (figure 1). For that reason a medium composed of 20 amino acids (20AS, see methods) was used. Cells grew slower in this medium and only when a vitamin solution (Wolin, et al., 1963) was added. However, this completely uracil free medium considerably reduced the background growth observed with tryptone containing medium (figure 1). As reliable uracil selection was a prerequisite for determining the reversion frequencies of the *pyrEF* deficient mutants, we examined the efficiency of this selection method with different media. A low number of uracil prototrophic cells was plated mixed with an approximately 6 orders of magnitude higher number of uracil auxotrophic cells on tryptone/dextrin plates and on 20AS/dextrin plates (figure 2). If the selection was reliable and efficient the number of recovered colonies should correspond to the number of prototrophic cells plated. This was observed for all tested *Sulfolobus* species for the dextrin/20AS plates (recovery > 90%) but not for the tryptone/dextrin plates where almost only background growth was observed and only very few, very small colonies.

As no selection procedure exists to isolate *lacS* deficient mutants comparable to the FOA selection for *pyrEF* mutants, cells were mutagenized to increase the probability of obtaining a *lacS* deficient mutant. Mutagenesis was done by irradiation with UV-light. First the survival rate of cells was determined for different periods of irradiation (figure

3A). The final irradiation time was chosen to yield a fraction of 10^{-4} surviving cells. $1,2 \times 10^6$ cells (OD 0.8) were plated, plates were sprayed with Xgal solution and screened for white colonies. Only one white colony could be isolated. For this colony (*S. islandicus* REN1H1 S1) the growth on selective lactose and non-selective tryptone/arabinose medium was examined. Only very faint growth was observed in lactose medium (figure 3B) and no color developed when tested for prolonged incubation times by Xgal staining. So far no genome sequence for *S. islandicus* is available. However it is known, that its sequence is close to that of *S. solfataricus* (Zillig, et al., 1994). We determined the sequence of the *pyrEF* genes for *S. islandicus* REN1H1, REN2H1 and HVE10/4. For *S. islandicus* REN2H1 seven exchanged nucleotides were detected, the sequence from HVE10/4 differs only by four nucleotides from the REN1H1 sequence. We also determined the *lacS* sequence for *S. islandicus* REN1H1 and found it to correspond to that of REN2H1. The *lacS* gene comprises 1467 nucleotides. The sequence similarity to the *S. solfataricus* P2 *lacS* sequence is only 85%. The *pyrEF* and *lacS* sequences have been deposited in Gene Bank (accession numbers www, xxx, yyy, and zzz).

Mutational spectrum

The mutations found in the *pyrEF* genes or the *lacS* gene are summarized in table 3. Point mutations occurred frequently. Insertion sequence mutants were also detected. *S. islandicus* REN1H1 R20-R22 contain the element SMN1 (Berkner and Lipps, 2007) that inserted into the promoter region of the *pyrEF* operon. A one bp deletion and a one bp insertion were found in the *lacS* gene of *S. islandicus* REN1H1 S1 and the *pyrF* gene of *S. islandicus* REN2H1 DM. Most of the point mutation mutants showed more than one mutation, some also exhibited silent mutations. Mutations with high probability to cause a loss of function are specified in table 3.

With the additional information gained on *S. islandicus* strains, it becomes obvious that there are three types of different mutational spectra. *S. solfataricus* P1 and P2 show high

spontaneous mutation frequencies associated with a high to very high fraction of insertion sequence mutants and a lower fraction of point mutants (Martusewitsch et al., 2000, Redder and Garrett, 2006). In contrast, *S. acidocaldarius* shows lower spontaneous mutation frequencies and no active insertion elements (Jacobs and Grogan, 1997, Grogan et al., 2001). The icelandic *S. islandicus* isolates show mutation frequencies in the same range or below the values for *S. acidocaldarius* but also contain active insertion sequences. Therefore the presence of active insertion sequences does not necessarily lead to high spontaneous mutation frequencies. However in *S. islandicus* no partial or complete deletion mutants were detected (apart from the one bp deletion), despite screening a high number of mutants. The fraction of this type of mutations is highest in *S. acidocaldarius*, where duplications and deletions make up the largest fraction of all mutations (Grogan et al., 2001). Considering the apparent and actual mutation frequencies for *S. islandicus* REN1H1, REN2H1 and HVE10/4, these strains are closer to *S. acidocaldarius* but from the spectrum of mutations they show similarities to *S. solfataricus* P1 and P2 despite displaying lower activities of insertion sequences. The *S. islandicus* strains seem to be genetically more stable than *S. solfataricus* P1 and P2 but less stable than *S. acidocaldarius*.

Reversion frequencies

Next the reversion frequencies for the mutants were determined, to be able to judge their suitability as stable recipient mutants for the development of genetic systems. *S. islandicus* REN2H1 mutants were not further characterized in detail because we found that this strain contains a restriction/modification system (Söllner, et al., 2006). For the mutants of *S. islandicus* REN1H1 and HVE10/4 the reversion frequencies were determined by small scale fluctuation tests (table 4).

The reversion frequencies were very low. With the exception of HVE10/4 H1 no revertants could be detected. The reversion frequencies are in the same range as the ones

determined by Blount and Grogan (Blount and Grogan, 2005) for *S. islandicus* insertion sequence mutants (0.19- <0.02 reversions per generation and 10^8 cells). The exception is the relatively high reversion frequency for HVE10/4 H1. HVE10/4 showed the lowest mutation frequency (table 1 and 2) but the highest reversion frequency. The reason for this behavior is unknown, but could point to an efficient system for repair of DNA damage in this strain.

Because of the low reversion frequencies all the *S. islandicus* REN1H1 mutants were considered to be suitable recipient strains e.g. for transformation of shuttle vector constructs using the *pyrEF* genes as selectable marker.

Increased reversion frequencies after electroporation

When using the different *S. islandicus* mutants in electroporation experiments, however, considerably higher reversion frequencies were detected. When plating a 10^{-4} dilution of cells directly after electroporation (3 h of regeneration in tryptone medium, shorter than the generation time of *S. islandicus* of app. 6 h under these growth conditions), tens to several hundreds of colonies were observed on selective plates without uracil either on tryptone or on 20AS medium. From the small scale fluctuation experiments we would expect no colonies to arise at that dilution. We verified by PCR and sequencing that reversion was the cause for the restored ability to grow on medium without uracil. The reversion rate of point mutants and mutants containing insertion sequences were higher by several orders of magnitude after electroporation than determined in the small scale fluctuation tests where no revertants were obtained. As the high reversion frequencies were also observed for controls without plasmid but subjected to electroporation, the electroporation procedure seemed to increase reversion. This unexpected high background of revertants after electroporation precludes point mutants and insertion sequence mutants from being used as recipient strains. These findings indicate that only

mutants with larger deletions are suitable for the use with genetic systems that require high selective pressure for stable maintenance in the recipient strain.

Acknowledgements

We are grateful to Christa Schleper for providing us with the *pyrEF/lacS* mutant *S. islandicus* REN2H1 DM and to Paul Blum for the *lacS* deletion mutant *S. solfataricus* PBL2025. This work was supported by the DFG (grant Li 913/3 to G.L.).

References

- Aucelli T, Contursi P, Girfoglio M, Rossi M, Cannio R (2006) A spreadable, non-integrative and high copy number shuttle vector for *Sulfolobus solfataricus* based on the genetic element pSSVx from *Sulfolobus islandicus* Nucleic Acids Res 34(17):e114
- Berkner S, Grogan D W, Albers S V, Lipps G (2007a) Small multicopy, non-integrative shuttle vectors based on the plasmid pRN1 for *Sulfolobus acidocaldarius* and *Sulfolobus solfataricus*, model organisms of the (cren-)archaea. Nucleic Acids Res doi:10.1093/nar/gkm449
- Berkner S, Lipps G (2007b) An active nonautonomous mobile element in *Sulfolobus islandicus* REN1H1. J Bacteriol 189:2145-2149
- Blount Z D, Grogan D W (2005) New insertion sequences of *Sulfolobus*: functional properties and implications for genome evolution in hyperthermophilic archaea. Mol Microbiol 55:312-325
- Brock T D, Brock K M, Belly R T, Weiss R L (1972) *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. Arch Microbiol 84:54-68
- Brügger K, Redder P, She Q, Confalonieri F, Zivanovic Y, Garrett R A (2002) Mobile elements in archaeal genomes. FEMS Microbiol Lett 206:131-141
- Brügger K, Torarinsson E, Redder P, Chen L, Garrett R A (2003) Shuffling of *Sulfolobus* genomes by autonomous and non-autonomous mobile elements. Biochem Soc Trans 32:179-183
- Charlebois R L, Singh R K, Chan-Weiher C C, Allard G, Chow C, Confalonieri F, Curtis B, Duguet M, Erauso G, Faguy D, Gaasterland T, Garrett R A, Gordon P, Jeffries A C, Kozera C, Kushwaha N, Lafleur E, Medina N, Peng X, Penny SL, She Q, St Jean A, van der Oost J, Young F, Zivanovic Y, Doolittle W F, Ragan M A, Sensen C W (2000) Gene content and organization of a 281-kbp contig from the genome of the extremely thermophilic archaeon, *Sulfolobus solfataricus* P2. Genome 43(1):116-136
- Chen L, Brügger K, Skovgaard M, Redder P, Qunxin S, Torarinsson E, Greve B, Awayez M, Zibat A, Klenk H-P, Garrett R A (2005) The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the crenarchaeota. J Bacteriol 187:4992-4999
- Grogan D W (1991) Selectable mutant phenotypes of the extremely thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. J Bacteriol 173:7725-7727
- Grogan D W, Gunsalus R P (1993) *Sulfolobus acidocaldarius* synthesizes UMP via a standard de novo pathway: results of a biochemical-genetic study. J Bacteriol 175:1500-1507
- Grogan D W, Carver, G T, Drake, J W (2001) Genetic fidelity under harsh conditions: Analysis of spontaneous mutation in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*.
- Jacobs K L, Grogan D W (1997) Rates of spontaneous mutation in an archaeon from geothermal environments. J Bacteriol 179:3298-3303
- Jonuscheit M, Martusewitsch E, Stedman K M, Schleper C (2003) A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle vector. Mol Microbiol 48:1241-1252
- Koch A L (1982) Mutation and growth rates from Luria-Delbrück fluctuation tests. Mutat Res 95:129-143
- Kondo S, Yamagishi A, Oshima T (1991) Positive selection for uracil auxotrophs of the sulfur-dependent thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* by use of 5-fluoroorotic acid. J Bacteriol 173:7698-7700
- Kurosawa N, Grogan D W (2005) Homologous recombination of exogenous DNA with the *Sulfolobus acidocaldarius* genome: properties and uses. FEMS Microbiol Lett 253:141-149

- Lea D E, Coulson C A (1949) The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *J Genet* 49:264-285
- Luria S E, Delbrück M (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genet* 28:491-511
- Martusewitsch E, Sensen C W, Schleper C (2000) High spontaneous mutation rate in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by transposable elements. *J Bacteriol* 182:2574-2581
- Redder P, Garrett R A (2006) Mutations and rearrangements in the genome of *Sulfolobus solfataricus* P2. *J Bacteriol* 188:4198-4206
- Sensen C W, Charlebois R L, Chow C, Clausen I G, Curtis B, Doolittle W F, Duguet M, Erauso G, Gaasterland T, Garrett R A, Gordon P, de Jong I H, Jeffries A C, Kozera C, Medina N, De Moors A, van der Oost J, Phan H, Ragan M A, Schenk M E, She Q, Singh R K, Tolstrup N (1998) Completing the sequence of the *Sulfolobus solfataricus* P2 genome. *Extremophiles* 2(3):305-312
- Schelert J, Dixit V, Hoang V, Simbahan J, Drozda M, Blum P (2004) Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* by use of gene disruption. *J Bacteriol* 186:427-437
- Schleper C, Kubo K, Zillig W (1992) The particle SSV1 from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* is a virus: demonstration of infectivity and of transfection with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(16):7645-7649
- Schleper C, Roder R, Singer T, Zillig W (1994) An insertion element of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* transposes into the endogenous beta-galactosidase gene. *Mol Genom and Genet* 243:91-96
- She Q, Singh R K, Confalonieri F, Zivanovic Y, Allard G, Awayez M J, Chan-Weiher C C, Clausen I G, Curtis B A, De Moors A, Erauso G, Fletcher C, Gordon P M, Heikamp-de Jong I, Jeffries A C, Kozera C J, Medina N, Peng X, Thi-Ngoc H P, Redder P, Schenk M E, Theriault C, Tolstrup N, Charlebois R L, Doolittle W F, Duguet M, Gaasterland T, Garrett R A, Ragan M A, Sensen C W, Van der Oost J (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7835-7840
- Söllner S, Berkner S, Lipps G (2006) Characterisation of the novel restriction endonuclease SuiI from *Sulfolobus islandicus*. *Extremophiles* 10:629-634
- Stedman KM, Schleper C, Rumpf E, Zillig W (1999) Genetic requirements for the function of the archaeal virus SSV1 in *Sulfolobus solfataricus*: construction and testing of viral shuttle vectors *Genet* 152(4):1397-1405
- Thia-Thoong T-L, Roovers M, Durbecq V, Gigot D, Glansdorf N, Charlier D (2002) Genes of de novo pyrimidine biosynthesis from the hyperthermophilic crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius*: novel organization in a bipolar operon. *J Bacteriol* 184:4430-4441
- Wolin E A, Wolin M J, Wolfe R S (1963) Formation of methane by bacterial extracts. *J Biol Chem* 238:2882-2886
- Worthington P, Hoang V, Perez-Pomares F, Blum P (2003) Targeted disruption of the alpha-Amylase gene in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol* 185:482-488
- Zillig W, Kletzin A, Schleper C, Holz I, Janekovic D, Hain J, Lanzendörfer M, Kristiansson J K (1994) Screening for Sulfolobales, their plasmids, and their viruses in islandic solfataras. *Syst Appl Microbiol* 16:606-628
- Zillig W, Stetter K O, Wunderl S, Schulz W, Priess H, Scholz I (1980) The *Sulfolobus*- "Caldariellea" Group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. *Arch Microbiol* 125:259-269

Tables

Table 1: Apparent mutation frequencies of the *pyrEF* genes in different *Sulfolobus* species and strains.

<i>Sulfolobus</i> species and strain	apparent mutation frequency of <i>pyrEF</i> genes	FOA/uracil concentration (µg/mL)	fraction of insertion elements (%)	reference
<i>S. solfataricus</i> P2	$1.3 \cdot 10^{-4}$	50/20	app. 67	Redder and Garrett, 2006
<i>S. solfataricus</i> P1	$2.4 - 31 \cdot 10^{-5}$	50/10	100	Martusewitsch et al., 2000
<i>S. solfataricus</i> PH1	$1.9 - 34 \cdot 10^{-5}$	50/10	100	Martusewitsch et al., 2000
<i>S. solfataricus</i> PBL2025	$3 \cdot 10^{-6}$	50/20	nd	this study
<i>S. acidocaldarius</i>	$1.8 - 4.4 \cdot 10^{-6}$	50/10	nd	Martusewitsch et al., 2000
	$8 \cdot 10^{-7}$	50/20	nd	this study
<i>S. islandicus</i> REN1H1	$8.7 \cdot 10^{-6}$	50/10	nd	Martusewitsch et al., 2000
	$2 \cdot 10^{-6}$	50/20	4	this study
<i>S. islandicus</i> REN2H1	$1 \cdot 10^{-6}$	50/20	nd	this study
<i>S. islandicus</i> HVE10/4	$5 \cdot 10^{-8}$	50/20	<4	this study

nd: not determined

Table 2: Actual mutation frequencies determined by small scale fluctuation tests for different *Sulfolobus* species and strains

<i>Sulfolobus</i> species and strain	mutation frequency of <i>pyrEF</i> genes (mutations per cell division and 10 ⁷ cells)	FOA/uracil concentration (µg/mL)	fraction of insertion elements (%)	reference
<i>S. solfataricus</i> P1	1.4-1.7		nd	
<i>S. islandicus</i> REN1H1	0.5-0.6	250/20	4	this study
<i>S. islandicus</i> REN2H1	0.2		nd	
<i>S. islandicus</i> HVE10/4	0.08		< 4	
<i>S. islandicus</i> isolates	1.3-37	150/20	5.6-88.9	Blount and Grogan, 2005

nd: not determined

Table 3: Characterization of the genotype of *pyrEF* and *lacS* deficient mutants.

<i>Sulfolobus islandicus</i> strain	gene	type of mutation	nucleotide change	amino acid change	reason for inactivation
REN1H1R1	<i>pyr E</i>	point mutation	223 G→A	A75→T	A75 is conserved
		silent mutation	336 T→C	-	
REN1H1 R20, R21, R22	promotor <i>pyrEF</i>	insertion sequence	SMN1 in TATA-Box	-	negative influence on transcription
REN1H1 S1	<i>lacS</i>	frameshift mutation	648 T is lacking	from V216 10 nonsense aa, then stop codon	lacking C-terminal 274 aa
REN1H1 S1R1	<i>lacS</i>	same as mutant S1			
	<i>pyrE</i>	point mutation	350 G→A	G117→E	G117 is situated in the vicinity of the active site
	<i>pyrF</i>	point mutation	245 T→C	F82→S	
REN2H1 DM	<i>lacS</i>	point mutation	1280 T→A	L427→stop	lacking C-terminal 63 aa
	<i>pyrF</i>	frameshift mutation	A inserted behind nt 346	stop codon 1 AS later	lacking C-terminal 109 aa
HVE10/4 H1	<i>pyrE</i>	point mutation	223 G→T	A75→S	A75 is conserved
		point mutation	586 C→T	Q196→stop	lacking C-terminal 7 aa
	<i>pyrF</i>	silent mutation	12 C→T		
		point mutation	26 C→T	A9→V	
		silent mutation	339 G→A		
		point mutation	430 A→G	T144→A	
		point mutation	549 T→A	Y183→stop	lacking C-terminal 40 aa

nucleotide positions for *pyrE*, *pyrF*, and *lacS* refer to the A of the ATG start codon of the respective gene as position 1; aa = amino acids.

Table 4: Reversion frequencies for *pyrEF* and *lacS* deficient mutants determined by small scale fluctuation tests.

<i>Sulfolobus islandicus</i> strain	selection/detection used	reversions per generation and 10^8 cells
REN1H1 R1	growth on uracil free medium	< 0.6
REN1H1 R20	growth on uracil free medium	< 0.6
REN1H1 R21	growth on uracil free medium	< 0.6
REN1H1 R22	growth on uracil free medium	< 0.6
REN1H1 S1	screening with Xgal	< $6 \cdot 10^2$
REN1H1 S1R1	growth on uracil free medium	< 0.6
HVE10/4 H1	growth on uracil free medium	1.0-1.5

the range given comprises the lowest and highest value obtained by using the first, second or third quartile of the revertant frequency distributions, when no revertants were observed the upper limit was estimated using the p0 method.

Figures

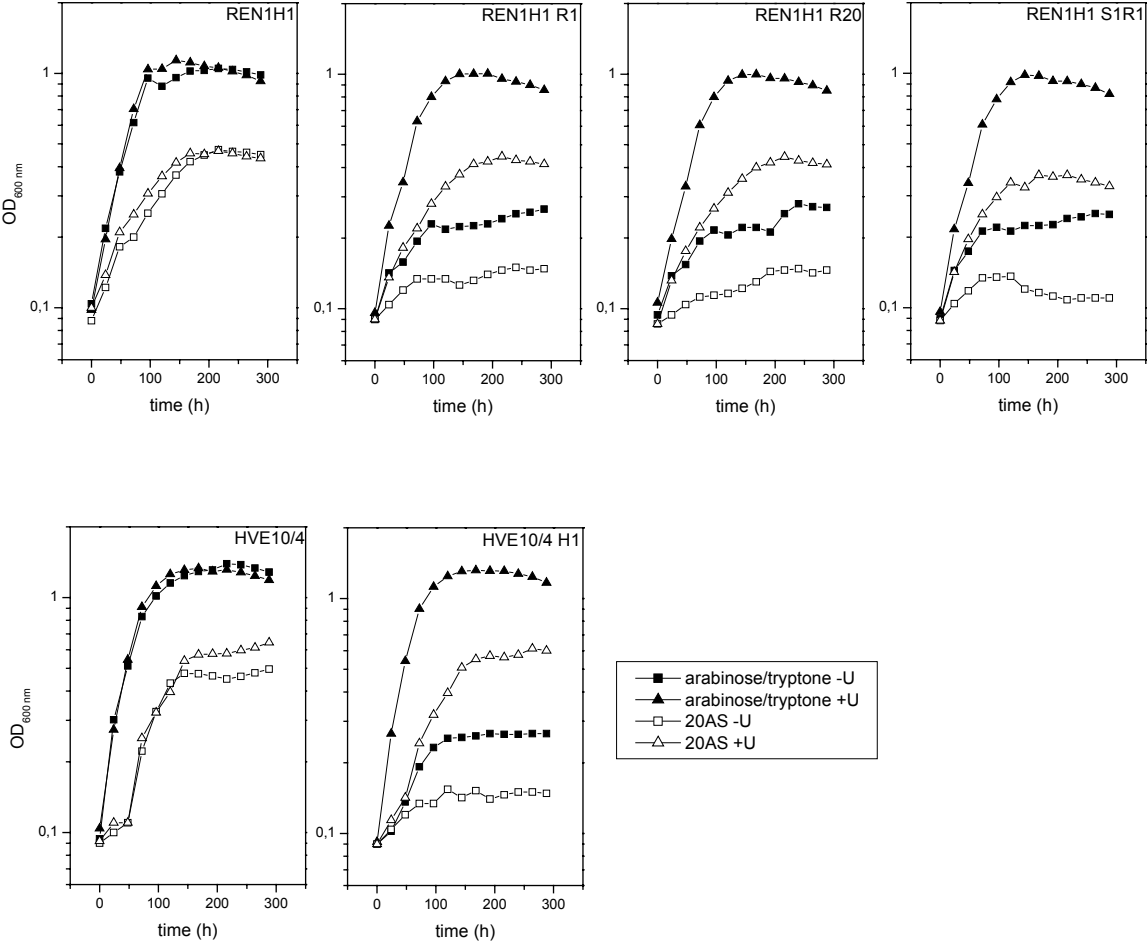


Figure 1: Growth curves for *S. islandicus* wild type and *pyrEF* deficient mutant strains in tryptone containing medium +/- uracil (U) and in more selective amino acid medium (20AS) +/- uracil.

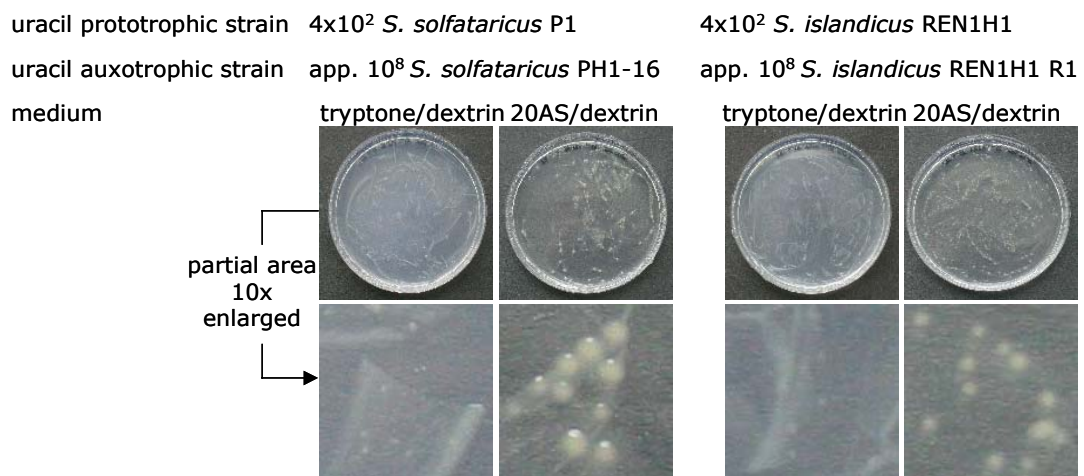


Figure 2: Competition experiments to determine the efficiency of uracil selection on different media. The indicated numbers of uracil prototrophic and auxotrophic cells were mixed and plated on tryptone/dextrin plates and 20AS/dextrin plates.

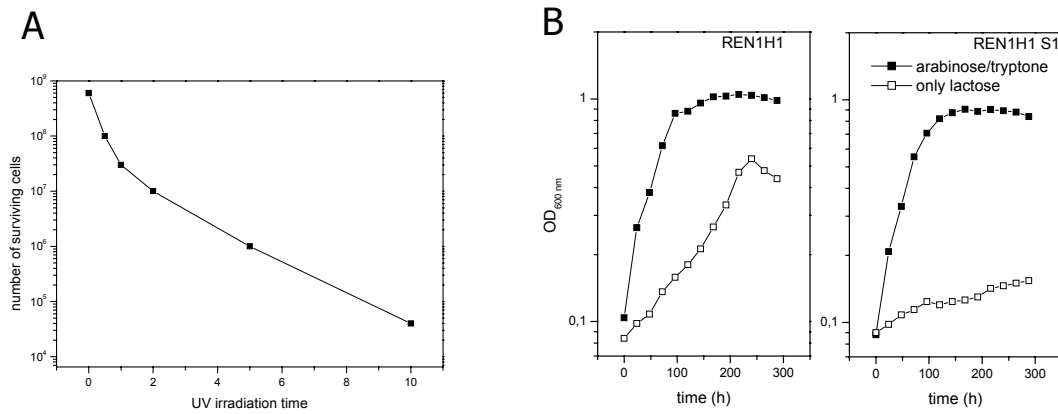


Figure 3: A: Number of surviving cells after exposure to UV irradiation for *S. islandicus* REN1H1 at OD 0.8. B: Growth curves for the *lacS* deficient mutant strain REN1H1 S1 in tryptone/arabinose containing medium and in lactose only containing medium.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Diese Arbeit wurde von März 2003 bis Juli 2007 am Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth unter Leitung von PD Dr. Georg Lipps angefertigt. Bei ihm möchte ich mich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die herausfordernde Themenstellung, die gewährten Freiheiten und Offenheit für neue Methoden und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeiten bedanken. Insbesondere möchte ich mich für sein Vertrauen bedanken, mir als fachfremdem Absolventen eine Chance zu geben und innerhalb kürzester Zeit die Grundlagen biochemischen und molekularbiologischen Arbeitens zu vermitteln.

Herzlichen Dank an Prof. Krauss für die Möglichkeit, die Arbeiten an seinem Lehrstuhl durchzuführen, für die Unterstützung und die ausgezeichnete Atmosphäre am Lehrstuhl.

Vielen Dank an meine Laborkollegen Andreas Schmidt, Yiwei Huang, Jörg Schmidgall, Sandra Schaffer, Irina Dieser, Birgit Nüsslein, Dong Han, Kirsten Beck, Linda Wenzel, Martin Sanchez und Kristina Kufner für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Laboratmosphäre. Insbesondere möchte ich mich bei Kirsten Beck für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herzlichen Dank an Sonja Albers (Universität Groningen, Niederlande) für ihre Unterstützung, Diskussionsbereitschaft, ihren Ideenreichtum, die gute Zusammenarbeit und die Ermöglichung eines Aufenthalts in ihrer Arbeitsgruppe zum Erlernen des Umgangs mit dem pMJ-Virus-Vektorsystem.

Vielen Dank an Prof. Dennis Grogan (University of Cincinnati, USA) für die gute Zusammenarbeit beim Testen der pRN1-basierten Shuttle-Vektoren und für seine Diskussionsbereitschaft.

Bei Stefan Söllner und Claudia Lindemann bedanke ich mich für die Unterstützung im Rahmen von Vertiefungspraktika und Diplomarbeiten.

Bei Maria Quanz bedanke ich mich für ihre Unterstützung als wissenschaftliche Hilfskraft.

Bei Prof. Lehner, Prof. Schumann, Stefan Heidmann und Thomas Wiegert (Lehrstuhl Genetik, Universität Bayreuth) bedanke ich mich für die Möglichkeit zur Nutzung des qRT-PCR-Gerätes und des Elektroporators.

Bei Stefan Heidmann und Thomas Wiegert (Lehrstuhl Genetik, Universität Bayreuth), Alexandra Kessler, Monika Häring und David Prangishvili (Institut Pasteur, Frankreich), Christa Schleper, Melanie Jonuscheit und Sabrina Fröls (Universität Bergen, Norwegen), Peter Agron (University of California, USA), Iain Murray (University of Sheffield, UK), Dennis Grogan (University of Cincinnati, USA), Paul Blum (University of Nebraska, USA) und Rick Morgan (NEB, USA) bedanke ich mich für verschiedene Plasmide, Antikörper, *Sulfolobus*- und *E. coli* Stämme.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

