



Fakultät für Naturwissenschaften

Abteilung Biologie II

Charakterisierung der Prozessierungs- und Interferenzaktivität des CRISPR/Cas- Systems in *Haloferax volcanii*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für
Naturwissenschaften der Universität Ulm

vorgelegt von Jutta Brendel aus Augsburg

Ulm, Januar 2014

Amtierender Dekan der Fakultät für Naturwissenschaften:

Prof. Dr. Joachim Ankerhold

Erstgutachterin:

Prof. Dr. Anita Marchfelder

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Stefan Binder

Tag der Promotion: 10.02.2014

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	11
1.1. Prokaryotische Abwehrmechanismen.....	11
1.2. Das CRISPR/Cas System	12
1.2.1. Entdeckungsgeschichte, Verbreitung und Komponenten	12
1.2.2. Funktionsweise	15
1.2.3. Regulation	25
1.2.4. Anwendungen	25
1.3. Untersuchte Organismen.....	27
1.3.1. <i>Haloferax volcanii</i>	27
1.3.2. Das CRISPR/Cas-System von <i>H. volcanii</i>	28
1.3.3. <i>Caldicellulosiruptor lactoaceticus</i>	30
1.3.4. Das CRISPR/Cas-System von <i>C. lactoaceticus</i>	31
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	33
2. MATERIAL.....	34
2.1. Stämme.....	34
2.2. Vektoren	36
2.3. Nukleinsäuren.....	39
2.4. Mutagenese	42
2.5. Marker	42
2.6. Enzyme und Inhibitoren.....	43
2.7. Reinigung von Proteinen	43
2.8. Reinigung von Nukleinsäuren	43
2.9. Sondenmarkierung	44
2.10. Antikörper.....	44
2.11. Chemikalien	44
2.12. Nährmedien	44
2.13. Puffer und Lösungen.....	47
2.14. Laborausstattung.....	54
2.15. Geräte	56
2.16. Software.....	58

3. METHODEN	59
3.1. Standardmethoden.....	59
3.2. Herstellung der Plasmidkonstrukte	59
3.2.1. Herstellung von Antikörpern.....	59
3.2.2. Komplementationskonstrukte.....	60
3.2.3. Integrative Plasmide für die Knockouts von <i>cas</i> -Genen	60
3.2.4. Integratives Plasmid für den Knockout von <i>cas5</i>	62
3.2.5. Reinigung von Cas-Protein-Komplexen.....	62
3.2.6. Mutationsanalyse von HvoCas6.....	63
3.2.7. Reinigung von HvoCas6.....	64
3.2.8. Herstellung von crRNA-Vorläufern	64
3.2.9. Reinigung von ClaCas6 aus <i>E. coli</i>	64
3.3. Herstellung von spezifischen Antikörpern.....	65
3.3.1. Überproduktion von Proteinen in <i>E. coli</i>	65
3.3.2. Herstellung von Harnstoff-Zellextrakten aus <i>E. coli</i>	65
3.3.3. Gewinnung von spezifischen Antikörpern aus Mäusen.....	66
3.4. Transformation von <i>H. volcanii</i>	66
3.4.1. Überprüfung von transformierten Stämmen	67
3.4.2. Interferenztests.....	68
3.5. Herstellung von Knockout-Stämmen.....	68
3.6. Analyse von genomischer DNA aus <i>H. volcanii</i>	70
3.6.1. Isolation von genomischer DNA.....	70
3.6.2. Southern Blot	70
3.6.3. Sondenhybridisierung von Southern Blots	71
3.7. Analyse der RNA aus <i>H. volcanii</i>	73
3.7.1. Isolation von RNA aus Flüssigkulturen.....	73
3.7.2. Isolation von RNA aus Elutionsfraktionen	73
3.7.3. Sondenhybridisierung von Northern Blots	73
3.7.4. Quantifizierung.....	74
3.8. Reinigung von Proteinen	75
3.8.1. Herstellung von <i>H. volcanii</i> -Zellextrakten.....	75
3.8.2. Herstellung von <i>E. coli</i> -Zellextrakten	76

3.8.3. Reinigung von Proteinen durch Affinitätschromatographie.....	76
3.8.4. Reinigung von Proteinen durch Gelfiltration	77
3.9. Untersuchung der Prozessierung <i>in vitro</i>	78
3.9.1. Radioaktive Markierung von RNA	78
3.9.2. Herstellung von markierten crRNA-Vorläufern	79
3.9.3. <i>in vitro</i> Prozessierung.....	79
3.10. Untersuchung von Protein-RNA-Interaktionen	80
3.10.1. EMSA	80
3.10.2. Quervernetzung durch UV-Licht	80
3.11. Nachweis von Proteinen.....	81
3.11.1. Antikörper-Detektion.....	81
3.11.2. Silberfärbung.....	81
3.11.3. Färbung mit Coomassie.....	82
3.11.4. Färbung mit Ponceau-Rot	82
3.11.5. Massenspektrometrie	82
4. ERGEBNISSE.....	84
4.1. Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen Cas-Proteine	84
4.1.1. Gewinnung von Antigen.....	84
4.1.2. Testen der antikörperhaltigen Seren	85
4.2. Untersuchung der crRNA-Prozessierungsmaschinerie in <i>H. volcanii</i>	88
4.2.1. Ermittlung der beteiligten Proteine	88
4.2.1.1. Herstellung der Konstrukte und Stämme für die Komplementation	88
4.2.1.2. Analyse der crRNA-Level der Komplementationsstämme	89
4.2.1.3. Herstellung der <i>cas</i> -Gen-Knockout Stämme.....	89
4.2.1.4. Überprüfung der Knockout-Stämme durch Southern Blot.....	93
4.2.1.5. Analyse der crRNA-Level der Knockout-Stämme.....	94
4.2.1.6. Untersuchung der Interferenz in den Knockoutstämmen „6875“ und „675“	94
4.2.2. Untersuchung eines <i>cas5</i> -Knockout-Stamms	97
4.2.2.1. Herstellung und Überprüfung des <i>cas5</i> -Knockout Stamms.....	97
4.2.2.2. Analyse des crRNA-Level im <i>cas5</i> -Knockout-Stamm	97
4.2.3. Untersuchung des putativen Cascade-Komplexes.....	99

4.2.3.1. Herstellung der Konstrukte und Stämme zur Reinigung des Komplexes	99
4.2.3.2. Reinigung der Komponenten des putativen Komplexes	100
4.2.3.3. Isolation von RNA aus den putativen Komplexen.....	105
4.2.3.4. Gelfiltration	106
4.3. Untersuchung von Cas6 aus <i>H. volcanii</i> (HvoCas6)	108
4.3.1. Mutationsanalyse von HvoCas6.....	108
4.3.1.1. Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren	108
4.3.1.2. Herstellung der Konstrukte und Stämme	110
4.3.1.3. Analyse der Auswirkungen der Mutationen auf die crRNA-Population	111
4.3.1.4. Analyse der Auswirkungen der Mutationen auf die Interferenz	113
4.3.1.5. Überprüfung der Löslichkeit	114
4.3.2. Reinigung von HvoCas6.....	115
4.3.2.1. Reinigung von HvoCas6 aus <i>E. coli</i>	115
4.3.2.2. Reinigung von HvoCas6 aus <i>H. volcanii</i>	116
4.3.2.3. Gelfiltration	118
4.4. Untersuchung der Prozessierung <i>in vitro</i>	120
4.5. Untersuchung von Cas6 aus <i>C. lactoaceticus</i> (ClaCas6)	122
4.5.1. Herstellung von rekombinantem Protein	123
4.5.2. Untersuchung der Protein-RNA-Interaktion	124
4.5.3. Untersuchung der Prozessierung von ClaCas6 <i>in vitro</i>	125
5. DISKUSSION.....	127
5.1. Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen Cas-Proteine	127
5.2. Überprüfung der Knockout-Stämme	128
5.3. Untersuchung der crRNA-Prozessierungsmaschinerie	129
5.4. Untersuchung von Cas6 aus <i>H. volcanii</i>	135
5.5. Untersuchung der Prozessierung <i>in vitro</i>	137
5.6. Untersuchung von Cas6 aus <i>C. lactoaceticus</i>	139
6. ZUSAMMENFASSUNG	142
7. SUMMARY	144

8. ANHANG.....	146
8.1. Literaturverzeichnis	146
8.2. Abbildungsverzeichnis	158
8.3. Tabellenverzeichnis	159
8.4. Verwendete Abkürzungen	160
8.5. Massenspektrometrische Analysen.....	162
8.6. Genehmigung für Tierversuche	170
8.7. Anpassung von Gensequenzen.....	170
8.8. Bioinformatische Vorhersage von Sekundär- und Tertiärstrukturen.....	172
8.9. Das CRISPR/Cas-System von <i>C. lactoaceticus</i>	174
8.10. Interferenztests	176
9. CURRICULUM VITAE.....	178
10. PUBLIKATIONSLISTE	179
11. DANKSAGUNG.....	181
12. ERKLÄRUNG ÜBER DIE IN ANSPRUCH GENOMMENEN HILFEN.....	183

1. EINLEITUNG

1.1. Prokaryotische Abwehrmechanismen

Für das Überleben aller Organismen ist es unumgänglich, sich ständig an die Veränderungen in ihrer dynamischen Umgebung anzupassen. So werden auch Prokaryoten nicht nur durch Umweltfaktoren wie beispielsweise Temperaturschwankungen und wechselnde Nährstoffangebote beeinflusst, sondern auch durch horizontalen Gentransfer durch mobile genetische Elemente. Diese interzelluläre Übertragung von DNA kann bei Prokaryoten durch Konjugation (Übertragung von Plasmiden zwischen Zellen), Transformation (Aufnahme von DNA aus der Umgebung) oder Transduktion (Infektion mit Bakteriophagen) stattfinden (THOMAS&NIELSEN, 2005). Auch wenn horizontaler Gentransfer manchmal für das Überleben und die Anpassung der Zelle vorteilhaft sein kann, beispielsweise wenn damit Antibiotika-Resistenzen oder die Fähigkeit zum Abbau toxischer Substanzen erworben werden (FROST *ET AL.*, 2005), so ist vor allem die Infektion mit Phagen meist schädlich und endet häufig mit der Zerstörung der Zelle. Virus-ähnliche Partikel übertreffen zahlenmäßig ihre prokaryotischen Wirtszellen bis um das Zehnfache und besitzen außerdem eine hohe Mutationsrate und damit eine große genetische Variabilität (HATFUL, 2008; BRÜSSOW&HENDRIX, 2002). Studien haben gezeigt, dass bis zu 50 % der täglich produzierten marinen Bakterien von Phagen zerstört werden (BREITBART&ROHWER, 2005). Als Folge auf den Selektionsdruck durch diese vielfältige, übermächtige Bedrohung haben sich in Bakterien und Archaeen eine Vielzahl verschiedener Abwehrmechanismen entwickelt, die teilweise einen beträchtlichen Teil des Genoms einnehmen (MAKAROVA *ET AL.*, 2011a) und an vielen Punkten des viralen Lebenszyklus angreifen.

Die erste Verteidigungslinie stellt die Verhinderung des Andockens des Phagen an die Zelle dar. Beim als Adsorption bezeichneten Vorgang binden Viren an Rezeptoren der Zielzelle, um im Folgenden ihr genetisches Material einzubringen (BERTIN *ET AL.*, 2011). Diese Rezeptoren können von der Wirtszelle blockiert werden, beispielsweise durch Veränderung ihrer Struktur oder Maskierung durch spezielle Proteine, aber auch auf rein physikalische Weise durch Bildung einer extrazellulären Matrix. Eine weitere Möglichkeit ist die Bildung kompetitiver Inhibitoren, die mit den Phagen um den entsprechenden Rezeptor konkurrieren (LABRIE *ET AL.*, 2010). Zuletzt kann durch spezielle Proteine die Aufnahme der viralen DNA in die Zelle verhindert werden (GARVEY *ET AL.*, 1996; MCGRATH *ET AL.*, 2002).

Sollte es dennoch dazu kommen, dass der Phage seine DNA in die Wirtszelle injiziert, kommen intrazelluläre Verteidigungsmechanismen zum Tragen. Teilweise basieren diese auf der Vernichtung der befallenen Zelle. Ähnlich dem programmierten Zelltod (Apoptose) bei mehrzelligen Organismen wird durch die Infektion der Zelltod durch ein toxisches Protein induziert, um eine weitere Verbreitung des Virus zu verhindern und damit den Fortbestand der Population zu sichern. Meist wirken diese Toxine auf die Translation, indem sie mRNA-

und tRNA-Moleküle degradieren. Diese Mechanismen zählen zu den ABI (*abortive infection*) und TA (*toxin/antitoxin*) Systemen (MAKAROVA *ET AL.*, 2013, LABRIE *ET AL.*, 2010).

Es besteht jedoch für die Wirtszelle auch die Möglichkeit, die Infektion zu bekämpfen, ohne sich dabei selbst zu zerstören. Diese Mechanismen bestehen darin, die virale DNA als fremd zu erkennen und abzubauen, bevor es zu Replikation, Transkription, Translation, Zusammenbau neuer Virus-Partikel und Lyse der Wirtszelle kommt. Restriktions-Modifikations-Systeme (R-M) sind in Bakterien und Archaeen weit verbreitet und stellen die prokaryotische Version einer angeborenen Immunität dar. Das Prinzip von R-M-Systemen besteht darin, die eigene DNA durch eine Methyltransferase zu modifizieren und damit als eigene zu markieren, während eine Restriktionsendonuklease unmethylierte DNA als fremd identifizieren und degradieren kann. Nicht zuletzt aufgrund der verbreiteten Anwendung der Restriktionsendonukleasen in der Molekularbiologie sind R-M-Systeme gut charakterisiert (MAKAROVA *ET AL.*, 2013, LABRIE *ET AL.*, 2010).

Erst kürzlich wurde jedoch ein weiterer prokaryotischer Abwehrmechanismus entdeckt, das CRISPR/Cas-System. Wie das R-M-System basiert das CRISPR/Cas-System auf der Unterscheidung von eigener und fremder Nukleinsäure und dem Abbau letzterer. Allerdings ist das CRISPR/Cas-System befähigt, spezifisch auf die Infektion mit einem bestimmten Phagen zu reagieren, also eine Resistenz neu zu erwerben, und diese Information auch an die Nachkommen der Zelle weiterzugeben. Es stellt also eine sowohl anpassungsfähige als auch vererbte Form der Immunität dar und ist damit das momentan deutlichste Beispiel für eine Lamarcksche Vererbung (KOONIN&WOLF, 2009).

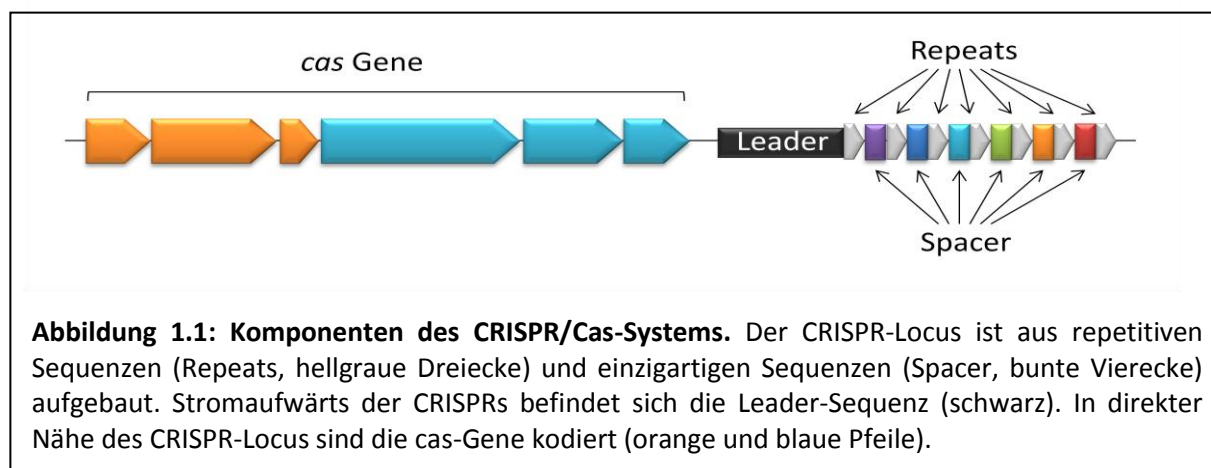
1.2. Das CRISPR/Cas System

1.2.1. Entdeckungsgeschichte, Verbreitung und Komponenten

Ishino *et al.* entdeckten 1987 in *Escherichia coli* in der Nähe des *iap*-Gens ungewöhnliche repetitive Sequenzen, welche von einzigartigen Abschnitten unterbrochen werden (ISHINO *ET AL.*, 1987). Ähnliche Strukturen wurden im Folgenden auch in anderen Prokaryoten gefunden (HOE *ET AL.*, 1999; MASEPOHL *ET AL.*, 1996; MOJICA *ET AL.*, 1995; VAN EMBDEN *ET AL.*, 2000). Jansen *et al.* identifizierten mit diesen repetitiven Sequenzen assoziierte Gene und prägten die Akronyme CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) für die Cluster aus repetitiven Elementen und Cas (*CRISPR associated*) für die vergesellschafteten Gene (JANSEN *ET AL.*, 2002). Die Funktion blieb einige Jahre unklar, bis durch die zunehmende Sequenzierung prokaryotischer Genome, Plasmide und viraler Genome die entscheidende Erkenntnis erlangt wurde, dass die einzigartigen Sequenzen zwischen den repetitiven Abschnitten teilweise extrachromosomalen Ursprungs sind und Übereinstimmungen mit mobilen genetischen Elementen wie Phagen oder Plasmiden aufweisen. Da ein Großteil der potentiell in der Natur vorkommenden Phagen nach wie vor nicht bekannt ist bzw. deren

Genome bis jetzt nicht sequenziert wurden, konnten lediglich für zwei Prozent der einzigartigen Sequenzabschnitte solche Übereinstimmungen gefunden werden (MARRAFFINI&SONTHEIMER, 2010a). Allerdings konnten im Falle des Milchsäurebakteriums *Streptococcus thermophilus* beispielsweise, für welches aufgrund seiner Bedeutung für die milchverarbeitende Industrie diverse Genomsequenzen entsprechender Phagen bekannt sind, 40% der Sequenzabschnitte zugeordnet werden (BOLOTIN *ET AL.*, 2005, MOJICA *ET AL.*, 2005, POURCEL *ET AL.*, 2005). Zusammen mit den Erkenntnissen, dass von den CRISPR-Loci Transkripte von definierten Längen gebildet werden (LILLESTØL *ET AL.*, 2006) und für viele der *cas*-Gene Nukleinsäure-assoziierte Funktionen vorausgesagt wurden, führte dies zu der Theorie, dass das CRISPR/Cas-System zur Erkennung und Degradierung mobiler genetischer Elemente bestimmt ist, mit einer der eukaryotischen RNA-Interferenz (RNAi) vergleichbaren Funktionsweise (MAKAROVA *ET AL.*, 2006). Kurz danach konnte in *S. thermophilus* experimentell nachgewiesen werden, dass durch das CRISPR/Cas-System Resistenz gegen Phagen erworben werden kann (BARRANGOU *ET AL.*, 2007), wohingegen in *Staphylococcus epidermidis* gezeigt wurde, dass die Übertragung von Plasmiden verhindert werden kann (MARRAFFINI&SONTHEIMER, 2008).

Der allgemeine Aufbau eines CRISPR-Locus ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Die repetitiven Sequenzen eines CRISPR-Locus (Repeats) sind zwischen 27 und 50 Nukleotiden lang, wobei die meisten CRISPR/Cas-Systeme Repeats von ca. 30 Nukleotiden aufweisen. Die einzigartigen Sequenzabschnitte (Spacer) besitzen meist eine vergleichbare Länge (JANSEN *ET AL.*, 2002; MARRAFFINI&SONTHEIMER, 2010a). Die Sequenz der Repeats ist häufig teilweise palindromisch und legt eine Ausbildung von Sekundärstrukturen nahe. Es wird jedoch vermutet, dass bestimmte Repeats auch unstrukturiert sind. Auf Basis von Sequenz und potentieller Sekundärstruktur wurden Repeat-Typen in 12 Klassen eingeteilt (KUNIN *ET AL.*, 2007). Aktuelle bioinformatische Untersuchungen ergaben 40 Familien konservierter Sequenzen und 33 Familien mit konservierten potentiellen Sekundärstrukturen, welche in sechs Superklassen eingeteilt wurden (LANGE *ET AL.*, 2013). Innerhalb eines CRISPR-Locus sind die Repeats in Länge und Sequenz konserviert, zwischen verschiedenen Loci können sie sich jedoch unterscheiden. Die Anzahl von Repeat-Spacer-Einheiten innerhalb eines Locus kann

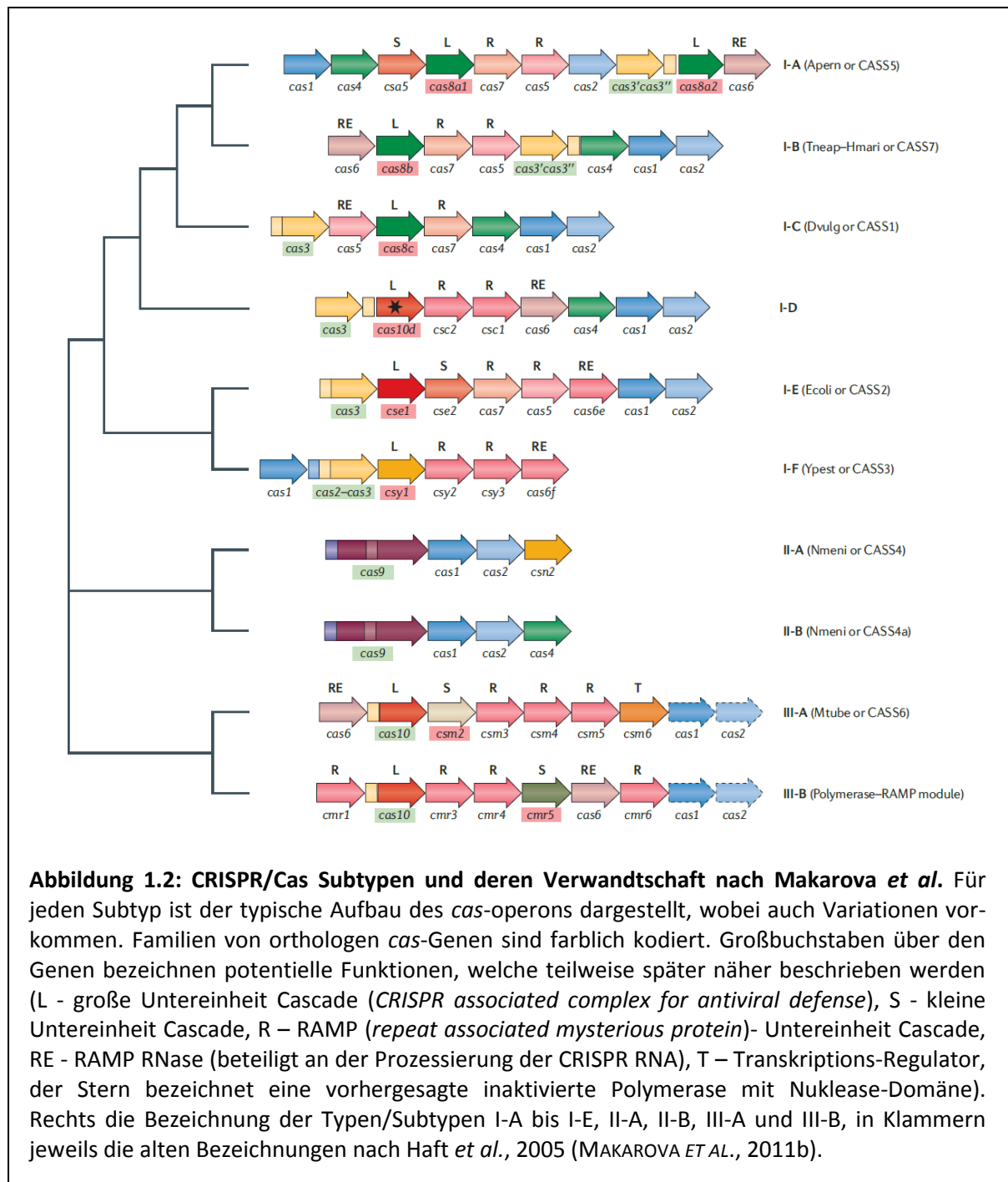


stark variieren (KUNIN *ET AL.*, 2007). So kann ein Locus lediglich wenige Spacer enthalten, wohingegen in *Haliangium ochraceum* DSM 14365 ein Locus mit 587 Repeat-Spacer-Einheiten existiert (GRISSA *ET AL.*, 2007a).

Stromaufwärts der Repeat-Spacer-Einheiten findet sich ein Sequenzabschnitt von mehreren hundert Nukleotiden, welcher als Leader bezeichnet wird (Abbildung 1.1). Der Leader-Bereich enthält keinen offenen Leserahmen, hat also kein proteinkodierendes Potential (LILLESTØL *ET AL.*, 2006), weist jedoch einen erhöhten Anteil an Adeninen und Thyminen auf (JANSEN *ET AL.*, 2002). In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass innerhalb des Leader-Bereichs ein Promotor zu finden ist, von dem aus der CRISPR-Locus transkribiert wird (PUL *ET AL.*, 2010). In *S. thermophilus* wurde außerdem gezeigt, dass die Integration neuer Spacer im Zuge der Immunisierung meist am Leader-Ende des CRISPR-Locus stattfindet (BARRANGOU *ET AL.*, 2007; GARNEAU *ET AL.*, 2010), wobei in *E. coli* beobachtet wurde, dass in Loci ohne Leader keine neuen Spacer integriert werden (YOSEF *ET AL.*, 2012). Auch wenn die Untersuchungen noch sehr lückenhaft sind, liegt eine Beteiligung des Leader-Bereichs an diesem Vorgang durchaus nahe (LILLESTØL *ET AL.*, 2006; MARRAFFINI&SONTHEIMER, 2008).

Jansen *et al.* identifizierten bereits 2002 vier Gene (*cas1-4*) in direkter Nähe der Loci, welche lediglich in CRISPR-positiven Genomen zu finden waren (JANSEN *ET AL.*, 2002). Weitere bioinformatische Untersuchungen ergaben viele weitere *cas*-Gene, die in insgesamt 45 Familien eingeteilt und anhand von repräsentativen Organismen verschiedenen CRISPR/Cas-Subtypen zugeordnet wurden. Sechs *cas*-Gen-Familien (*cas1-6*) finden sich in verschiedenen Subtypen und wurden daher als „Kern“-*cas*-Gene bezeichnet, wobei *cas1* und *cas2* als einzige *cas*-Familien in allen Subtypen vorkommen und daher universell sind (HAFT *ET AL.*, 2005). Makarova *et al.* kombinierten 2011 neue phylogenetische Untersuchungen von *cas1*, Analysen der Sequenzen und Strukturen von Repeats und den Aufbau von *cas*-Loci, um eine einheitliche Nomenklatur der *cas*-Gene zu etablieren und die CRISPR/Cas-Systeme in drei Typen und zehn Subtypen einzuteilen (Abbildung 1.2). Jeder der drei Haupttypen weist jeweils ein charakteristisches *cas*-Gen auf, welches ausschließlich in dieser Gruppe von CRISPR/Cas-Systemen vorkommt (*cas3* in Typ I, *cas9* in Typ II und *cas10* in Typ III). Während Typ II bisher ausschließlich in Bakterien gefunden wurde, scheint Typ III vermehrt, jedoch nicht ausschließlich, in Archaeen vorzukommen (MAKAROVA *ET AL.*, 2011b).

Mit Hilfe speziell entwickelter Suchmaschinen konnten in ca. 90 % der archaealen und ca. 50 % der bakteriellen Genome CRISPR/Cas-Systeme gefunden werden, wobei innerhalb eines Genoms mehrere Loci vorkommen können. Archaeen weisen hierbei durchschnittlich fünf, Bakterien drei Loci auf, wobei nicht jeder Locus eigene *cas*-Gene besitzt (GRISSA *ET AL.*, 2007b; ROUSSEAU *ET AL.*, 2009). Die größte bekannte Anzahl enthält das Genom von *Methanocaldococcus jannaschii* mit 20 Loci (LILLESTØL *ET AL.*, 2006). Finden sich in einem Genom mehrere CRISPR/Cas-Systeme, so können diese verschiedenen Subtypen angehören. Ebenso können dieselben Subtypen in nicht näher verwandten Spezies vorkommen. Dies unterstützt die These, dass CRISPR/Cas-Systeme durch horizontalen Gentransfer übertragen werden können (HORVATH *ET AL.*, 2009, SHAH&GARRET, 2011).



1.2.2. Funktionsweise

Die Funktionsweise der CRISPR/Cas-Systeme kann in drei Phasen eingeteilt werden. Die erste Phase entspricht dem Vorgang der Immunisierung und wird als Adaptation bezeichnet. Im Zuge dieses Prozesses wird bei Eindringen fremder DNA in die Zelle ein Teil dieser ausgewählt, ausgeschnitten und als neuer Spacer in den CRISPR-Locus integriert. Die zweite Phase beinhaltet die Bildung kleiner RNA-Moleküle (CRISPR RNAs oder crRNAs), welche die Spezifität des Systems vermitteln. Die dritte als Interferenz bezeichnete Phase stellt die

Immunreaktion dar, während welcher fremde Nukleinsäuren zielgerichtet abgebaut werden (Abbildung 1.3). Im Folgenden sollen die einzelnen Stufen genauer hinsichtlich Funktionsweise und beteiligter Komponenten charakterisiert werden.

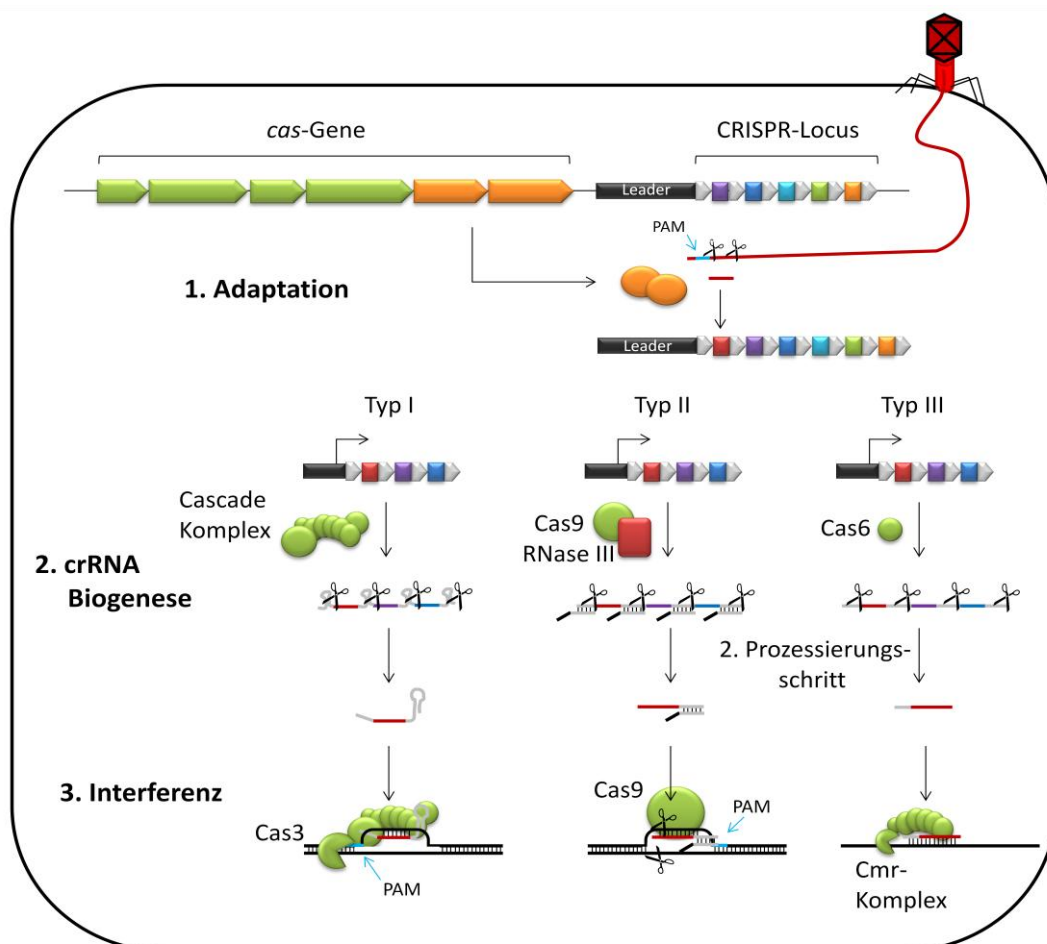


Abbildung 1.3: Die drei Phasen der CRISPR/Cas-Abwehr. 1. Adaptation: Ein Teil des viralen Genoms (Protospacer) wird, im Falle von Typ I und II anhand des PAM-Motivs (hellblau), ausgewählt, ausgeschnitten und am Leader-proximalen Ende des CRISPR-Locus eingefügt, wobei der Repeat dupliziert wird. 2. crRNA Biogenese: Der CRISPR-Locus wird aufgrund eines im Leader-Bereich befindlichen Promotors (Pfeil) in eine lange Vorläufer-mRNA transkribiert und zu reifen crRNAs prozessiert, indem innerhalb der Repeats geschnitten wird. Je nach CRISPR/Cas-Subtyp sind daran andere Cas-Proteine beteiligt (Typ I: Cascade-Komplex, Typ II: Cas9, Typ III: Cas6). Im Falle von Typ II sind außerdem das universelle Protein RNase III und eine kurze RNA (tracrRNA) erforderlich. Bei Typ II und Typ III findet ein zweiter Reifungsschritt statt, in Zuge dessen das 5'-bzw. 3'-Ende verkürzt wird. 3. Interferenz: Mit Hilfe der crRNA, dem PAM-Motif (nur Typ I und II) und Cas-Proteinen werden fremde Nukleinsäuren erkannt und degradiert. Bei Typ I wird vom Cas3 als degradierende Nuklease vom Cascade-Komplex rekrutiert, bei Typ II findet ein Doppelstrangbruch durch Cas9 statt. In beiden Fällen wird DNA abgebaut. Bei Typ III wird sowohl DNA (III-A) als auch RNA (III-B) erkannt und durch einen Cas-Proteinkomplex (Csm-/Cmr-Komplex) degradiert. Cas-Gene: grüne bzw. orange Pfeile, Cas-Proteine: grüne bzw. orange Kreise, Leader: schwarze Rechtecke, Repeats: graue Pfeile, Spacer: bunte Rechtecke.

In diversen bioinformatischen und metagenomischen Studien wurde ermittelt, dass sich die CRISPR-Loci in Laufe der Evolution stark verändern, indem neue Repeat-Spacer-Einheiten zugefügt, aber auch entfernt werden (ANDERSON&BANFIELD, 2008; HORVATH *ET AL.*, 2008; HORVATH *ET AL.*, 2009; TYSON&BANFIELD, 2008; DEVEAU *ET AL.*, 2008). Die Integration konnte auch experimentell in *S. thermophilus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae* und *Sulfolobus solfataricus* nachgewiesen werden, wobei diese meist am Leader-proximalen Ende des CRISPR-Locus auftritt (BARRANGOU *ET AL.*, 2007; YOSEF *ET AL.*, 2012; SWARTS *ET AL.*, 2012; DATSENKO *ET AL.*, 2012; CADY *ET AL.*, 2012; LOPEZ-SANCHEZ *ET AL.*, 2012; ERDMANN&GARRET, 2012) und in CRISPR-Loci, welche keine Leader-Sequenz aufweisen, keine neuen Spacer eingebaut werden (YOSEF *ET AL.*, 2012). Allerdings wurde in *S. solfataricus* auch eine Locus-interne Integration neuer Spacer beobachtet (ERDMANN&GARRET, 2012).

Über den genauen Prozess der Adaptation ist wenig bekannt. Allerdings ist eine Beteiligung der Cas-Proteine Cas1 und Cas2 wahrscheinlich. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass Cas1 und Cas2 allein für den Einbau neuer Spacer benötigt werden. Ist jeweils nur eines der beiden oder mutierte Versionen vorhanden, findet keine Adaptation statt (YOSEF *ET AL.*, 2012; DATSENKO *ET AL.*, 2012; SWARTS *ET AL.*, 2012). In anderen Studien mit Vertretern aller drei CRISPR/Cas-Typen konnte beobachtet werden, dass diese beiden Cas-Proteine weder für die Biogenese der crRNAs noch für die Interferenz-Phase vonnöten sind (BROUNS *ET AL.*, 2008; DELTCHEVA *ET AL.*, 2011; HATOUM-ASLAN *ET AL.*, 2011; SAPRANAUSKAS *ET AL.*, 2011).

Cas1- und Cas2-Proteine unterschiedlicher Organismen wurden kristallisiert und/oder biochemisch untersucht. Kristallstrukturen verschiedener Cas1-Proteine zeigten, obwohl die Sequenzen lediglich 15 % Identität aufweisen, sehr ähnliche Tertiär- und Quartärstrukturen: eine N-terminale β -Faltblattstruktur und eine C-terminale α -Helix mit einer konservierten Bindestelle für divalente Metallionen. Positiv geladene Aminosäure-Reste auf der Oberfläche des Proteins weisen auf eine DNA-Bindung hin. Zudem liegt Cas1 als Homodimer vor (WIEDENHEFT *ET AL.*, 2012). Für Cas1 aus *S. solfataricus* wurde eine starke Bindungsaffinität zu verschiedenen Nukleinsäuren gezeigt, allerdings ohne Sequenzspezifität (HAN *ET AL.*, 2009). Cas1 aus *P. aeruginosa* wies Metall-abhängige Endonuklease-Aktivität auf (WIEDENHEFT *ET AL.*, 2009), ebenso wie Cas1 aus *E. coli*, welches außerdem Holliday-Strukturen lösen konnte (BABU *ET AL.*, 2011). Diese verzweigten DNA-Intermediate sind wichtig für Integrations- und Rekombinationsereignisse. Da Cas1 auch eine Affinität zu geschädigter DNA aufweist und außerdem mit diversen Proteinen interagiert, welche für die Reparatur von DNA-Schäden zuständig sind, wird hier eine zusätzliche Funktion vermutet (CHEN *ET AL.*, 2008; BABU *ET AL.*, 2011). Strukturanalysen und biochemische Untersuchungen von diversen Cas2-Proteinen ergaben für RNA-bindende Proteine typische Strukturen und Metallionen-abhängige Endonukleaseaktivitäten (BELOGLAZOVA *ET AL.*, 2008; NAM *ET AL.*, 2012a). In *E. coli* konnte außerdem gezeigt werden, dass Cas2 am Zellpol akkumuliert, wo meist die Infektion mit Phagen stattfindet (TANG *ET AL.*, 2010). Cas1 und Cas2 scheinen jedoch nicht in allen CRISPR/Cas-Systemen allein ausreichend für die Adaptation zu sein. So wurde in *Thermoproteus tenax* (Typ I-A) gezeigt, dass Cas1 und Cas2, welche in diesem Fall fusioniert

vorliegen, mit Cas4 und Csa1 interagieren. Dieser Komplex wurde Cascis (*CRISPR associated complex for the integration of spacers*) genannt (PLAGENS ET AL., 2012). Dass Cas4 an der Adaptation beteiligt sein könnte zeigt auch, dass in manchen Systemen Cas1 und Cas4 fusioniert vorliegen (MAKAROVA ET AL., 2011b). Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung eines subtypspezifischen Cas-Proteins liegt bei *S. thermophilus* vor, bei dem Csn2 für die Adaptation benötigt wird (BARRANGOU ET AL., 2007). Interessanterweise existieren in I-F-Systemen auch Cas2-Cas3-Fusionsproteine, ebenso wie Komplexe aus Cas1 und Cas3 (MAKAROVA ET AL., 2011b; RICHTER ET AL., 2012a).

Nähere Untersuchungen der Adaptationsphase in *E. coli* ergaben weitere Einsichten in die putative Funktionsweise. So konnte gezeigt werden, dass im Falle einer Infektion mit einem Phagen, gegen den bereits Resistenz aufgrund eines entsprechenden Spacers vorliegt, vermehrt weitere Spacer aus dessen Genom eingebaut werden, die Adaptation also offensichtlich durch die Interferenz-Reaktion stimuliert wird. Dieser als Priming bezeichnete Prozess könnte dazu dienen, durch mehrere Spacer eine vielschichtigere Resistenz zu erlangen und Phagen eine Umgehung des Systems durch Mutation zu erschweren (DATSENKO ET AL., 2012; SWARTS ET AL., 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass beim Einbau neuer Repeat-Spacer-Einheiten der dem Leader am nächsten liegende Repeat dupliziert wird. Die minimale Ausstattung zur Integration besteht aus einem Repeat und 60 Basenpaaren der Leader-Sequenz (YOSEF ET AL., 2012).

Bei näherer Untersuchung neu eingebauter Spacer in *S. thermophilus* zeigte sich in direkter Nähe der den späteren Spacern entsprechen Sequenzen im viralen Genom, den sogenannten Protospacern, eine kurze Nukleotid-Abfolge, welche im Falle jedes Protospacers gleich ist (DEVEAU ET AL., 2008). Ausführlich bioinformatische Untersuchungen ergaben auch für andere CRISPR/Cas-Typen solche Motive, welche als PAM bezeichnet wurden (*protospacer adjacent motif*) (MOJICA ET AL., 2009). Die Auswahl der der späteren Spacer erfolgt also nicht zufällig. Die Bedeutung der PAMs kommt in der Interferenz-Phase zum Tragen, indem sie das System zur Unterscheidung zwischen eigener und fremder DNA befähigen. Abgesehen der PAMs scheinen die Protospacer keinem erkennbaren Prinzip zu folgen. So können sie sowohl vom kodierenden als auch vom nicht-kodierenden Strang aus verschiedensten Teilen des Genoms stammen und weisen keine Ähnlichkeiten in der Sequenz auf (DATSENKO ET AL., 2012; SWARTS ET AL., 2012; YOSEF ET AL., 2012).

Auch wenn einiges über die Adaptation und die daran beteiligten Komponenten bereits herausgefunden wurde, sind die genauen Mechanismen noch weitgehend unklar, so vor allem die exakte Funktion der beteiligten Cas-Proteine und der Leader-Sequenz. Ein auf Basis der bekannten Informationen über die Adaptation hypothetischer Mechanismus ist in Abbildung 1.4 zusammengefasst.

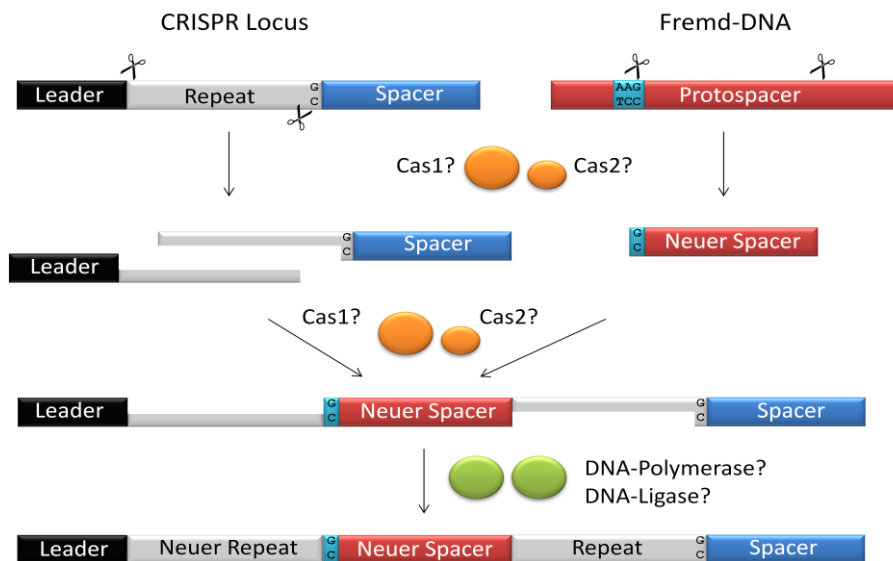


Abbildung 1.4: Hypothetischer Mechanismus der Adaptation. Anhand des PAM-Motivs wird aus der fremden DNA ein Protospacer ausgewählt und ausgeschnitten, wobei am 5'-Ende das letzte Nukleotid des PAMs erhalten bleibt. Mutationsanalysen ergaben, dass beim Vorgang der Integration neuer Spacer der Leader-proximale Repeat exakt dupliziert wird, wobei jedoch das letzte Nukleotid vom Spacer stammt. Der Repeat des CRISPR-Locus wird möglicherweise durch Einzelstrangbrüche geöffnet und der neue Spacer mit den entstandenen Enden verbunden. Zuletzt erfolgt das Auffüllen des einzelsträngigen Repeat-Bereichs durch DNA-Polymerase-Aktivität und das Verbinden des Phosphatrückgrats durch Ligase-Aktivität. Der gesamte Vorgang erfordert diverse Proteinfunktionen wie Erkennung des Protospacers anhand des PAMs, Ausschneiden des Protospacers, Öffnen des Repeats und Einfügen des neuen Spacers in der korrekten Orientierung. Wie genau dabei Cas1, Cas2 oder andere Proteine beteiligt sind, ist nicht bekannt (DATSENKO *ET AL.*, 2012; SWARTS *ET AL.*, 2012; YOSEF *ET AL.*, 2012).

crRNA Biogenese

Die Spezifität des Abbaus der fremden DNA wird durch kleine RNA-Moleküle, den crRNAs (CRISPR RNAs) vermittelt. Untersuchungen in *E. coli*, *Pyrococcus furiosus*, *Sulfolobus* und weiteren Organismen zeigten, dass ein CRISPR-Locus im Ganzen in eine lange Vorläufer-crRNA transkribiert und diese in kleine Abschnitte prozessiert wird, welche jeweils eine Spacer-Sequenz und stromauf- und abwärts Teile des Repeats enthalten (BROUNS *ET AL.*, 2008; HALE *ET AL.*, 2008; LILLESTØL *ET AL.*, 2009). Hinsichtlich des Mechanismus und der beteiligten Proteine unterscheiden sich diese Vorgänge je nach CRISPR-Subtyp.

In Typ I CRISPR/Cas-Systemen wurden diverse Endonukleasen identifiziert und charakterisiert, welche für die Prozessierung der crRNAs verantwortlich sind. In allen diesen Fällen wird für die Repeats eine stabile Sekundärstruktur in Form einer Schleifen- bzw. Haarnadel-

ähnlichen Struktur vorhergesagt (*stem loop* bzw. *hairpin*), welche durch die Endonuklease gebunden wird. Die Vorläufer-crRNA wird innerhalb der Repeat-Sequenz geschnitten und führt zu reifen crRNAs, welche stromaufwärts der Spacer-Sequenz einen 5'-Anhang von acht Nukleotiden des vorhergehenden Repeats und unterhalb die Schleifenstruktur des nachfolgenden Repeats enthalten (BROUNS *ET AL.*, 2008; HAURWITZ *ET AL.*, 2010; RICHTER *ET AL.*, 2012b; NAM *ET AL.*, 2012b). Nach der Prozessierung der crRNA bleibt diese an die Endonuklease gebunden. Beide sind in allen bisher charakterisierten Typ I Systemen Teil eines Proteinkomplexes (Cascade = *CRISPR associated complex of antiviral defense*), welcher auch in der späteren Interferenzphase eine essentielle Rolle spielt (BROUNS *ET AL.*, 2008; WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011a; NAM *ET AL.*, 2012b) (Abbildung 1.3).

In Subtyp I-E wird die Prozessierung von Cas6e (teilweise auch Cse3 oder CasE genannt) durchgeführt. Der Schnitt erfolgt innerhalb der Repeats, was zu reifen crRNAs von 61 Nukleotiden Länge führt (BROUNS *ET AL.*, 2008). Cas6e enthält zwei RNA-bindende Domänen, welche an die Repeat-Sequenz binden. Die Untersuchung der Kristallstruktur von Cas6e aus *T. thermophilus* ergab, dass dabei sowohl die Sequenz als auch die Sekundärstruktur der Repeats wichtig ist (GESNER *ET AL.*, 2011; SASHITAL *ET AL.*, 2011). In *E. coli* konnte ein Histidin-Rest (H20) als katalytische Aminosäure identifiziert werden (BROUNS *ET AL.*, 2008), während in *T. thermophilus* ein Tyrosin (Tyr23) und ein Histidin (His26) das aktive Zentrum darstellen (SASHITAL *ET AL.*, 2011). Sowohl Cas6e als auch die crRNA sind Teil des Cascade-Komplexes, welcher aus 5 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist (Cas5, Cas6e, Cas7, Cas8, Cse2). Mikroskopische Untersuchungen des Cascade-Komplexes aus *E. coli* zeigten eine „Seeperdchen-ähnliche“ Struktur (JOE *ET AL.*, 2011; WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011b) (Abbildung 1.5). Desweiteren konnte in *S. thermophilus*, welcher ebenfalls unter anderem ein Subtyp I-E System enthält, ein dem *E. coli*-Cascade vergleichbarer Komplex nachgewiesen werden (SIKUNAS *ET AL.*, 2013).

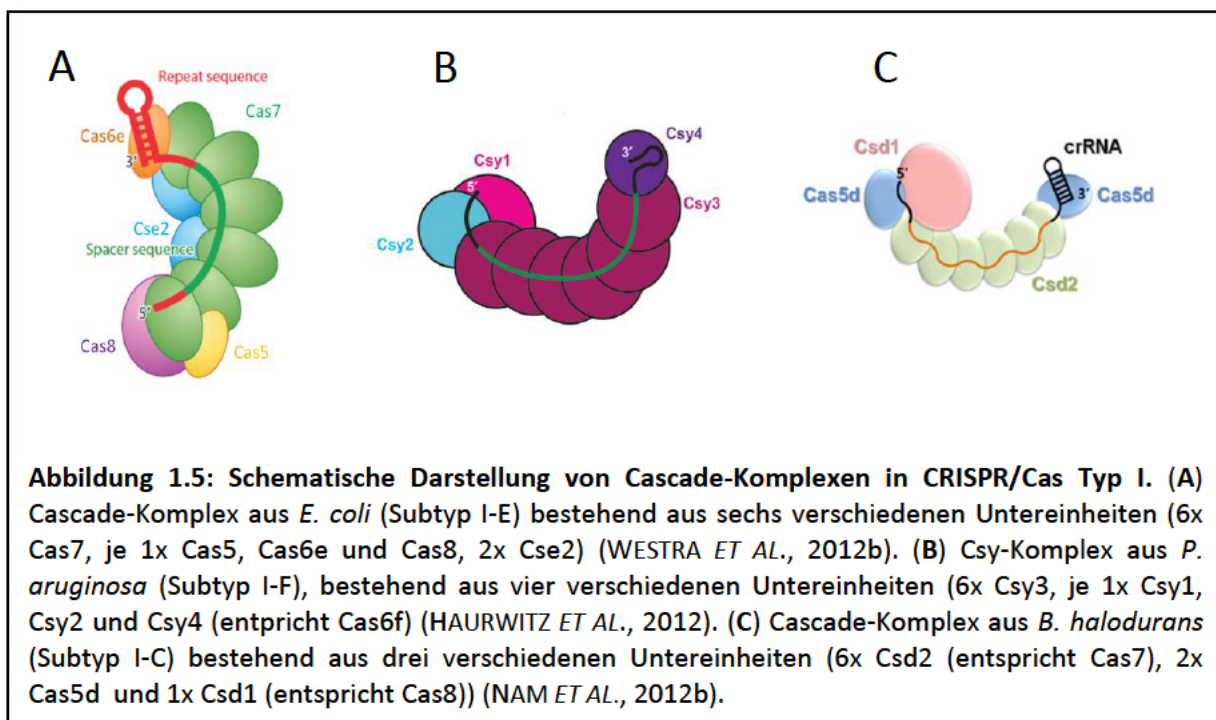
Auch in *P. aeruginosa*, ein Vertreter des Subtyps I-F, wird die Prozessierung durch ein Cas6-Protein bewerkstelligt, Cas6f (HAURWITZ *ET AL.*, 2010). Auch Cas6f bindet sequenz- und strukturspezifisch an den Repeat. Obwohl die Sequenzidentität zu Cas6e eher gering ist, weist auch Cas6f eine RNA-bindende Domäne auf, wobei allerdings die strukturellen Aspekte der Bindung an die Schleifen-Sekundärstruktur des Repeats verschieden sind (HAURWITZ *ET AL.*, 2012). Als Teile des aktiven Zentrums wurden eine Histidin (H29) und ein Serin (Ser148) identifiziert, wobei das Histidin für die katalytische Aktivität verantwortlich ist, während letzteres die RNA für die Spaltung positioniert (HAURWITZ *ET AL.*, 2012). Cas6f ist ebenfalls Teil eines Cascade-Komplexes, welcher zusätzlich Csy1 (Cas8), Csy2 (Cas5) und Csy3 (Cas7) als Untereinheiten enthält. Mikroskopische Untersuchungen zeigten auch für diesen Komplex eine Halbmond-ähnliche Struktur, welche an den *E. coli*-Cascade-Komplex erinnert, wobei aufgrund der unterschiedlichen Proteinuntereinheiten auch deutliche Unterschiede festzustellen sind (WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011a) (Abbildung 1.5).

Ein weiterer CRISPR/Cas-Typ I wurde anhand von *Bacillus halodurans* untersucht (Subtyp I-C). Bei diesem Subtyp kommt kein Cas-Protein der Cas6-Familie vor (MAKAROVA *ET AL.*,

2011b). Hier wurde Cas5d als prozessierende Endonuklease identifiziert. Auch dieses Cas-Protein weist eine charakteristische RNA-bindende Domäne auf. Strukturanalysen ergaben eine Triade aus drei Aminosäureresten (Tyr46, Lys116, His117) als aktives Zentrum. Der I-C-Cascade-Komplex, welcher aus den Untereinheiten Cas5d, Cas7 (Csd2) und Cas8 (Csd1) aufgebaut ist, zeigt auch in diesem Subtyp eine Struktur ähnlich dem I-E-Cascade-Komplex aus *E. coli* (NAM ET AL., 2012b) (Abbildung 1.5).

Subtyp I-A wurde anhand eines Archaeons untersucht, *S. solfataricus*. Auch hier konnte ein Komplex identifiziert werden (bezeichnet als aCascade), der aus den Untereinheiten Cas7 und Cas5a besteht. Als weitere Untereinheiten konnten Cas6 und Csa5 ermittelt werden, welche jedoch nur eher schwach assoziiert sind (LINTNER ET AL., 2011).

Zuletzt wurde mit einem weiteren Archaeon, *Methanococcus maripaludis*, ein Subtyp I-B System untersucht. *In vitro* Untersuchungen ergaben, dass auch in diesem Fall ein Cas-Protein der Cas6-Familie, Cas6b, für die Prozessierung verantwortlich ist. Die Sekundärstruktur des Repeats scheint auch hier von Bedeutung zu sein, da bei mutierten Repeats ohne die Fähigkeit zur Ausbildung einer Sekundärstruktur eine reduzierte Prozessierungs-Aktivität beobachtet wurde. Im Falle der vorher genannten Endonukleasen wurde jeweils ein Histidin als Teil des katalytischen Zentrums identifiziert. Im Falle von Cas6b aus *M. maripaludis* ergaben sich neben einem Tyrosin (Tyr47) zwei benachbarte Histidine (His38, His40) als katalytisch aktive Reste. Mutationsanalysen ergaben, dass nur das Ausschalten beider zu einem kompletten Aktivitätsverlust führt, wobei bei Mutation nur eines der beiden eine gewisse Aktivität erhalten bleibt. Dies lässt den Schluss zu, dass beide Histidine fähig sind, den Verlust des anderen zu kompensieren (RICHTER ET AL., 2012b). Der Nachweis eines Cascade-ähnlichen Komplexes wurde für diesen Subtyp bisher nicht erbracht.



Die crRNA-Reifung in Typ II Systemen unterscheidet sich signifikant von derjenigen in Typ I Systemen. In *Streptococcus pyogenes* wurde erstmals die Beteiligung eines nicht dem CRISPR/Cas-System zugehörigen Proteins nachgewiesen. So stellt die RNase III die prozessierende Endonuklease dar. Die nötige Spezifität wird durch das Zusammenspiel mit einer weiteren kleinen RNA, der sogenannten tracrRNA (*trans-activating* crRNA) erreicht, welche direkt neben dem CRISPR-Locus kodiert ist. Die Sequenz der tracrRNA ist über 25 Basenpaare komplementär zu den Repeats, welche in *Streptococcus* als unstrukturiert vorhergesagt sind. Zusätzlich zur RNase III und der tracrRNA ist ein Cas Protein an dem Vorgang beteiligt, welches charakteristisch für Typ II Systeme ist, Cas9. Dieses ist auch für die spätere Interferenzphase essentiell. Ein Cascade-ähnlicher Proteinkomplex kommt in diesem Typ nicht vor. Nach dem ersten Prozessierungsschritt durch RNase III, tracrRNA und Cas9 findet außerdem eine weitere, noch nicht weiter charakterisierte Reifung statt, welche das 5'-Ende verkürzt (DELTCHEVA ET AL., 2011).

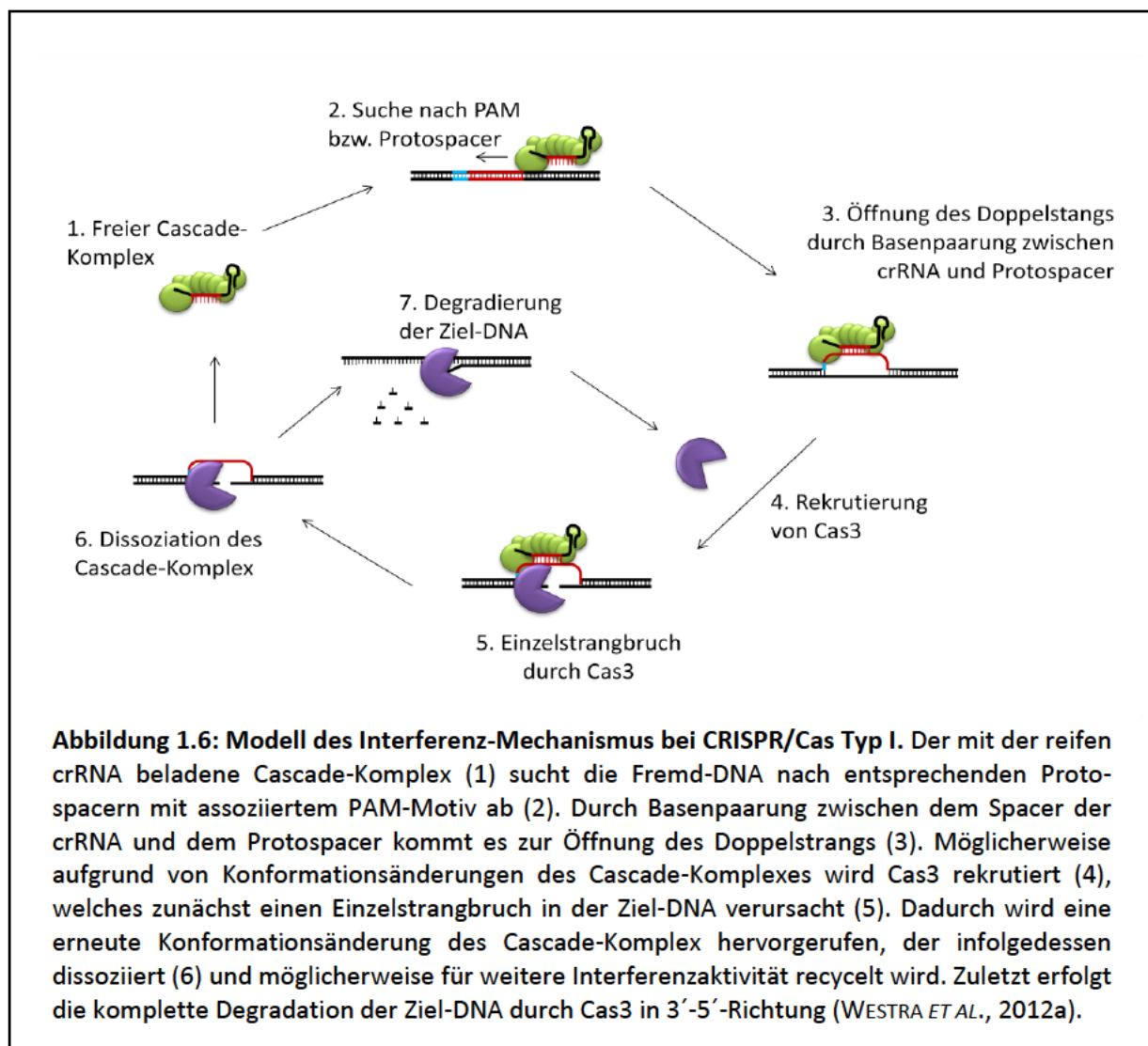
Auch für *P. furiosus*, ein Archaeon, welches unter anderem auch ein Subtyp III-B System besitzt, sind die Repeats als unstrukturiert vorhergesagt. Trotzdem ist auch hier ein Protein der Cas6-Familie für die Prozessierung verantwortlich (CARTE ET AL., 2010). Strukturelle Untersuchungen ergaben zwei RNA-bindende Domänen, wie sie auch in Cas6e zu finden sind. Aufgrund des unstrukturierten Repeats ist die Art der Bindung jedoch unterschiedlich (WANG ET AL., 2011). *In vitro* Studien von mutierten Cas6 ergaben drei Aminosäuren als Teil des aktiven Zentrums (Tyr31, His46, Lys52) (CARTE ET AL., 2010). Das Produkt der Prozessierung ergibt auch hier einen 5'-Anhang von acht Nukleotiden des Repeats (CARTE ET AL., 2010). Allerdings findet eine weitere Reifung der crRNA durch Verkürzung des 3'-Endes statt. Diese erfolgt durch einen Proteinkomplex aus den subtypspezifischen Cas-Proteinen Cmr1-6 (Cmr-Komplex), welcher auch für die spätere Interferenzphase essentiell ist. Im Gegensatz zum Subtyp I Cascade-Komplex ist Cas6 nicht Teil des Cmr-Komplexes (HALE ET AL., 2009; HALE ET AL., 2012; SPILMAN ET AL., 2013). Dies wurde auch für den Cmr-Komplex aus *T. thermophilus* ermittelt (STAALS ET AL., 2013). Ein ähnlicher Cmr-Komplex wurde zudem auch aus *S. solfataricus* isoliert, wobei hier eine weitere Cas-Protein-Untereinheit, Cmr7, vorkommt (ZHANG ET AL., 2012; HALE ET AL., 2012). Im Subtyp III-A System in *S. epidermidis* wurde ein vergleichbarer Mechanismus hinsichtlich der Prozessierung durch Cas6 gefunden, wobei hier wiederum eine Sekundärstruktur des Repeats wichtig zu sein scheint. Auch bei diesem Subtyp kommt ein Komplex vor, welcher aus diversen Csm-Proteinen aufgebaut ist und daher als Csm-Komplex bezeichnet wird. Entsprechende Komplexe wurden aus *S. epidermidis* und *S. solfataricus* isoliert und wiesen ebenfalls kein Cas6 auf (HATOUM-ASLAN ET AL., 2013; ROUILLON ET AL., 2013).

Interferenz

In der letzten Phase der CRISPR/Cas-Aktivität dient die reife crRNA der spezifischen Erkennung fremder Nukleinsäuren, welche dann durch Cas-Proteine abgebaut werden. Auch

hier unterscheiden sich der Mechanismus und die beteiligten Cas-Proteine je nach CRISPR-Typ (siehe Abbildung 1.3).

Am besten untersucht ist die Interferenz in Subtyp I-E anhand von *E. coli* (Abbildung 1.6). Der mit der reifen crRNA beladene Cascade-Komplex erkennt die abzubauen Ziel-DNA, indem es zur Basenpaarung zwischen dem Spacer und dem komplementären Protospacer kommt, wobei im Zuge dieses Vorgangs die Stränge der Ziel-DNA aufbrechen und ein sogenannter R-Loop gebildet wird (JOE ET AL., 2011). Hierbei ist es essentiell, dass über eine Spanne von sieben bestimmten Spacer-Nukleotiden die Übereinstimmung hundertprozentig ist (WIEDENHEFT ET AL., 2011a), wohingegen innerhalb des restlichen Spacers bis zu fünf Abweichungen toleriert werden können (SEMENOVA ET AL., 2011). Desweiteren ist ein korrektes PAM nötig, um die Interferenz auszulösen. Diese bereits im Zuge der Adaptation erwähnten kurzen Nukleotid-Abfolgen befinden sich direkt neben dem Protospacer auf der Fremd-DNA und können je nach Organismus unterschiedliche Sequenzen aufweisen (MOJICA ET AL., 2009). Sie dienen dazu, eine Unterscheidung zwischen der abzubauen Ziel-DNA und dem eigenen CRISPR-Locus zu erreichen und damit einen Angriff auf das eigene Genom



zu vermeiden. Die Erkennung des PAM erfolgt durch die Cascade-Untereinheit Cas8 (SASHITAL *ET AL.*, 2012). Nach der Bindung des Cascade-Komplexes an die Ziel-DNA wird, möglicherweise aufgrund von Konformationsänderungen, ein weiteres Cas-Protein rekrutiert, Cas3 (WESTRA *ET AL.*, 2012a). Dieses Cas-Protein ist charakteristisch für Typ I Systeme und enthält eine N-terminale Nuklease-Domäne und eine C-terminale Helikase-Domäne, wobei in manchen Subtypen die zwei Domänen auf zwei separate Proteine verteilt sind (MAKAROVA *ET AL.*, 2011b). *In vitro* Untersuchungen von verschiedenen Cas3-Proteinen ergaben sowohl DNA-entwindende als auch DNA-degradierende Aktivitäten (SIKUNAS *ET AL.*, 2011; BELOGLAZOVA *ET AL.*, 2011; HOWARD *ET AL.*, 2011). Cas3 löst zunächst einen Einzelstrang-Bruch an der Ziel-DNA aus, was möglicherweise durch die topologischen Veränderungen die Dissoziation des Cascade-Komplexes bewirkt. Zuletzt findet eine ATP-abhängige, vollständige Degradierung der fremden DNA statt (WESTRA *ET AL.*, 2012a).

In Typ II Systemen kommt weder ein Cascade-Komplex, noch ein Cas3-Protein vor. Hier ist allein das für diesen Typ charakteristische Cas9 für die Interferenz wichtig. Cas9 weist zwei Nuklease-Motive auf und bildet zusammen mit der reifen crRNA und der tracrRNA einen Komplex (SAPRANAUSKAS *ET AL.*, 2011). Dieser bindet durch einen noch nicht genauer bekannten Mechanismus an die Ziel-DNA, wobei auch hier eine perfekte Übereinstimmung über einige Nukleotide und ein korrektes PAM essentiell ist (JINEK *ET AL.*, 2012). Im Folgenden wird durch Cas9 ein Doppelstrangbruch in der Ziel-DNA erzeugt, wobei jeweils ein Strang von einer Nuklease-Domäne gespalten wird (SAPRANAUSKAS *ET AL.*, 2011).

Bei Typ III Systemen erfolgen die Vorgänge der Interferenzphase wiederum durch einen Proteinkomplex. Aus *P. furiosus* und *S. solfataricus* (Subtyp III-B) wurde jeweils ein Cmr-Komplex isoliert, welcher *in vitro* Ziel-Nukleinsäuren degradiert. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass in diesem Subtyp im Gegensatz zu allen anderen bisher untersuchten Systemen das Ziel RNA statt DNA ist, wobei der genaue Wirkmechanismus noch unbekannt ist (ZHANG *ET AL.*, 2012; HALE *ET AL.*, 2009). In *P. furiosus* wurde ermittelt, dass eine Basenpaarung zwischen den letzten 14 Nukleotiden des 3'-Endes der crRNA und der abzubauenen RNA essentiell ist (HALE *ET AL.*, 2009). Subtyp III-A Systeme scheinen, wie anhand von *S. epidermidis in vivo* untersucht, wiederum DNA als Ziel zu haben (MARRAFFINI&SONTHEIMER, 2008). Während die Untersuchung von Protospacern bei CRISPR/Cas Systemen der Typen I und II die Existenz von PAMs ergab, wurden für Typ III keine entsprechenden Sequenzen gefunden (MOJICA *ET AL.*, 2009). Im Falle der Subtyp III-B-Systeme könnte dies dadurch erklärt werden, dass RNA die Ziel-Nukleinsäure darstellt und daher ein Angriff gegen das eigene Genom ausgeschlossen ist (HALE *ET AL.*, 2012). Für den Subtyp III-A wurde eine PAM-unabhängige Unterscheidung zwischen eigener und fremder DNA ermittelt. Diese basiert darauf, dass der 5'-Anhang der crRNA im Falle des eigenen CRISPR-Locus mit dem dortigen Repeat komplementär ist, während es im Falle der Ziel-DNA zu keiner Basenpaarung kommt. Dies scheint erkannt zu werden, weswegen es nur im letzteren Fall zum Abbau kommt (MARRAFFINI&SONTHEIMER, 2010b).

1.2.3. Regulation

Über die Regulation der Aktivität des CRISPR/Cas-Systems ist wenig bekannt. Legt man die Funktion als Abwehrmechanismus zugrunde, ist anzunehmen, dass ein Zusammenhang zwischen dem Eindringen von mobilen genetischen Elementen und der Expression der *cas*-Gene bzw. der CRISPR-Loci besteht. Eine konstitutive Aufrechterhaltung der Abwehr durch permanente Bereitstellung aller Komponenten bedeutet einen großen Energieaufwand für die Zelle, welcher ohne akute Bedrohung überflüssig erscheint (WESTRA ET AL., 2012b). In der Tat wurde bei *S. thermophilus* eine erhöhte Produktion der Cas-Proteine infolge von Phageninfektion beobachtet (YOUNG ET AL., 2012). Auch bei *T. thermophilus* wird im Falle einer Infektion die Transkription sowohl der *cas*-Gene als auch des CRISPR-Locus gesteigert. Dies geschieht einerseits durch CRP (*cAMP receptor protein*), welches durch Bindung an cAMP Promotoren erkennt und die Gen-Expression steigert, als auch durch noch unbekannte, CRP-unabhängige Mechanismen (AGARI ET AL., 2010). In *Sulfolobus islandicus* wurde Cbp1 (*CRISPR DNA repeat binding protein*) als ein regulierender Faktor der CRISPR-Transkription identifiziert, welcher an Repeats bindet und dadurch möglicherweise die Aktivität von Locus-internen Promotoren steuert (DENG ET AL., 2012).

In *E. coli* und *Salmonella enterica* serovar Typhi wurde festgestellt, dass die Transkription des *cas*-Operon durch das Regulator-Protein H-NS (*heat-stable nucleoid-structuring protein*) blockiert wird, während LeuO als H-NS-Antagonist die Expression steigert (PUL ET AL., 2010; WESTRA ET AL., 2010; MEDINA-APARICIO ET AL., 2011). Da H-NS an AT-reiche Sequenzen bindet, wäre es denkbar, dass fremde, AT-reiche DNA H-NS von den Genom-eigenen Promotoren fernhält, wodurch auch die Transkription der *cas*-Gene wieder möglich wird und die CRISPR/Cas-Abwehr einsetzt (NAVARRE ET AL., 2006; DILLON ET AL., 2010). Desweiteren wird die Expression von LeuO bei Aminosäure-Mangel gesteigert. Hier wäre es möglich, dass eine Infektion einen solchen Mangel verursacht und dadurch die Immunantwort ausgelöst wird (RICHTER ET AL., 2012c). Zuletzt wurde in *E. coli* gezeigt, dass durch Stress an der Zellhülle über den BaeSR-Mechanismus H-NS vom *cas*-Promotor verdrängt wird, wobei die Anreicherung von viralen Proteinen in der Zellmembran im Falle einer Infektion einen solchen Stressfaktor darstellen könnte (PEREZ-RODRIGUEZ ET AL., 2011).

Auch wenn bisher nur wenige Details über die Regulation der CRISPR/Cas-Aktivität bekannt sind, kann vermutet werden, dass teilweise komplexe Regulations-Mechanismen existieren.

1.2.4. Anwendungen

Schon vor der Entdeckung der Funktion der CRISPR-Loci als Teil eines Abwehrmechanismus wurde deren Sequenzdiversität für die Unterscheidung von nah verwandten Stämmen humanpathogener Mikroorganismen genutzt. Diese als Spoligotyping (*spacer oligotyping*) bekannte Technik wurde bereits für diverse Bakterien angewendet, unter anderem für

Mycobacterium tuberculosis, *Corynebacterium diphtheriae* und *Salmonella enterica* (GROENEN ET AL., 1993; MOKROUSOV ET AL., 2007; LIU ET AL., 2011). Da neue Spacer am Leader-Ende des CRISPR-Locus hinzugefügt werden, kann anhand der Spacer die zeitliche Abfolge vergangener Infektionen eines Stammes abgelesen und mit anderen verglichen werden, um so phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse zu ermitteln (BARRANGOU, 2013). Desweiteren besteht die Möglichkeit, Erkenntnisse über die Interaktion von Phagen und Prokaryoten in komplexen mikrobiologischen Systemen zu erlangen (ANDERSON&BANFIELD, 2008; TYSON&BANFIELD, 2008; HEIDELBERG ET AL., 2009).

Mit der Erkenntnis, dass das CRISPR/Cas-System anpassungsfähige und vererbare Immunität gegenüber Phagen vermittelt, ergibt sich die Möglichkeit der Anwendung für industrielle Zwecke. Mikroorganismen werden beispielsweise in der Milchverarbeitenden Industrie oder für die biotechnologische Produktion in Bioreaktoren eingesetzt. Eine neue, zunehmend wichtige Anwendung ist die Produktion von Biokraftstoffen mit Hilfe von Cyanobakterien. Um Produktionsausfälle durch Kontamination mit Phagen zu verhindern, können industriell relevante Starterkulturen gegen gängige Phagen immunisiert werden. Dabei besteht einerseits die Möglichkeit, durch gentechnische Manipulation künstliche Spacer in den CRISPR-Locus zu integrieren. Zum anderen können auch durch kontrollierte Infektion unter Laborbedingungen multi-resistente Stämme selektiert werden. Hierbei ist von Vorteil, dass durch den natürlichen Vorgang der Immunisierung solche BIMs (*bacteriophage insensitive mutants*) nicht als genetisch manipuliert gelten (BARRANGOU, 2013; WIEDENHEFT ET AL., 2012).

In diversen Studien wurde festgestellt, dass durch das CRISPR/Cas-System die Aufnahme von Plasmiden verhindert werden kann (MARRAFFINI&SONTHEIMER, 2008; GARNEAU ET AL., 2010; SAPRANAUSKAS ET AL., 2011). So kann auch die Übertragung von Antibiotika-Resistenz-Genen oder der horizontale Gentransfer von Virulenz-Faktoren unterbunden werden (GARNEAU ET AL., 2010; BIKARD ET AL., 2012). Bei *Streptococcus* und *Enterococcus* konnte eine negative Korrelation zwischen dem Auftreten von CRISPR/Cas-Systemen und der Pathogenität beobachtet werden (PALMER&GILMORE, 2010; NOZAWA ET AL., 2011). Auch wenn eine konkrete Anwendungstechnik noch nicht etabliert wurde, ist eine Nutzung des CRISPR/Cas-Systems zur Reduktion der Verbreitung von unerwünschten genetischen Elementen wie Antibiotika-Resistenzen oder Prophagen in Humanpathogenen wie beispielsweise methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) denkbar (MARRAFFINI&SONTHEIMER, 2010a).

Ein weiteres Anwendungsfeld des CRISPR/Cas-Systems liegt im Bereich der Manipulation von Genomen und der Regulation der Genexpression. Für das Subtyp III-B System in *P. furiosus* wurde ermittelt, dass im Zuge der Interferenz RNA als Zielmolekül degradiert wird (HALE ET AL., 2009). Hier wäre es denkbar, mit Hilfe von künstlichen Spacern endogene mRNA-Level und damit die Expression von Genen auf der Ebene der Translation zu regulieren, wie auch bei der RNA Interferenz in Eukaryoten (BARRANGOU&HORVATH, 2012). Mit Hilfe von Typ II Systemen wurde gezeigt, dass auch die Transkription von Genen manipuliert werden kann. Bei dieser als CRISPRi (*CRISPR interference*) bezeichneten Methode bindet eine katalytisch

inaktiver Komplex aus einem Cas9-Protein und einem künstlichen crRNA-tracrRNA-Hybrid (JINEK *ET AL.*, 2012) spezifisch an einen endogenen Promotor, was die Bindung der RNA-Polymerase und folglich die Transkription verhindert (QI *ET AL.*, 2013). Durch Fusion von Transkriptionsfaktoren und Cas9 kann auch eine Aktivierung der Transkription ausgelöst werden (QI *ET AL.*, 2013; BIKARD *ET AL.*, 2013). Ein vergleichbares System aus Cas9 und einem künstlichen crRNA-tracrRNA-Hybrid kann auch für die Manipulation des Genoms selbst angewendet werden. Es wurde gezeigt, dass Cas9 im Zuge der Interferenz einen Doppelstrangbruch in der Ziel DNA verursacht, wobei jeweils eine der zwei Nuklease-Domänen jeweils einen Strang spaltet. Durch Inaktivierung einer Domäne kommt es lediglich zu einem Einzelstrangbruch, was eine Reparatur durch homologe Rekombination ermöglicht. Durch Einbringen eines entsprechenden Spenderkonstrukts können auf diese Weise Mutationen, Deletionen oder Insertionen an fast jeder beliebigen Stelle des Genoms eingeführt werden (JINEK *ET AL.*, 2012). Diese als Genom-Editing bezeichnete Methode wurde bereits erfolgreich nicht nur in prokaryotischen Zellen, sondern auch in eukaryotischen Zellen, wie *Saccharomyces cerevisiae* oder humanen Zelllinien, und zuletzt auch in ganzen Organismen wie Mäusen, Zebrafischen und Fruchtfliegen angewendet (JIANG *ET AL.*, 2013; DiCARLO *ET AL.*, 2013; MALI *ET AL.*, 2013; WANG *ET AL.*, 2013; HWANG *ET AL.*, 2013; GRATZ *ET AL.*, 2013). Die möglichen Anwendungen dieser Technik reichen von der Forschung bis hin zur Gentherapie am Menschen, wobei hier noch einige Hürden, wie beispielsweise die Problematik der Applikation, genommen werden müssen.

1.3. Untersuchte Organismen

1.3.1. *Haloferax volcanii*

Der in Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich untersuchte Organismus ist das halophile Archaeon *Haloferax volcanii*. *H. volcanii* gehört zum Phylum der Euryarchaeota (ALLERS& MEVARECH, 2005). Erstmals im Jahr 1975 aus Bodensedimentproben des Toten Meeres isoliert (MULLAKHANBAI&LARSON, 1975), erfolgte die Benennung nach dem israelischen Forscher Benjamin Elazari Volcani, welcher Pionierarbeit bei der Untersuchung von Leben im Toten Meer leistete (OREN&VENTOSA, 1999). Die optimalen Salzkonzentrationen für den als moderat halophil eingestuften *H. volcanii* liegen bei 2,5 M NaCl und 0,2 M MgCl₂ (MULLAKHANBAI&LARSON, 1975). Um dem osmotischen Druck des umgebenden Mediums entgegenzuwirken, werden im Cytoplasma hohe Konzentrationen von Kaliumionen angereichert (OREN, 1999). Die intrazellulären Proteine sind aufgrund eines erhöhten Anteils an sauren Aminosäuren und folglich eines isoelektrischen Punkts im sauren Bereich von durchschnittlich 5,2 an diese salzhaltige Umgebung angepasst (HARTMANN *ET AL.*, 2010). *H. volcanii* ist fakultativ anaerob und kann bei 45 °C Wachstumstemperatur und einem pH-Wert von 7 eine Generationszeit von 2 bis 3 Stunden erreichen. Als chemoorganoheterotropher

Organismus kann *H. volcanii* verschiedene Kohlenhydrate als Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden (DYALL-SMITH, 2008; OREN, 2006).

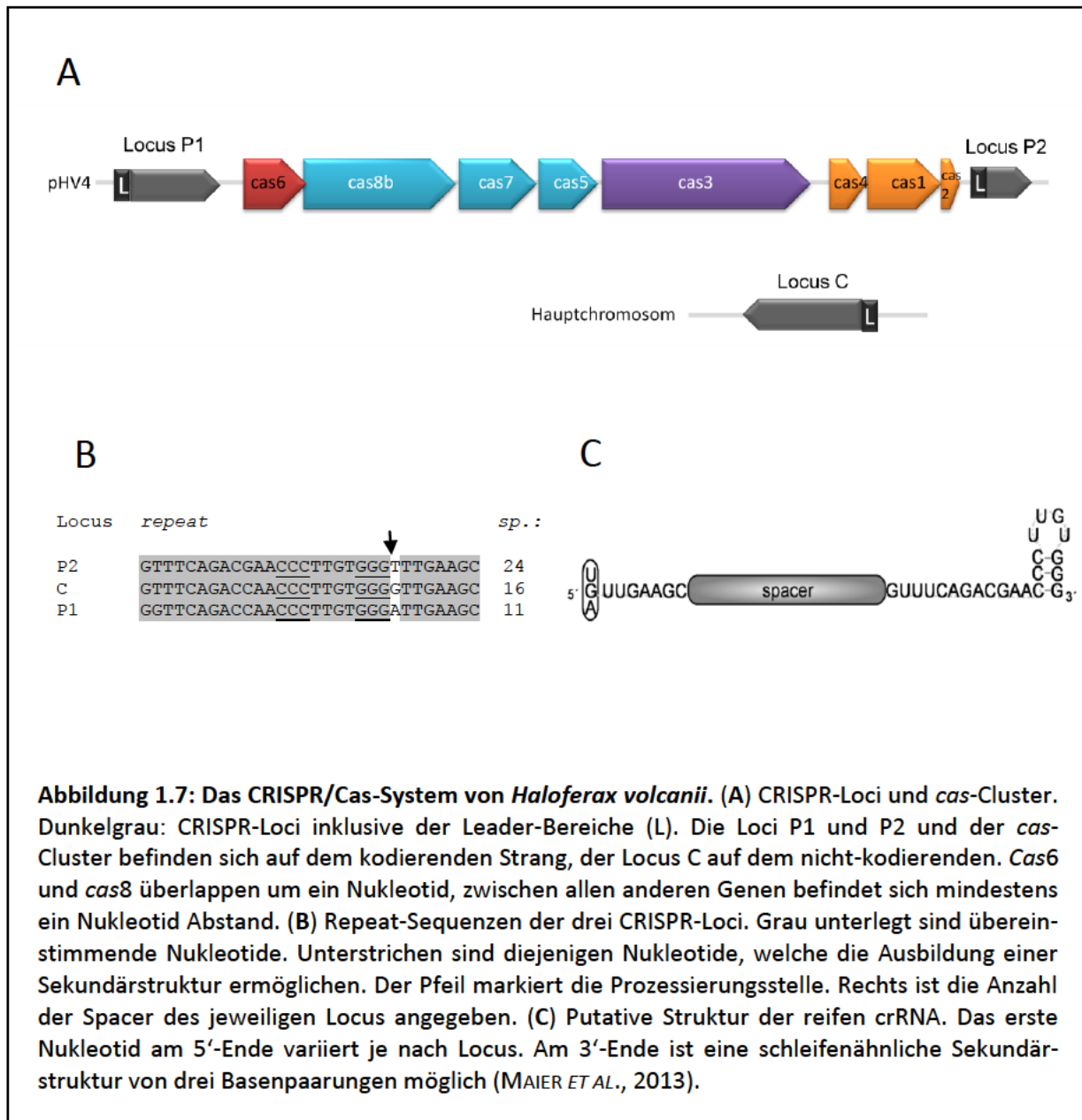
Das Genom von *H. volcanii* ist vollständig sequenziert und annotiert. Mit einer Gesamtgröße von ca. 4 Megabasenpaaren besteht es aus einem Hauptchromosom, drei chromosomalen Plasmiden (pHV1, pHV3, pHV4) und einem Plasmid (pHV2) und weist einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 65 % auf (HARTMANN *ET AL.*, 2010). Das Genom ist polyploid und kann in der exponentiellen Wachstumsphase in bis zu 20 Kopien vorliegen (BREUERT *ET AL.*, 2006). Es stehen diverse Möglichkeiten zur genetischen Manipulation zur Verfügung, unter anderem verschiedene Vektoren wie Shuttlevektoren, Expressionsvektoren oder integrative Vektoren, diverse auxotrophe Mutanten, aber auch Methoden zum Einbringen von Plasmiden (Transformation) und zur Entfernung von Genen (Knockout) (HOLMES *ET AL.*, 1994; LARGE *ET AL.*, 2007; MEVARECH & WERCZBERGER, 1985; ALLERS *ET AL.*, 2004; CLINE *ET AL.*, 1989; BITAN-BANIN *ET AL.*, 2003; DYALL-SMITH, 2008; ALLERS & MEVARECH, 2005).

1.3.2. Das CRISPR/Cas-System von *H. volcanii*

Im Genom von *H. volcanii* finden sich drei CRISPR-Loci. Locus C1 befindet sich auf dem Hauptchromosom und besteht aus 24 Spacern. Auf dem chromosomalen Plasmid pHV4 befinden sich zwei Loci, wobei der Locus P1 16 Spacer und der Locus P2 11 Spacer ausweist. Laut der kürzlich veröffentlichten Sequenz von *H. volcanii* DS2 sollte der Locus P1 um ca. 1,5 Kb länger sein (HARTMANN *ET AL.*, 2010). Analysen der in dieser Arbeit verwendeten *H. volcanii*-Stämme H26 und H119 ergaben jedoch eine Deletion von insgesamt 23 Repeat-Spacer-Einheiten (FISCHER *ET AL.*, 2012). Die Repeats sind in allen drei Loci 30 Nukleotide lang und in ihrer Sequenz bis auf ein Nukleotid an Position 23 identisch (Abbildung 1.7), wobei der letzte Repeat des Locus C um 15 Nukleotide bzw. der letzte des Locus P1 um ein Nukleotid verkürzt sind und die letzten zwei Repeats des Locus P2 diverse Mutationen aufweisen. Laut der Klassifikation von Kunin *et al.* gehören die Repeats zur Gruppe 9 (*unfolded archaeal*). Laut bioinformatischen Analysen wäre jedoch auch die Ausbildung einer Schleifen-Sekundärstruktur mit drei Basenpaarungen möglich (MAIER *ET AL.*, 2013).

Die Spacer-Sequenzen weisen eine Länge von 34 bis 39 Nukleotiden auf. Für zwei Spacer konnten bei Vergleichen mit Datenbanken Übereinstimmungen gefunden werden. So weist Spacer C-14 eine 76 %ige Sequenzidentität mit einem Bereich innerhalb des Genoms von *H. volcanii* auf. Die Sequenz liegt innerhalb des offenen Leserasters für ein hypothetisches Protein (Hvo_0374), welches möglicherweise Teil eines integrierten, mobilen genetischen Elements ist. Eine weitere Übereinstimmung wurde beim Vergleich mit metagenomischen Sequenzdaten aus einem Salzsee in Australien (Lake Tyrrell) ermittelt. So weist Spacer P1-2 eine 88 %ige Identität zu einer Sequenz innerhalb eines putativen offenen Leserasters auf, welches möglicherweise eine Plasmid-assoziierte Funktion hat (FISCHER *ET AL.*, 2012).

Die Leader-Bereiche aller drei Loci sind ca. 102 Nukleotide lang und zeigen ein hohes Maß an Sequenzidentität (95 % zwischen P1 und P2 bzw. ca. 75 % zwischen C und P1 oder P2). Der GC-Gehalt liegt mit ca. 55 % deutlich unter dem durchschnittlichen GC-Gehalt des restlichen Genoms von ca. 65 %.



Mit Hilfe von Analysen der RNA anhand von Northern Blots und *high throughput* Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass alle drei CRISPR-Loci transkribiert und in reife crRNA prozessiert werden, wobei möglicherweise nicht alle Spacer gleich stark repräsentiert sind. Die reife crRNA weist einen 5'-Anhang von 8 Repeat-Nukleotiden auf. Die Prozessierungsstelle befindet sich also direkt an der Basis der putativen Schleifen-Sekundärstruktur. Da an der 23. Position des Repeats bei allen drei Loci unterschiedliche Nukleotide zu finden sind,

trägt auch die erste 5'-Position der reifen crRNA jeweils unterschiedliche Basen (Abbildung 1.7). Bei der Northern Blot-Analyse zeigt die reife crRNA eine Größe von ca. 70 Nukleotiden. Es scheint also keinen weiteren Prozessierungsschritt am 3'-Ende zu geben, wobei dies noch durch Sequenzierung bestätigt werden muss (MAIER *ET AL.*, 2013).

Da auf bioinformatischem Weg kaum Übereinstimmungen von Spacern mit Sequenzen von Phagen oder Plasmiden gefunden werden konnten, wurde auf experimentellem Weg nach der Existenz bzw. der Sequenz von PAMs gesucht. Dabei wurde ein Angreifer mit Hilfe eines Plasmids imitiert, welches eine mit einem im CRISPR-Locus vorkommenden Spacer komplementäre Protospacer-Sequenz aufweist, und untersucht, ob das CRISPR/Cas-System bestimmte PAM-Anforderungen hat, um das Plasmid als fremd zu erkennen und abzubauen. Es zeigte sich, dass im Zuge der Interferenzphase insgesamt 6 verschiedene PAMs von drei Nukleotiden Länge erkannt werden, die jeweils direkt stromaufwärts des Protospacers liegen (TTC, ACT, TAA, TAT, TAG, CAC). Eines dieser PAMs ist jeweils auch bei den zwei Protospacern zu finden, die auf bioinformatischem Weg identifiziert wurden (FISCHER *ET AL.*, 2012). Derselbe experimentelle Ansatz wurde auch verwendet, um zu ermitteln, wie hoch die Sequenzidentität zwischen Spacer und Protospacer sein muss, damit eine Interferenz stattfindet. Dabei konnte diverse Positionen identifiziert werden, bei welchen eine perfekte Übereinstimmung gegeben sein muss, wobei hauptsächlich am 5'-Ende des Spacers eine annähernd lückenlose Komplementarität erforderlich ist (MAIER *ET AL.*, 2013).

In *H. volcanii* finden sich acht *cas*-Gene, *cas1-8b*. Damit gehört das CRISPR/Cas-System dem Subtyp I-B an (MAKAROVA *ET AL.*, 2011b). Der *cas*-Cluster liegt auf pHV4 direkt zwischen den CRISPR-Loci P1 und P2 (Abbildung 1.7). Obwohl über die Regulation der Expression der *cas*-Gene in *H. volcanii* nichts bekannt ist, konnte anhand von RT-PCR ermittelt werden, dass alle *cas*-Gene transkribiert werden. Desweiteren konnten in Proteom-Analysen alle Cas-Proteine nachgewiesen werden. Jedoch scheint das Expressionslevel eher gering zu sein, da entsprechende Transkripte per Northern Blot-Analyse nicht detektierbar waren (BRENDDEL *ET AL.*, 2014).

1.3.3. *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*

Das Bakterium *C. lactoaceticus* gehört zur Klasse der Clostridien und wurde im Jahr 1994 aus einer alkalischen, heißen Quelle in Hveragerði, Island, isoliert. Die Zellen sind unbeweglich, stäbchenförmig (1,5 – 3,5 x 7 µm), gram-negativ und weisen keine Flagellen auf. Die optimalen Wachstumsbedingungen sind ein neutraler pH-Wert von ca. 7 und eine Temperatur von 68 °C. Desweiteren ist *C. lactoaceticus* obligat anaerob und chemoorganoheterotroph, wobei diverse Kohlenhydrate als Energiequelle dienen können. Herausragend ist allerdings die Fähigkeit, Zellulose abzubauen. Als hauptsächliche Fermentationsprodukte entstehen dabei Laktat und Acetat, neben H₂, CO₂ und geringen Mengen Ethanol. Im Gegen-

satz zu der Mehrheit der thermophilen, anaeroben, cellulolytischen Clostridien bildet *C. lactoaceticus* keine Sporen aus (MLADENOVSKA *ET AL.*, 1995).

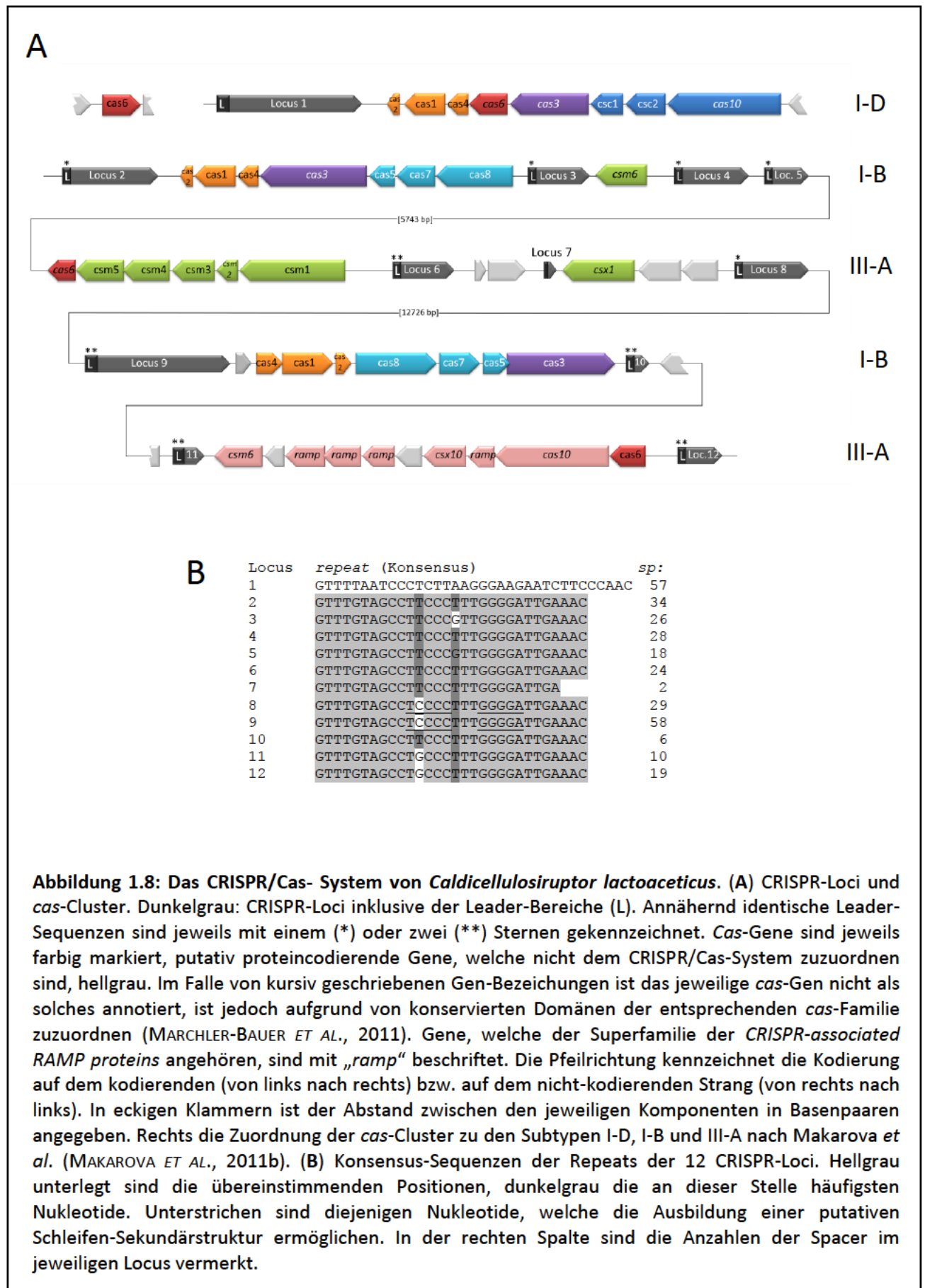
Das Genom von *C. lactoaceticus* besteht aus einem ringförmigen Chromosom von ca. 2,67 Megabasenpaaren Länge mit einem GC-Gehalt von 36 % und ist vollständig sequenziert und annotiert (BLUMER-SCHUETTE *ET AL.*, 2011).

1.3.4. Das CRISPR/Cas-System von *C. lactoaceticus*

In *C. lactoaceticus* liegen insgesamt 12 CRISPR-Loci vor (Abbildung 1.8), wobei einer (Locus 7) lediglich aus zwei sehr verkürzten Spacern von 12 Nukleotiden besteht. Die Spacer der anderen Loci haben eine Länge von 33 bis 47 Nukleotiden, wobei die Loci zwischen 6 und 58 Spacer aufweisen (Abbildung 1.8). Die Repeats des ersten Locus sind 35 Nukleotide lang und unterscheiden sich in ihrer Sequenz vom Rest der Loci, welche 30 Nukleotide Länge aufweisen und bis auf einzelne Nukleotidpositionen identisch sind (Abbildung 1.8). Die Repeats innerhalb eines Locus sind weitgehend ebenfalls identisch, jedoch kommen interessanterweise teilweise mehrere Repeats mit Abweichungen von einem Nukleotid vor, die damit den Repeats anderer Loci entsprechen (siehe Anhang 8.9.). Die Repeats des Typs der Loci 8 und 9 bilden putativ einen Sekundärstruktur mit 5 Basenpaarungen aus (Abbildung 1.8) (ROUSSEAU *ET AL.*, 2009). Die Repeats von Locus 7 sind um 3 Nukleotide verkürzt, während bei allen Loci bei den Leader-distalen Repeats teilweise Verkürzungen und Mutationen vorkommen.

Die Leader-Bereiche sind zwischen 180 und 200 Basenpaaren lang. Dabei zeigen sowohl die Leader der Loci 2, 3, 4, 5 und 8, als auch der Loci 6, 9, 10, 11 und 12 jeweils annähernd hundertprozentige Übereinstimmung in ihrer Sequenz, während die Leader der Loci 1 und 7 signifikant abweichen (siehe Anhang 8.9.).

Die *cas*-Gene von *C. lactoaceticus* sind in fünf größeren Clustern organisiert, wobei ein Gen der *cas6*-Familie abseits alleine vorkommt (Abbildung 1.8). Ein *cas*-Cluster entspricht dem CRISPR-Subtyp I-D mit den spezifischen *cas*-Genen *csc1*, *csc2* und *cas10*. Mit den spezifischen *cas*-Genen *cas5*, *cas7* und *cas8* entsprechen zwei weitere Cluster dem Subtyp I-B, wobei jeweils kein eigenes *cas6*-Gen vorliegt, wie es laut Makarova *et al.* für diesen Subtyp der Fall ist (Abbildung 1.2) (MAKAROVA *ET AL.*, 2011b). Die letzten zwei *cas*-Cluster entsprechen wahrscheinlich dem Subtyp III-A mit den Subtyp-spezifischen *cas*-Genen *csm* und *cas10*. Hierbei ist fehlen jedoch teilweise die Zuordnungen zu bestimmten *cas*-Gen-Familien, speziell im Fall des letzten *cas*-Clusters (Abbildung 1.8).



1.4. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die nähere Charakterisierung der crRNA-prozessierenden Vorgänge des CRISPR/Cas-Systems. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf dem archaealen Modellorganismus *H. volcanii*, welcher ein CRISPR/Cas-System des Subtyps I-B aufweist. Über diesen Subtyp ist bisher nicht viel bekannt. Um zu ermitteln, welche Proteine in *H. volcanii* an der Biogenese reifer crRNA beteiligt sind, sollen Untersuchungen von Stämmen vorgenommen werden, welchen verschiedene *cas*-Gene fehlen. Dazu sollen einerseits Komplementationsstämme generiert werden, bei welchen das *cas*-Operon des genomischen Locus deletiert ist und diverse Kombinationen von *cas*-Genen auf Plasmiden kodiert eingebracht sind. Zum anderen sollen zur Bestätigung Knockout-Stämme hergestellt werden, welche durch Entfernung verschiedener Bereiche des *cas*-Operons dieselben *cas*-Genkombinationen aufweisen wie die Komplementationsstämme. All diese Stämme sollen *in vivo* hinsichtlich der crRNA-Population analysiert werden. Zudem soll anhand von Plasmid-basierten Interferenzttests ermittelt werden, welche Cas-Proteine für eine erfolgreiche Interferenzreaktion vonnöten sind.

Von anderen Typ I CRISPR/Cas-Systemen ist bekannt, dass mehrere Cas-Proteine im Zuge der crRNA Biogenese und der Interferenz einen Cascade-Komplex bilden. Anhand von Ko-Aufreinigungsexperimenten soll festgestellt werden, ob in *H. volcanii* ein vergleichbarer Komplex existiert und welche Cas-Proteine Untereinheiten desselben darstellen.

Desweiteren soll das Cas6-Protein aus *H. volcanii* genauer charakterisiert werden. Anhand von Mutationsanalysen sollen funktionelle Aminosäuren innerhalb der Proteinsequenz identifiziert werden. Dazu soll ein *cas6*-Deletionsstamm mit diversen mutierten Versionen des *cas6*-Gens auf Plasmiden kodiert komplementiert werden und diese Stämme *in vivo* hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur crRNA-Biogenese und Interferenz analysiert werden. Zudem soll Cas6 anhand von Affinitäts-Tags aus Zellextrakten von *H. volcanii* und rekombinant aus *E. coli* isoliert werden. Mit den gereinigten Proteinen soll der Versuch unternommen werden, eine Prozessierung von crRNA-Vorläufern *in vitro* zu erreichen.

Um diverse Cas-Proteine im Zuge der oben genannten Untersuchungen nachweisen zu können, sollen zudem polyklonale Antikörper gegen die Proteine Cas5, Cas6 und Cas7 durch die Immunisierung von Mäusen hergestellt werden, wobei das jeweils benötigte Antigen durch Überproduktion von rekombinantem Protein in *E. coli* gewonnen werden soll.

Zuletzt soll ein Cas6-Protein eines weiteren Organismus, dem Bakterium *C. lactoaceticus*, näher untersucht werden. Dazu soll das Protein rekombinant aus *E. coli* anhand eines Affinitäts-Tags gereinigt und *in vitro* hinsichtlich der Bindung und Prozessierung von Repeat-RNA analysiert werden.

2. MATERIAL

2.1. Stämme

Tabelle 2.1: Verwendete Stämme von *E. coli* und *H. volcanii*.

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i>		
DH5α	F ⁻ , φ80d/ <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Stratagene
BL21AI	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>araB::T7RNAP-tetA</i> , TetA ^R	Invitrogen/ LifeTechnologies
BL21 codon plus	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^r , <i>gal</i> , <i>endA</i> , <i>Hte</i> [<i>argU</i> , <i>ileY</i> , <i>leuW</i> , Cam ^r]	Novagen
GM121	F ⁻ , <i>dam-3</i> , <i>dcm-6</i> , <i>ara-14</i> , <i>fhuA31</i> , <i>galk2</i> , <i>galT22</i> , <i>hdsR3</i> , <i>lacY1</i> , <i>leu-6</i> , <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>tsx-78</i>	ALLERS ET AL., 2010
<i>H. volcanii</i>		
H119	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>trpA</i> , Δ <i>leuB</i>	ALLERS ET AL., 2004
H1424	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , <i>Nph-pitA</i> , Δ <i>mmr</i> , <i>cdc48d-Ct</i>	STROUD ET AL., 2012
H26Δ <i>cas</i> (28)	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>cas</i> (ΔpHV4: 207.288-218.340)	FISCHER ET AL., 2012
H119Δ <i>cas</i> (7)	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>trpA</i> , Δ <i>leuB</i> , Δ <i>cas</i> (ΔpHV4: 207.222-218.405)	WITTMANN, 2013
H119Δ <i>cas</i> 6	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>trpA</i> , Δ <i>leuB</i> , Δ <i>cas</i> 6	STOLL, 2013
H119Δ <i>cas</i> 7	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>trpA</i> , Δ <i>leuB</i> , Δ <i>cas</i> 7	STOLL, 2013
H119Δ <i>cas</i> 8	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>trpA</i> , Δ <i>leuB</i> , Δ <i>cas</i> 8	STOLL, 2013
H26Δ <i>cas</i> (28)+pTA927- <i>cas</i> 68	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>cas</i> , <i>cas</i> 6 und <i>cas</i> 8 mit <i>P.tnaA</i> -Promotor auf dem Vektor pTA927	diese Arbeit
H26Δ <i>cas</i> (28)+pTA927- <i>cas</i> 67	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>cas</i> , <i>cas</i> 6 und <i>cas</i> 7 mit <i>P.tnaA</i> -Promotor auf dem Vektor pTA927	diese Arbeit
H26Δ <i>cas</i> (28)+pTA927- <i>cas</i> 65	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>cas</i> , <i>cas</i> 6 und <i>cas</i> 5 mit <i>P.tnaA</i> -Promotor auf dem Vektor pTA927	diese Arbeit
H26Δ <i>cas</i> (28)+pTA927- <i>cas</i> 87	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>cas</i> , <i>cas</i> 8 und <i>cas</i> 7 mit <i>P.tnaA</i> -Promotor auf dem Vektor pTA927	diese Arbeit
H26Δ <i>cas</i> (28)+pTA927- <i>cas</i> 85	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>cas</i> , <i>cas</i> 8 und <i>cas</i> 5 mit <i>P.tnaA</i> -Promotor auf dem Vektor pTA927	diese Arbeit
H26Δ <i>cas</i> (28)+pTA927- <i>cas</i> 75	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>cas</i> , <i>cas</i> 7 und <i>cas</i> 5 mit <i>P.tnaA</i> -Promotor auf dem Vektor pTA927	diese Arbeit
H26Δ <i>cas</i> (28)+pTA927- <i>cas</i> 675	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>cas</i> , <i>cas</i> 6, <i>cas</i> 7 und <i>cas</i> 5 mit <i>P.tnaA</i> -Prom. auf Vektor pTA927	diese Arbeit
H26Δ <i>cas</i> (28)+pTA927- <i>cas</i> 685	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>cas</i> , <i>cas</i> 6, <i>cas</i> 8 und <i>cas</i> 5 mit <i>P.tnaA</i> -Prom. auf Vektor pTA927	diese Arbeit
H26Δ <i>cas</i> (28)+pTA927- <i>cas</i> 687	DS70(ΔpHV2), Δ <i>pyrE2</i> , Δ <i>cas</i> , <i>cas</i> 6, <i>cas</i> 8 und <i>cas</i> 7 mit <i>P.tnaA</i> -Prom. auf Vektor pTA927	diese Arbeit

H26Δcas(28) +pTA927-cas6875	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, Δcas, cas6, cas8, cas7, cas5 mit P.tnaA-Prom. auf Vektor pTA927	diese Arbeit
„6875“	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas1, Δcas2, Δcas3, Δcas4	diese Arbeit
„687“	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas1, Δcas2, Δcas3, Δcas4, Δcas5	diese Arbeit
„685“	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas1, Δcas2, Δcas3, Δcas4, Δcas7	diese Arbeit
„675“	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas1, Δcas2, Δcas3, Δcas4, Δcas8	diese Arbeit
„68“	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas1, Δcas2, Δcas3, Δcas4, Δcas5, Δcas7	diese Arbeit
„67“	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas1, Δcas2, Δcas3, Δcas4, Δcas5, Δcas8	diese Arbeit
„65“	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas1, Δcas2, Δcas3, Δcas4, Δcas7, Δcas8	diese Arbeit
„87“	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas1, Δcas2, Δcas3, Δcas4, Δcas5, Δcas6,	diese Arbeit
„85“	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas1, Δcas2, Δcas3, Δcas4, Δcas6, Δcas7	diese Arbeit
„75“	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas1, Δcas2, Δcas3, Δcas4, Δcas6, Δcas8	diese Arbeit
„6875“+pTA927-cas3-FlagC	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas1, Δcas2, Δcas3, Δcas4, cas3 mit C-term. FLAG-Tag und P.tnaA-Prom. (Vektor pTA927)	diese Arbeit
„675“+pTA927-cas3-FlagC	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas1, Δcas2, Δcas3, Δcas4, Δcas8, cas3 mit C-term. FLAG-Tag und P.tnaA-Prom. (Vektor pTA927)	diese Arbeit
H119Δcas5	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas5	diese Arbeit
H26Δcas(28) +pTA927-(Flag)cas6875	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, Δcas, cas-Gene cas6, cas8, cas7 und cas5 mit P.tnaA-Promotor auf dem Vektor pTA927, cas6 mit N-term. FLAG-Tag	diese Arbeit
H26Δcas(28) +pTA927-cas6(HisFlag)875	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, Δcas, cas-Gene cas6, cas8, cas7 und cas5 mit P.tnaA-Promotor (Vektor pTA927), cas8 mit N-terminalem 6xHis- und FLAG-Tag	diese Arbeit
H26Δcas(28) +pTA927-cas68(HisFlag)75	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, Δcas, cas-Gene cas6, cas8, cas7 und cas5 mit P.tnaA-Promotor (Vektor pTA927), cas7 mit N-term. 6xHis- und FLAG-Tag	diese Arbeit
H119Δcas(7) +pTA352-cas687 +pTA927-cas5-FlagN	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas, cas-Gene cas6, cas8 und cas7 mit P.tnaA-Promotor (Vektor pTA352), cas5 mit N-terminalem FLAG-Tag (Vektor pTA927)	diese Arbeit
H119Δcas6 +pTA927-cas6mut-FlagN	DS70(ΔpHV2), ΔpyrE2, ΔtrpA, ΔleuB, Δcas6, mutierte cas6-Gene mit N-terminalem FLAG-Tag und P.tnaA-Promotor auf Vektor pTA927	diese Arbeit

H119 Δ cas6 +pTA927-cas6- FlagN	DS70(Δ pHV2), Δ pyrE2, Δ trpA, Δ leuB, Δ cas6, cas6- Gen mit N-terminalem FLAG-Tag und P.tnaA- Promotor auf dem Vektor pTA927	diese Arbeit
H1424+pTA963- cas6	DS70(Δ pHV2), Δ pyrE2, <i>Nph-pitA</i> , Δ mmr, <i>cdc48d</i> - Ct, cas6-Gen mit N-terminalem 6xHis-Tag und P.tnaA-Promotor auf dem Vektor pTA963	diese Arbeit

2.2. Vektoren

Tabelle 2.2: Verwendete Vektoren.

Vektor	Eigenschaften	Herkunft
pBlueskript II KS	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R	Stratagene
pET28a	f1 ori, pBR322 ori, Kan ^R , <i>lacI</i> , T7-Promotor, T7-Terminator, (6xHis-Tag (N/C-term.))	Novagen
pET29a	f1 ori, pBR322 ori, Kan ^R , <i>lacI</i> , T7-Promotor, T7-Terminator, (6xHis-Tag (C-term.), S-Tag (N-term.))	Novagen
pET30a	f1 ori, pBR322 ori, Kan ^R , <i>lacI</i> , T7-Promotor, T7-Terminator, (6xHis-Tag (N/C-term.), S- Tag (N-term.))	Novagen
pCR-BluntII- TOPO	pUC ori, Kan ^R , Zeo ^R , T7-Promotor, T7- Terminator, <i>lacZ</i> α , <i>ccdB</i>	Invitrogen/ LifeTechnologies
pTA131	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i>	ALLERS & MEVARECH, 2005
pTA352	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>LeuB</i> , pHV1 ori	NORAIS ET AL., 2007
pTA409	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , <i>hdrB</i> , pHV1/4 ori	HÖLZLE ET AL., 2008
pTA927	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, P.tnaA Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator	ALLERS ET AL., 2010
pTA963	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, P.tnaA Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, (6xHis-Anhang (N-term.))	ALLERS ET AL., 2010
pTA352-PAM3	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>LeuB</i> , pHV1 ori, PAM TTC + Spacer P1.1	MAIER ET AL., 2013
pTA352-PAM9	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>LeuB</i> , pHV1 ori, PAM ACT + Spacer P1.1	MAIER ET AL., 2013
pTA409-PAM3	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , <i>hdrB</i> , pHV1/4 ori, PAM TTC +Spacer P1.1	FISCHER ET AL., 2012
pTA409-PAM9	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , <i>hdrB</i> , pHV1/4 ori, PAM ACT +Spacer P1.1	FISCHER ET AL., 2012
pET29a-cas5	f1 ori, pBR322 ori, Kan ^R , <i>lacI</i> , T7-Promotor, T7-Terminator, <i>cas5</i> (ohne Tag)	diese Arbeit

pET30a- <i>cas6</i>	f1 ori, pBR322 ori, Kan ^R , <i>lacI</i> , T7-Prom, T7-Terminator, <i>cas6</i> (ohne Tag)	diese Arbeit
pET29a- <i>cas7</i>	f1 ori, pBR322 ori, Kan ^R , <i>lacI</i> , T7-Promotor, T7-Terminator, <i>cas7</i> (ohne Tag)	diese Arbeit
pTA927- <i>cas68</i>	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas6</i> , <i>cas8</i>	diese Arbeit
pTA927- <i>cas67</i>	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas6</i> , <i>cas7</i>	diese Arbeit
pTA927- <i>cas65</i>	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas6</i> , <i>cas5</i>	diese Arbeit
pTA927- <i>cas87</i>	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas8</i> , <i>cas7</i>	diese Arbeit
pTA927- <i>cas85</i>	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas8</i> , <i>cas5</i>	diese Arbeit
pTA927- <i>cas75</i>	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas7</i> , <i>cas5</i>	diese Arbeit
pTA927- <i>cas675</i>	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas6</i> , <i>cas7</i> , <i>cas5</i>	diese Arbeit
pTA927- <i>cas685</i>	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas6</i> , <i>cas8</i> , <i>cas5</i>	diese Arbeit
pTA927- <i>cas687</i>	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas6</i> , <i>cas8</i> , <i>cas7</i>	diese Arbeit
pTA927- <i>cas6875</i>	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas6</i> , <i>cas8</i> , <i>cas7</i> , <i>cas5</i>	diese Arbeit
pTA131-up5do2	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , flankierende Regionen stromaufwärts <i>cas5</i> und stromabwärts <i>cas2</i>	diese Arbeit
pTA131-up3do2	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , flankierende Regionen stromaufwärts <i>cas3</i> und stromabwärts <i>cas2</i>	diese Arbeit
pTA131-up8do7	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , flankierende Regionen stromaufwärts <i>cas8</i> und stromabwärts <i>cas7</i>	diese Arbeit
pTA131-up6do8	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , flankierende Regionen stromaufwärts <i>cas6</i> und stromabwärts <i>cas8</i>	diese Arbeit

pTA131-up7do2	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , flankierende Regionen stromaufwärts <i>cas7</i> und stromabwärts <i>cas2</i>	diese Arbeit
pTA131-up6do6	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , flankierende Regionen <i>cas6</i>	STOLL, 2013
pTA131-up5do5	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , flankierende Regionen <i>cas5</i>	diese Arbeit
pTA927-(Flag) <i>cas6</i> 875	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas6</i> mit N-terminalem FLAG-Tag, <i>cas8</i> , <i>cas7</i> , <i>cas5</i>	diese Arbeit
pTA927- <i>cas6</i> (HisFlag)875	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas6</i> , <i>cas8</i> mit N-terminalem 6xHis- und FLAG-Tag, <i>cas7</i> , <i>cas5</i>	diese Arbeit
pTA927- <i>cas6</i> 8(HisFlag)75	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas6</i> , <i>cas8</i> , <i>cas7</i> mit N-terminalem 6xHis- und FLAG-Tag, <i>cas5</i>	diese Arbeit
pTA927- <i>cas5</i> -FlagN	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, <i>cas5</i> mit N-terminalem FLAG-Tag	diese Arbeit
pTA352- <i>cas6</i> 87	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>LeuB</i> , pHV1 ori, <i>cas6</i> , <i>cas8</i> , <i>cas7</i>	diese Arbeit
pTA927- <i>cas6</i> mut-FlagN	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Terminator, mutierte <i>cas6</i> -Gene mit N-terminalem FLAG-Tag	diese Arbeit
pTA927- <i>cas6</i> -FlagN	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Promotor, L11e Terminator, t.syn Term., <i>cas6</i> mit N-term. FLAG-Tag	diese Arbeit
pTA963- <i>cas6</i>	ColE1 ori, f1 ori, <i>lacZ</i> , Amp ^R , <i>pyrE2</i> , pHV2 ori, <i>P.tnaA</i> Prom., L11e Term., t.syn Term., <i>cas6</i> mit N-term. 6xHis-Tag	diese Arbeit
pET30a- <i>cas6</i> (H)	f1 ori, pBR322 ori, Kan ^R , <i>lacI</i> , T7-Promotor, T7-Terminator, <i>cas6</i> mit N-term. 6xHis- und S-Protein-Tag, Gensequenz an <i>E. coli</i> Expression angepasst	diese Arbeit
pET30a- <i>cas6</i> (ohneStop)	f1 ori, pBR322 ori, Kan ^R , <i>lacI</i> , T7-Promotor, T7-Terminator, <i>cas6</i> mit N-terminalem 6xHis- und S-Protein-Tag und C-terminalem 6xHis-Tag	diese Arbeit
pET30a-Cas6-FlagN	f1 ori, pBR322 ori, Kan ^R , <i>lacI</i> , T7-Promotor, T7-Terminator, <i>cas6</i> mit N-terminalem FLAG-Tag	diese Arbeit

TOPO-P2-4S3R	pUC ori, Kan ^R , Zeo ^R , T7-Promotor, T7-Terminator, <i>lacZα</i> , <i>ccdB</i> , Spacer1 bis Spacer2 des Locus P2	diese Arbeit
pET28a- <i>callacas6</i>	f1 ori, pBR322 ori, Kan ^R , <i>lacI</i> , T7-Promotor, T7-Terminator., <i>cas6</i> aus <i>C. lactoaceticus</i> (Calla_2409) mit N-terminalem 6xHis-Tag, Gensequenz an <i>E. coli</i> -Expression angepasst.	diese Arbeit

2.3. Nukleinsäuren

Nukleotide	dNTP-Set ATP γ - ³² P- ATP, α - ³² P- dCTP, ³² P- pCp, ³² P-UTP	Promega ThermoScientific PerkinElmer/ Hartmann
-------------------	---	---

RNA-Oligonukleotide	Repeat RNA	
P2	GUUUCAGACGAACCCUUGUGGGUUUGAAGC	Eurofins MWG
Calla	GUUUGUAGCCUCCCCUUUGGGAUUGAAAC	Eurofins MWG
CallaD	GUUUGUAGCCUCCCCUUUGGG(dG)AUUGAAAC	Eurofins MWG

(In Klammern ist das Deoxynukleotid angegeben)

DNA-Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma in lyophilisierter Form bezogen und in bidestilliertem Wasser gelöst. Die Sequenz ist jeweils in 5′ – 3′-Richtung angegeben. Eine Phosphorylierung am 5′-Ende ist durch [Phos] angegeben.

allgemein

US	GTAACGCCAGGGTTTTCCC
RS	CACAGGAAACAGCTATGAC
M13-FP	TGTAAAACGACGGCCAGT
M13-RP	CAGGAAACAGCTATGACC
pTA927fw	CCGATGCACACACCAAGTCCACG
pTA927rev	CTGGAGCTCCACCGCGCCGA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7Term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Mutationen von HvoCas6

6iY15Af	[Phos]ATGCGGCCGCGACCGG
6iY15Ar	[Phos]CAGCAACGGCATCGAGCGCT
6iY19Af	[Phos]ACCGGTCTGCCTTCCATAAGG
6iY19Ar	[Phos]CGTAGGCCGCATCAGCAACG
6iK22Af	[Phos]TCTTATTTCCATGCGGCACGCG
6iK22Ar	[Phos]CCGGTCGTAGGCCGCATCA
6iR26Af	[Phos]ACGCGGAGCCATCTGGCG
6iR26Ar	[Phos]GCCTTATGGAAATAAGACCGGTC
H21A	ACGACCGGTCTTATTTTCGCTAAGGCACGCGGACGC
H21Ar	GCGTCCGCGTGCCTTAGCGAAATAAGACCGGTCTGT
iW28A	[Phos]ACGCATCGCGCGCGGCTCGAGAA
iW28Ar	[Phos]CCGCGTGCCTTATGGAAATAAGACCGG
H41A	ACGTTCTCGGAGACCGCCGATTCGAACCACGGCGTC
H41Ar	GACGCCGTGGTTCGAATCGGCGGTCTCCGAGAACGT
H45A	ACCCACGATTCTGAACGCCGGCGTCGGGTTTTTC
H45Ar	GAAAACCCGACGCCGGCGTTCGAATCGTGGGT
F49A	AACCACGGCGTCGGGGCTTCGTAATCTAATATC
F49Ar	GATATTAGAGTACGAAGCCCCGACGCCGTGGTT
Y51A	ACGGCGTCGGGTTTTTCGGCCTCTAATATCTTCCCTTG
Y51Ar	CAAGGGAAGATATTAGAGGCCGAAAACCCGACGCCGT
6iR66Af	[Phos]GACCGGGCCTACTTCCGCA
6iR66Ar	[Phos]GCCCTCTTCTATCTGTCCCCA
S115A	ACGTGGGTGAGGCCGAGCGACCGGTGTCCTCGAGACG
S115Ar	CGTCTCGAGGACACCGGTCTCGTCCGGCCTCACCACGT
T116A	TGGGTGAGGCCGATCGGCCGGTGTCTCGAGACG
T116Ar	CGTCTCGAGGACACCGGCCGATCCGGCCTCACCCA
L172A	ATCCGGCGGTCTGGCCCAACAGACACACG
L172Ar	CGTGTGTCTGTTGGGCCGACCGCCGGAT
6S224Af	CACCGTTCTGCTTGCGAAGTGGCGCTTC
6S224Ar	GAAGCGCCACTTCGCAAGCAGAACGGTG
W226A	TTCTGCTTTTGAAGGCGCGCTTCGGCTAC
W226Ar	GTAGCCGAAGCGCGCCTTCGAAAGCAGAA
G248A	TCGCGCTCGATTGCGCGATTGGACAGCGAC
G248Ar	GTCGCTGTCCAATCGCCGAATCGAGCGCGA
G250A	TCGATTGCGGGATTGCACAGCGACGCGAAC
G250Ar	GTTTCGCGTCGCTGTGCAATCCCCGAATCGA
G256A	AGCGACGCGAACACGCGTTTGGCTTCCTGAAC
G256Ar	GTTTCAGGAAGCCAAACGCGTGTTCGCGTCGCT
F257A	AGCGACGCGAACACGGGGCTGGCTTCCTGAACCTC
F257Ar	GAGGTTTCAGGAAGCCAGCCCCGTGTTTCGCGTCGCT

G258A	ACGCGAACACGGGTTTGCCTTCCTGAACCTCAC
G258Ar	GTGAGGTTTCAGGAAGGCAAACCCGTGTTCGCGT

Klonierungen von *cas*-Genen und flankierenden Regionen

3-Cas5-BamHI	TAATATGGATCCTTAGCGGAAGACGACGGTCCGGTC
3-Cas5-XbaI	TAATATTCTAGATTAGCGGAAGACGACGGTCCGGTC
3-Cas6-BamHI	TATTATGGATCCTCAGTCACTCGCCCGTGGAAGCGTTTTG
3-Cas6-HindIII	TATTATAAGCTTGTCACTCGCCCGTGGAAGCGTTTTG
3-Cas6-HindIIIlo.Stop	TATTATAAGCTTGTCACTCGCCCGTGGAAGCGTTTTG
3-Cas6-NotI	TTATAAGCGGCCGCTCAGTCACTCGCCCGTGGAAGCGTTTTG
3-Cas8-NcoI/BamHI	TAATATGGATCCCCATGGTTAGTTCGTGGTGCTCTCAGC
3-Csh2-HindIII	ATATATAAGCTTTTAGGCGAGGTCGCGTTCGTTGAGC
3-Csh2-NotI	TTATAAGCGGCCGCTTAGGCGAGGTCGCGTTCGTTGAG
5-Cas6-NcoI	TTATAACCATGGCTGGCGTCGGTATAGATTTAGCGCTC
5-Cas6-PciI	TTATAAACAGTGCGGGCGTGCGTATAGATTTAGCGCTC
5-Cas7-HindIII	TAATATAAGCTTACGACACTCAACCGATCCGAACTTC
5-Cas8-HindIII	TATTATAAGCTTACAGGTCCAGATATCGACGACTTCG
5-Cas8-NdeI	TATTATCATATGACAGGTCCAGATATCGACGACTTCG
5-Csh2-NdeI	TTATAACATATGACGACACTCAACCGATCCGAACTTC
Cas2KOdoBamHI	TATTATGGATCCGAGTCTGTTTCTTTCTGGGTGTTTTCGTCCCGA
Cas5FlagCup	TAATATATCATATGTCACCGCATATCGACGCCAACG
Cas5FlagNdo	TAATATATGAATTCTTAGCGGAAGACGACGGTCCGGTCCG
Cas5FlagNup	TAATATATAAGCTTATGTCACCGCATATCGACGCCAACG
Cas5KOdo	ACGTGCTGTCCGTCTCCCCACTTC
Cas5KOup	ACCTCGACGACAAGCGCATCAAATACG
Cas6FlagCup	TAATATATCATATGGTGCGTATAGAATTAGCGCTCGATGC
Cas6FlagNdo	TAATATATGAATTCTCAGTCACTCGCCCGTGGAAGCGTTTT
Cas6FlagNup	TAATATATAAGCTTGTGCGTATAGAATTAGCGCTCGATGCC
Cas6KOdo	AGCCGGAGGCGGACTGTGATGACG
Cas6KOup	CCTTGTGGGATTGAAGCCGGCTCG
Csh1KOdo	CGTATTCCTCGTTCTCTTCGACCTCG
Csh1KOup	CGAAATTGGGCAGATGCGGTTCACTATCG
Csh2KOdo	TCTCGTCGATGTCTTGACCTCG
Csh2KOup	CCATGACAACCGAAACTGAAACTGAAACTG
Flag2	TAATATAAGCTTTTTATCGTCGTCATCTTTGTAG
FlagSnaBI	TAATATTACGTAGACTACAAAGACCATGACGG
HisFlag-BamHI	TAATATGGATCCATGCATCACCACCACCATCACGTAGAC
HPAM9P2Sp6	GATCCGAGAGGCTTCCTCCCTCG
HPAM9P2Sp10	AGGCGGCGCAGACTTCGAGGTTGC
iCas2KOdo	[Phos]ACTAAGGCACCACCTTGACAAGCGAACGG

iCas3K0up	[Phos]GCTGAAAATACGGAGGGTGTTTCGGTTAG
iCas5K0do	CCGAACACCCTCCGTATTTTCAGCATG
iCas5K0up	TGTCGCCTCGTTAGGCGAGGTCGCGTTC
IPCas6K0do	[Phos]ATGACAGGTCCAGATATCGACGACTTCG
IPCas6K0up	GCCTCATATCACCCCTCTCAAAGTTGTG
IPCsh1K0do	TCCAACACATAACCAAACCAATGACGACAC
IPCsh1K0up2	TCAGTCACTCGCCCGTGGAAGCGTT
IPCsh2K0do	[Phos]CGAGGCGACAATGTCACCGCATATCG
IPCsh2K0up	[Phos]TGGTTTGGTTATGTGTTGGATTAGTTCGTGG
P1Sp1fw	GCAGGCATCTCGACCGGCGACCTCC
VPAM9P1Ende	TACTGTCGCTCGCGGGATCGACATCATCGC

Herstellung von Vorläufern

P2-Sp1-4	TCGGGGTGGACGTTCTGCCGGG
P2-Sp4	CGCACTCGGGGCAGGCGTAATTA
P2-Sp3	CCACAGACGTGTGATTCGATACG
T7-P2-Sp1	TTAATACGACTCACTATAGTCGGGGTGGACGTTCTGCCGGG

Sonden für die Hybridisierung

P1Sp1	GTTCCGGGAGGTCGCCGGTCGAGATGCCTGC
5S	CGCAGGTGAGCTTAACCTCCGTGTTCGGG

2.4. Mutagenese

QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit

Agilent Technologies

2.5. Marker

DNA-Marker	1KB-DNA Ladder	Invitrogen
	pGEM DNA Marker	Promega
Protein-Marker	Pageruler Prestained Protein Ladder	ThermoScientific
	Gel Filtration Standard	BioRad

2.6. Enzyme und Inhibitoren

DNase	RQ1 RNase-free DNase	Promega
Inhibitoren	Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma
	RiboLock RNase Inhibitor	ThermoScientific
Kinase	T4 Polynucleotide Kinase (Puffer A)	ThermoScientific
Ligase	T4 DNA Ligase	Promega
	T4 RNA Ligase	ThermoScientific
Polymerasen	GoTaq DNA Polymerase	Promega
	Phusion Hot Start Polymerase (Puffer GC)	Finnzymes
	<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega
	T7-RNA-Polymerase	Promega
Protease	Proteinase K	Roche
Restriktionsenzyme	diverse	ThermoScientific
Ribonuklease	RNase A	Roth

2.7. Reinigung von Proteinen

6xHis-Tag	Protino Ni-NTA Agarose	Macherey-Nagel
FLAG-Tag	Anti-FLAG M2 affinity gel	Sigma
	3XFLAG-Peptid	Sigma
Gelfiltration	Säule Superdex 200 5/150 GE	GE Healthcare

2.8. Reinigung von Nukleinsäuren

Plasmidpräparation	Axyprep Plasmid Miniprep Kit	Axygen
	Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel
DNA-Extraktion aus PCR-Ansätzen und Agarosegelen	GFX DNA & Gel Band Purification Kit	GE Healthcare
Reinigung von radioaktiv markierten Sonden	Nap5-Säulen	Amersham
Reinigung von RNA	TRIzol Reagent	Life Technologies

2.9. Sondenmarkierung

radioaktiv	Rediprime™ II Random Prime Labeling System	GE Healthcare
Digoxigenin	DIG-DNA Labeling Kit	Roche
	DIG DNA Labeling Mix	Roche

2.10. Antikörper

Anti His	Anti-Tag Antibody HRP Conjugate Kit	Novagen
Anti FLAG	Anti-FLAG HRP antibody (from mouse)	Sigma
Anti Digoxigenin	DIG-DNA Labeling and Detection Kit	Roche
Anti Maus	Goat Anti-Mouse IgG HRP Conjugate	Novagen

2.11. Chemikalien

Falls nicht anders angegeben, wurden alle für diese Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen Duchefa, Roth, Sigma-Aldrich und VWR bezogen.

2.12. Nährmedien

Soweit nicht anderweitig angegeben, werden die Nährmedien bzw. deren Komponenten autoklaviert (20 min, 121 °C, 1 bar). Für Festmedien (Agar) wird das auf 60 °C abgekühlte Medium in Petrischalen zu Platten gegossen (pro Platte 30 ml).

<i>E. coli</i>	2xYT-Flüssigmedium	16 g/L	Trypton
		10 g/L	Hefeextrakt
		5 g/L	NaCl
	2xYT-Agar	16 g/L	Trypton
		10 g/L	Hefeextrakt
		5 g/L	NaCl
		15 g/L	Microagar
	=> Zusätze:	+ Kan: 1 ml/L	Kanamycin-Stammlösung

+ 3K	1,5 ml/L	Ampicillin-Stammlösung
	1 ml/L	IPTG-Stammlösung
	1 ml/L	X-Gal-Stammlösung

(die Zusätze werden als Stammlösung erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf mindestens 60° C zugegeben)

H. volcanii

Hv-YPC-Flüssigmedium	99 ml	10x YPC
	600 ml	30 % Salzwasser
	298 ml	H ₂ O _{bidest}
	3 ml	1 M CaCl ₂

(CaCl₂ wird erst kurz vor der Verwendung zugegeben)

Hv-Ca+Trp-Flüssigmedium	600 ml	30 % Salzwasser
	30 ml	1 M Tris/HCl pH 7,5
	225 ml	H ₂ O _{bidest}
	99 ml	10x Ca
	25,5 ml	Hv-Min Carbon Source
	12 ml	Hv-Min Salts
	1,95 ml	0,5 M KPO ₄ pH 7,5
	0,9 ml	Thiamin & Biotin-Lösung
	5,1 ml	Tryptophan-Stammlösung

Hv-Min+Trp-Flüssigmedium	600 ml	30 % Salzwasser
	30 ml	1 M Tris/HCl pH 7,5
	324 ml	H ₂ O _{bidest}
	25,5 ml	Hv-Min Carbon Source
	12 ml	Hv-Min Salts
	1,95 ml	0,5 M KPO ₄ pH 7,5
	0,9 ml	Thiamin & Biotin-Lösung
	5,1 ml	Tryptophan-Stammlösung

Hv-YPC/Ca/Min-Agar	5 g	Bacto-Agar (BD)
	100 ml	H ₂ O _{bidest}
	200 ml	30% Salzwasser

=> Zutaten in der Mikrowelle unter regelmäßigem Schwenken lösen (20 min 750 Watt, 20 min 600 Watt, 10 min 360 Watt).

Hv-YPC:	+ 33 ml	10x YPC
Hv-Ca:	+ 33 ml	10x Ca
Hv-Min:	+ 20 ml	0,5 M Tris/HCl pH 7,5

=> Autoklavieren, Abkühlen lassen auf 60 °C.

	Hv-YPC:	+ 1ml	1 M Tris/HCl pH 7,5
		+ 1ml	1 M CaCl ₂
	Hv-Ca:	+ 1 ml	1 M CaCl ₂
		+ 0,3 ml	Thiamin & Biotin-Lösung
	Hv-Min:	8,5 ml	Hv-Min Carbon Source
		4 ml	Hv-Min Salts
		0,65 ml	0,5 M KPO ₄ pH 7,5
		0,3 ml	Thiamin & Biotin-Lösung
=> Zusätze:	+Trp:	1,7 ml	Tryptophan-Stammlösung
	+ 5-FOA:	340 µl	5-FOA-Stammlösung
		67 µl	Uracil-Stammlösung
	Trp-Boost-Lösung:	30 mM	Tryptophan
		60 ml	30 % Salzwasser
		ad 100 ml	H ₂ O _{bidest}
Stammlösungen	10x YPC	1,7 g	Bacto Hefeextrakt (BD)
		0,34 g	Pepton(Oxoid)
		0,34 g	Casamino Acids (BD)
		26 ml	H ₂ O _{bidest}
		0,6 ml	1 M KOH
	10x Ca [%]	1,7 g	Casamino Acids (BD)
		26 ml	H ₂ O _{bidest}
		0,8 ml	KOH
	(KOH wird jeweils tropfenweise zugegeben und die Lösung danach auf 33 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt)		
	30 % Salzwasser	240 g/L	NaCl
		30 g/L	MgCl ₂ * 6 H ₂ O
		35 g/L	MgSO ₄ * 7 H ₂ O
		7 g/L	KCl
		20 mM/L	Tris/HCl pH 7,5
	Thiamin & Biotin [§]	9,6 mg	Thiamin
		1,2 mg	Biotin
		ad 10 ml	H ₂ O _{bidest}

Hv-Min Carbon Source [§]	41,7 ml	60% DL-Lactat-Na-Salz
	37,5 g	Succinat-Na ₂ Salz*6H ₂ O
	2,52 ml	Glycerol
	0,63 ml	30 % Salzwasser
	ad 250 ml	H ₂ O _{bidest}
	pH 7,5	NaOH
Hv-Min Salts [§]	30 ml	1M NH ₄ Cl
	18 ml	1 M CaCl ₂
	6 ml	Trace Elements
	ad 72 ml	H ₂ O _{bidest}
Trace Elements [§]	3,6 mg	MnCl ₂ * 4 H ₂ O
	4,6 mg	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O
	23 mg	FeSO ₄ * 7 H ₂ O
	0,5 mg	CuSO ₄ * 5 H ₂ O
	ad 100 ml	H ₂ O _{bidest}
Tryptophan [§]	10 mg/ml	in H ₂ O _{bidest}
Uracil [§]	50 mg/ml	in DMSO
5-FOA [§]	50 mg/ml	in DMSO
Kanamycin [§]	30 mg/ml	in H ₂ O _{bidest}
Ampicillin [§]	50 mg/ml	in H ₂ O _{bidest}
IPTG [§]	100 mM	in H ₂ O _{bidest}
X-Gal [§]	40 mg/ml	in DMF

[§] sterilfiltriert (45 µm Filter)

^{\$} nicht sterilfiltriert/autoklaviert

[%] autoklaviert 10 min

2.13. Puffer und Lösungen

Transformation von <i>H. volcanii</i>	Lösung A (gepufferte Sphäroblasten-Lösung)	1 M	NaCl
		27 mM	KCl
		50 mM	Tris/HCl pH 8,5
		15 % (w/v)	Saccharose

Lösung B (ungepufferte Sphäroblasten-Lösung)	1 M	NaCl
	27 mM	KCl
	15 % (w/v)	Saccharose
		pH 7,5 (NaOH)
Lösung C (Shäroblasten- Verdünnungs-Lösung)	23 %	Salzwasser
	15 % (w/v)	Saccharose
	3,75 mM	CaCl ₂
Lösung D (Regenerations- Lösung)	18 %	Salzwasser
	1x	YPC
	15 % (w/v)	Saccharose
	3 mM	CaCl ₂
Lösung E (Transformanten- Verdünnungs-Lösung)	18 %	Salzwasser
	15 % (w/v)	Saccharose
	3 mM	CaCl ₂

(Alle Lösungen werden 10 Minuten autoklaviert. Die Zugabe von CaCl₂ erfolgt jeweils erst nach Abkühlen)

**Isolation von
genomischer DNA
aus *H. volcanii***

Lysepuffer	100 mM	EDTA
	0,2 % (w/v)	SDS pH 8 (NaOH)
ST-Puffer	1 M	NaCl
	20 mM	Tris/HCl pH 7,5
TE-Puffer	10 mM	Tris/HCl pH 8
	1 mM	EDTA

**Southern Blot /
Hybridisierung**

Denaturierungslösung	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
Neutralisierungslösung	1 M	Tris/HCl pH 8
	1,5 M	NaCl
20x SSC-Puffer	3 M	NaCl
	300 mM	Na ₃ -Citrat, pH 7
50x Denhardt's	10 g/L	Ficoll
	10 g/L	Polyvinylpyrrolidin
	10 g/L	BSA

Digoxigenin-Detektion	Prähybridisierungslösung (für radioaktive Sonden)	15 ml	20x SSC
		25 ml	Formamid, deionisiert
		5 ml	50x Denhardt's
		5 ml	10 % (w/v) SDS
		50 µl	denatur. Lachssperma-DNA
		ad 50 ml	H ₂ O _{bidest}
	Hybridisierungslösung	50 ml	Prähybridisierungslösung
		1 ml	gereinigte Sonden (radioaktiv markiert)
	Prähybridisierungslösung (Digoxigenin-markierte Sonde)	12,5 ml	20x SSC
		25 ml	Formamid, deionisiert
		10 ml	DIG-Puffer 2
		0,5 ml	10 % (w/v) N-Laurylsarkosin
		0,1 ml	10 % (w/v) SDS
		50 µl	denatur. Lachssperma-DNA
	Hybridisierungslösung	50 ml	Prähybridisierungslösung
		x µl	Digoxigenin-markierte Sonde
	Waschlösungen	2x/1x/ 0,5x SSC, 0,1 % (w/v) SDS	
	Stripping Puffer	0,5 M	NaOH
		0,1 % (w/v)	SDS
	DIG-Puffer 1	100 mM	Maleinsäure
		150 mM	NaCl
			pH 7,5
	DIG-Puffer 1a	100 mM	Maleinsäure
		150 mM	NaCl
		0,3 % (v/v)	Tween-20
			pH 7,5
	DIG-Puffer 2	100 mM	Maleinsäure
		150 mM	NaCl
		10 % (w/v)	Blockingreagenz
			pH 7,5
	(vor dem Autoklavieren 2 h bei 80-90 °C rühren)		
	DIG-Puffer 3	100 mM	Tris/HCl pH 9,5
		100 mM	NaCl

	Blockinglösung	15 ml 135 ml	DIG-Puffer 2 DIG-Puffer 1
Isolation von RNA aus <i>H. volcanii</i>	Spheroblast Solution	800 mM	NaCl
		27 mM	KCl
		15 % (w/v)	Saccharose
		50 mM	Tris/HCl pH 8,2
Northern Blot	20x SSPE-Puffer	175,2 g/L	NaCl
		31,2 g/L	NaH ₂ PO ₄
		9,18 g/L	Na ₂ EDTA*2H ₂ O
			pH 7,4 (NaOH)
	Prähybridisierungslösung	15 ml	20x SSPE
		5 ml	10 % (w/v) SDS
		5 ml	Denhardt's
		50 µl	denatur. Lachssperma-DNA
		ad 50 ml	H ₂ O _{bidest}
	Hybridisierungslösung	50 ml	Prähybridisierungslösung
		1 ml	gereinigte Sonde
	Waschpuffer	6x	SSPE
		0,1 % (w/v)	SDS
	Stripping Puffer	0,1 % (w/v)	SDS
Nukleinsäure- Elektrophorese	Agarosegele	0,8 %/1,5 %	Agarose (w/v)
			in 1x TAE-Puffer
		12 nl/ml	Ethidiumbromid
	50x TAE	2 M	Tris
		5,71 % (v/v)	Essigsäure
		50 mM	Na ₂ -EDTA pH 8,0
	5x Agarose-Ladepuffer	50 % (w/v)	Glycerin in 1x TAE
		Spatelspitze	Bromphenolblau/ Xylencyanol
	8 % PAA-Gellösung	100 ml	Rotiphorese Gel 40 (19:1)
		50 ml	10x Sequenzpuffer
		210 g	Harnstoff
		ad 500 ml	H ₂ O _{bidest}
		=> sterilfiltriert und entgast	

	12 % PAA-Gellösung	150 ml 50 ml 210 g ad 500 ml => sterilfiltriert und entgast	Rotiphorese Gel 40 (19:1) 10x Sequenzpuffer Harnstoff H ₂ O _{bidest}
	PAA-Gel	15 ml 150 µl 15 µl	PAA-Gellösung (8 %/12 %) APS (10% (w/v) in H ₂ O _{bidest}) TEMED
	10x Sequenzpuffer	500 mM 500 mM 10 mM	Tris/HCl pH 8,5 Borsäure EDTA
	3x PAA-Ladepuffer	9,8 ml 0,2 ml Spatelspitze	Formamid, deionisiert 10 mM EDTA pH 8 Bromphenolblau/ Xylencyanol
	RNA-Elutionspuffer	500 mM 100 nM 0,1 % (w/v)	NH ₄ OAc EDTA SDS pH 5,5
Zellextrakte <i>H. volcanii</i>	10x PBS	80 g/L 2 g/L 17,8 g/L 2,4 g/L	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O KH ₂ PO ₄
	angereichertes PBS	2,5 M 150 mM 1x	NaCl MgCl ₂ PBS
	Lysepuffer	100 mM 10 mM 12,5 µl/ml 8,3 µl/ml 12,5 µl/ml 1,25 µl/ml	Tris/HCl pH 7,5 EDTA Protease-Inhibitor-Cocktail DNase RQ1 1 M MgCl ₂ 1 M CaCl ₂
Zellextrakte <i>E. coli</i>	Binde-Wasch-Puffer	20 mM 150 mM	Tris/HCl pH 7,5 NaCl
	Binde-Wasch-Puffer+Urea	8 M 20 mM 150 mM	Harnstoff Tris/HCl pH 7,5 NaCl

Proteinreinigung	Flag-Waschpuffer	50 mM 150 mM	Tris/HCl pH 7,4 NaCl
	Flag-Regenerationslösung	100 mM	Glycin pH 3,5
	Flag-Aufbewahrungslösung	50 % (v/v) 1x	Glycerin PBS
	His-Lyse/Equi-Puffer	50 mM 500 mM 10 mM	NaH ₂ PO ₄ pH 8 NaCl Imidazol
	His-Waschpuffer	50 mM 500 mM 20 mM	NaH ₂ PO ₄ pH 8 NaCl Imidazol
	His-Elutionspuffer	50 mM 500 mM 20 mM	NaH ₂ PO ₄ pH 8 NaCl Imidazol
<i>in vitro</i> Prozessierung	10x ivp-Puffer A	200 mM 1 mM 50 mM 10 mM 10 mM	Tris/HCl pH 8 ZnCl ₂ MgCl ₂ KCl DTT
	10x ivp-Puffer B	500 mM 50 mM 600 mM 10 mM	MES pH 5,5 MgCl ₂ KCl DTT
	10x ivp-Puffer C	500 mM 200 mM 10 mM	MES pH 6,5 MgCl ₂ DTT
	10x ivp-Puffer Cla	500 mM 50 mM 50 mM	Tris/HCl pH 7,5 KCl MgCl ₂
EMSA	10x Bindepuffer	500 mM 50 mM 50 mM 100 µg/ml (50 % (v/v))	Tris/HCl pH 7 KCl MgCl ₂ BSA Glycerin)

Protein-Gel-Elektrophorese	10 % Gellösung (nativ)	5 ml 4ml ad 20 ml 20 µl 200 µl	40% AA/B-AA(30:1) 5x TG-Puffer H ₂ O _{bidest} TEMED APS
	5xTG Puffer	50 mM 290 mM	Tris/HCl pH 8 Glycin
	EMSA Ladepuffer	50 % (v/v) Spatelspitze	Glycerin Bromphenolblau
	LT _{2x} -Puffer	1,5 M 0,2 % (w/v)	Tris/HCl pH 8,5 SDS
	UT _{4x} -Puffer	0,5 M 0,4 % (w/v)	Tris/HCl pH 6,8 SDS
	Trenngel 10 %	10 ml 20 ml 10 ml 400 µl 40 µl	Rotiphorese Gel 40 LT _{2x} H ₂ O _{bidest} 10 % (w/v) APS TEMED
	Sammelgel 4 %	2 ml 5 ml 13 ml 200 µl 20 µl	Rotiphorese Gel 40 UT _{4x} H ₂ O _{bidest} 10 % (w/v) APS TEMED
	10x SDS-Laufpuffer	250 mM 1 % (w/v) 1,92 M	Tris/HCl pH 8,5 SDS Glycin
	2x SDS-Ladepuffer	25 % (v/v) 4 % (w/v) 20 % (w/v) 10 % (v/v) Spatelspitze	LT _{2x} -Puffer SDS Glycerin 1M DTT Bromphenolblau
	Coomassie-Färbung Coomassie-Färbelösung	80 mg/L 35 mM	Coomassie Brilliant Blue G-250 HCl
	Ponceau-Färbung Ponceau-Färbelösung	0,1 % (w/v) 5 % (v/v)	Ponceau S Essigsäure

Silberfärbung	Fixierungslösung	30 % (v/v) 12 % (v/v)	Ethanol Essigsäure
	Waschlösung	50 % (v/v)	Ethanol
	Natriumthiosulfatlösung	0,2 mg/ml	Na ₂ S ₂ O ₃
	Silberlösung	2 mg/ml 0,75 µl/ml	AgNO ₃ 37 % Formaldehyd
	Entwicklungslösung	60 mg/ml 0,5 µl/ml 4 µg/ml	Na ₂ CO ₃ 37 % Formaldehyd Na ₂ S ₂ O ₃
	Stopplösungen	10 % bzw. 1% (v/v)	Essigsäure
Western Blot	Transferpuffer	20 mM	Tris
		150 mM	Glycin
		20 % (v/v)	Methanol
Antikörper-Detektion	10x TTBS	100 m M	Tris/HCl pH 7,4
		1 % (w/v)	TWEEN-20
		1,5 M	NaCl
	Blockinglösung	5 % (w/v)	Magermilchpulver in 1x TTBS
Chemilumineszenz	Lösung I	1 ml 100 µl 44 µl ad 10 ml	1 M Tris/HCl pH 8,5 250 mM Luminol 100 mM Cumarsäure H ₂ O _{bidest}
	Lösung II	1 ml 6,5 µl ad 10 ml	1 M Tris/HCl pH 8,5 H ₂ O ₂ H ₂ O _{bidest}

2.14. Laborausstattung

Autoklavenband		Roth
Blotting	SE300 MiniVE compete Blotkammer	Hoefer
	Trans Blot Cell	Biorad
	Roti NC Nitrozellulosemembran	Roth
	Hybond N ⁺ Nylonmembran	Amersham
	3 MM Whatman Chromatography Paper	Schleicher&Schüll

Elektrophoresezubehör

Agarosegele	Kammer, Gießschlitten, Kämme	Werkstatt Universität Ulm
SDS-PAGE	Gießstand für 5 Acrylamidgele Glasplatten (10 x 10,5 cm), Abstandhalter, Probenkämme Mighty Small II SE 259 Cell Gelkammer	Hoefer Hoefer Hoefer
Harnstoffgele	Glasplatten, Abstandshalter, Kämme, Gelkammer	Werkstatt Universität Ulm
Elektroporationsküvetten	my-Budget 2mm Küvetten	BioBudget
Filme	Amersham Hyperfilm MP	GE Healthcare
Filter	Sterilfilter Rotilabo (0,22/0,45 µm) Zentrifugenfilter SpinX	Roth Costar
Geltrocknungsfolie	precut cellophane sheets	Amersham
Glaswaren	Erlenmeyerkolben, div. Größen Bechergläser div. Größen Glasflaschen div. Größen	Schott Schott Schott
Messzylinder	100, 250, 500, 1000 ml	VitLab
Phosphoimaging	BAS-MS imaging plate	FujiFilm
Plastikwaren	sterile Röhrchen mit/ohne Deckel Falcons (15 und 50 ml) Reaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2 ml) Pipettenspitzen (blau, gelb, weiß) Multiply-µStrip 0,2 ml Kette Küvetten Petrischalen Spritzen div. Größen Entsorgungsbeutel	Sarstedt Sarstedt Sarstedt Sarstedt Sarstedt Sarstedt Sarstedt Braun Roth
Säulen	Poly Prep Chromatography Columns	Biorad
Zentrifugenbecher	diverse Zentrifugenbecher für JA-Rotoren	Beckman

2.15. Geräte

Bidestille	Destamat Bi 18E	Heraeus
Elektroporation	<i>E. coli</i> pulser	BioRad
Filmentwickler	Cawomat 2000 IR	Cawo
Folienschweißgeräte	Folio / FIF	Severin/FIF
Geldokumentation	Gene Flash	Syngene Bio Imaging
Gelfiltration	Äkta Purifier	GE Healthcare
Geltrockner	DrygelSr. SE1160	Hoefer
Heizblöcke	Dri-Block DB3 Thermomixer 5436 Test Tube Heater SHT 1D	Techne Eppendorf Stuart Scientific
Heiz/Magnetrührer	RCT basic VMS-A	IKA VWR
Massenspektrometrie	Orbitrap XL	ThermoFisherScientific
Mikrowelle	Intellrowave Mikrowelle	LG Bosch
Netzgeräte	Electrophoresis Power Supply EPS 3500 Electrophoresis Power Supply EPS 301 PowerPac Basic Model 200/2.0 Power Supply	Pharmacia Amersham Biorad Biorad
pH-Messung	Φ 10 pH-Meter Lab850	Beckman Schott
Phosphoimaging	Fluoreszent Image Analyzer FLA3000	FujiFilm
Photometrie	Genesys 10uv Nanophotometer Qubit Fluorometer	Thermo Implen Invitrogen
Pipetten	Pipetman Labmate	Gilson Abimed
Polymerasekettenreaktion	PCT 100 Robocycler Gradient 96	MJ Research Stratagene

Schüttler	Polymax 1040 KS 250 bzw. 260 basic RSU-310R	Heidolph IKA Boru
Sterilisation	Dampfsterilisator Typ EH/ Typ H+P Dampfsterilisator Typ VE-75	Varioklav Systec
Ultraschall	Sonifier 250	Branson
UV-Crosslinker	UV Stratalinker 1800	Stratagene
Vortexer	Vortex-Genie2	Scientific Industries
Waagen	SI 2002° Feinwaage	Denver Instruments Sartorius Research
Wärme/Schüttelschränke	3032	GFL
Wasserbäder	Wasserbad Thermocycler60	Memmert Bio-Med
Zellanzucht		
Schüttler	Incubator Shaker Model G25 Innova 43 3020 (RT)	New Brunswick Eppendorf GFL
Inkubatoren	Kelvitron-t (37°C) Brutschrank(45°C)	Heraeus Memmert
Zentrifugen & Rotoren	J2-21 M/E, J2-HC, J2-MC, Avanti J-E + Rotoren JA 10.5, JA 14, JA 20	Beckman
	Tischzentrifuge 5424 + Rotor FA-45-24-11	Eppendorf
	Tischzentrifuge Mikro 120 + Rotor 1224	Hettich
	Tischzentrifuge Spectrafuge 24D	Labnet
	Kühlzentrifuge GS-15R + Rotor F3602	Beckman
	Microfuge 22R + Rotor F241.5P	Beckman
	Allegra-25R + Rotor TS-5.1-500	Beckman

2.16. Software

Untersuchung von Proteinsequenzen	Phyre ² Protein Fold Recognition Server*	Structural Bioinformat. Group
	ClustalW Server**	Swiss Institute of Bioinformatics
	Conserved Domain Database***	National Center of Biotechnology Information
Quantifizierung	Pymol 1.6	DeLano Scientific
	BASreader 3.14	FujiFilm
	AIDA Image Analyzer	FujiFilm
	Image J ****	National Institute of Health
Massen-spektrometrie	MASCOT*****	Matrix Science
Äkta Purifier	Unicorn 4.12	GE Healthcare

* <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> (KELLEY & STERNBERG, 2009)

** <http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>

*** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml> (MARCHLER-BAUER *ET AL.*, 2011)

**** (SCHNEIDER *ET AL.*, 2012)

***** (KOENIG *ET AL.*, 2008)

3. METHODEN

3.1. Standardmethoden

Folgende molekularbiologische und biochemische Standardmethoden, die im Laufe dieser Arbeit zur Anwendung kamen, sind nicht näher beschrieben und können beispielweise in „Molecular Cloning - A LABORATORY MANUAL“ (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) nachgelesen werden. Bei Verwendung von Kits wurde den Angaben des Herstellers gefolgt.

- Polymerasekettenreaktion
- Klonierung
- Ligation
- Reinigung und Quantifizierung von Nukleinsäuren
- Restriktionsendonuklease-Verdau von Nukleinsäuren
- Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung von Nukleinsäuren
- Separation von Nukleinsäuren (Agarose-, Polyacrylamidgelelektrophorese)
- DNA-Sequenzierung
- Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation
- Blau/Weiß-Selektion
- Separation von Proteinen (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
- Western Blot auf Nitrozellulosemembranen
- Quantifizierung von Proteinen

3.2. Herstellung der Plasmidkonstrukte

3.2.1. Herstellung von Antikörpern

Um Antigene für die Immunisierung von Mäusen zu gewinnen, wurden die jeweiligen Cas-Proteine rekombinant in *E. coli* überproduziert. Dazu wurden die entsprechenden *cas*-Gene in pET-Überexpressionsplasmide kloniert, wobei bei der Wahl der Klonierungsschnittstellen darauf geachtet wurde, dass das spätere Protein keinen Affinitäts-Tag aufweist. Für das Konstrukt pET30a-*cas6* wurde das Gen mit Hilfe der Oligonukleotide Cas6FlagCup und Cas6FlagNdo amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *EcoRI* verdaut und in den Vektor pET30a ligiert, welcher mit denselben Enzymen geschnitten wurde. Für das Konstrukt pET29a-*cas5* wurde das Insert mit den Oligonukleotiden Cas5FlagCup und Cas5FlagNdo amplifiziert und ebenfalls über die Schnittstellen *NdeI* und *EcoRI* in den Vektor pET29a kloniert. Für die Amplifikation des *cas7*-Gens wurden die Oligonukleotide 5-Csh2-*NdeI* und 3-Csh2-*NotI* verwendet. Die Klonierung in den Vektor pET29a erfolgte über die Schnittstellen *NdeI* und *NotI*.

3.2.2. Komplementationskonstrukte

Für die Komplementation des Stammes H26 Δ *cas*(28) mit verschiedenen *cas*-Genen wurden insgesamt zehn Konstrukte hergestellt. Dabei wurden die jeweiligen Inserts über die Klonierung mit dem Restriktionsenzym *Nde*I in den Expressionsvektor pTA927 unter die Kontrolle des Tryptophan-induzierbaren Promotors *P.tnaA* gestellt. Die Inserts wurden durch PCR-Reaktionen mit Hilfe von Oligonukleotiden, welche die entsprechenden Restriktions-schnittstellen enthalten, und genomischer DNA verschiedener Stämme als Matrize hergestellt. Die entstandenen Produkte wurden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut und in den Vektor pTA927 ligiert, welcher mit denselben Enzymen linearisiert wurde. Im Falle des Konstrukts pTA927-*cas*65 wurden zwei Inserts getrennt amplifiziert, verdaut und in einer Ligationsreaktion zusammen in den Vektor eingebracht. Die jeweils verwendeten Oligonukleotide, Matrizen und Klonierungsschnittstellen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

Konstrukt pTA927-...	Oligonukleotide	Matrizen-Stamm (genom. DNA)	Klonierungs-schnittstellen
<i>cas</i> 68	Cas6FlagCup/3-Cas8-NcoIBamHI	H119	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI
<i>cas</i> 67	Cas6FlagCup/3-Csh2-HindIII	H119 Δ <i>cas</i> 8*	<i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III
<i>cas</i> 65	Cas6FlagCup/3-Cas6HindIII Cas5FlagNup/3-Cas5BamHI	H119 H119	<i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III <i>Hind</i> III/ <i>Bam</i> HI
<i>cas</i> 87	5-Cas8-NdeI/3-Csh2-HindIII	H119	<i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III
<i>cas</i> 85	5-Cas8-NdeI/3-Cas5-BamHI	H119 Δ <i>cas</i> 7*	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI
<i>cas</i> 75	5-Csh2-NdeI/3-Cas5-BamHI	H119	<i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> RV
<i>cas</i> 675	Cas6FlagCup/3-Cas5-BamHI	H119 Δ <i>cas</i> 8*	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI
<i>cas</i> 685	Cas6FlagCup/3-Cas5-BamHI	H119 Δ <i>cas</i> 7*	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI
<i>cas</i> 687	Cas6FlagCup/3-Csh2-HindIII	H119	<i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III
<i>cas</i> 6875	Cas6FlagCup/3-Cas5-BamHI	H119	<i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> HI

Tabelle 3.1: Klonierungsdetails zur Herstellung der Komplementationskonstrukte pTA927-*cas*X. In Spalte zwei sind die jeweils für die Herstellung der Inserts verwendeten Oligonukleotide angegeben. Genomische DNA der in Spalte drei angegebenen Stämme diente dabei als Matrize. Sowohl die Inserts als auch der Vektor pTA927 wurden mit der in Spalte vier angegebenen Restriktionsenzymen verdaut und ligiert. Im Falle des Konstrukts pTA927-*cas*65 wurden die zwei mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnittenen Inserts gleichzeitig in den mit *Nde*I und *Bam*HI verdauten Vektor ligiert.

3.2.3. Integrative Plasmide für die Knockouts von *cas*-Genen

Um Bereiche des *cas*-Operons aus dem Genom von *H. volcanii* mit Hilfe der Pop-in/Pop-out Methode zu entfernen, wurden sechs verschiedene Konstrukte hergestellt. Dabei wurden jeweils die entsprechenden flankierenden Bereiche nacheinander in den integrativen Vektor pTA131 eingebracht. Für die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der Inserts wurde

genomische DNA des *H. volcanii*-Stamms H119 als Matrize eingesetzt. Im Falle der Konstrukte pTA131-up5do2 und pTA131-up3do2 wurde dabei zunächst das Insert do2 mit Hilfe der Oligonukleotide iCas2KOdo und Cas2KOdoBamHI amplifiziert und das Produkt mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut. Der Vektor pTA131 wurde mit den Enzymen *Bam*HI und *Sma*I verdaut mit dem Insert do2 ligiert. Das entstandene Konstrukt wurde mit den Enzymen *Hind*III und *Eco*RV linearisiert und die Inserts up5 bzw. up3 einkloniert. Diese wurden mit Hilfe der Oligonukleotide 5-Cas7-*Hind*III und iCas5KOup (up5) bzw. Cas5FlagNup und iCas3KOup (up3) amplifiziert und die Produkte mit *Hind*III verdaut. Für das Konstrukt pTA131-up7do2 wurde das Konstrukt pTA131-up3do2 mit *Eco*RI verdaut, wodurch die up3-Region und ca. 190 Nukleotide der do2-Region aus dem Konstrukt geschnitten wurden. Die Enden des linearisierten Vektors wurden durch Behandlung mit der Pfu-Polymerase geglättet. Das Insert up7 wurde mit Hilfe der Oligonukleotide IPCas6KOdo und IPCsh2KOup hergestellt, über glatte Enden einkloniert und ein Klon ausgewählt, der das Insert in der korrekten Orientierung integriert hat. Für die Konstrukte pTA131-up8do7 und pTA131-up6do8 wurden zuerst die up8-Region mit Hilfe der Oligonukleotide Cas6FlagNup und IPCsh1KOup2 bzw. die do8-Region mit der Oligonukleotiden IPCsh1KOdo/3-Csh2-*Hind*III hergestellt, mit dem Restriktionsenzym *Hind*III verdaut und in den Vektor pTA131 kloniert, welcher mit den Enzymen *Hind*III und *Eco*RV linearisiert wurde. Diese Konstrukte wurden jeweils mit *Bam*HI aufgeschnitten, die Enden durch Behandlung mit der Pfu-Polymerase geglättet, die weiteren Inserts über glatte Enden ligiert und Klone ausgewählt, welche das jeweilige Insert in der korrekten Orientierung integriert haben. Für die Amplifikation des

Konstrukt pTA131-...	Klonierungsschritte	Oligonukleotide zur Synthese des Inserts	Klonierungs-Schnittstelle(n)	Größe des Inserts [Bp]
up5do2	1. do2 2. up5	iCas2KOdo/Cas2KOdoBamHI 5-Cas7- <i>Hind</i> III/iCas5KOup	<i>Bam</i> HI/ <i>Sma</i> I <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RV	989 1033
up3do2	1. do2 2. up3	iCas2KOdo/Cas2KOdoBamHI Cas5FlagNup/iCas3KOup	<i>Bam</i> HI/ <i>Sma</i> I <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RV	989 822
up8do7	1. up8 2. do7	Cas6FlagNup/IPCsh1KOup2 IPCsh2KOdo/Csh2KOdo	<i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RV <i>Bam</i> HI/glatt	818 571
up6do8	1. do8 2. up6	IPCsh1KOdo/3-Csh2- <i>Hind</i> III Cas6KOup/IPCas6KOup	<i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RV <i>Bam</i> HI/glatt	1043 521
up7do2	1. do2' 2. up7	iCas2KOdo/Cas2KOdoBamHI IPCas6KOdo/IPCsh2KOup	<i>Bam</i> HI/ <i>Sma</i> I <i>Eco</i> RI (glatt)	804 2173
up6do6*		-	-	-

Tabelle 3.2: Klonierungsschema für die Herstellung der integrativen Plasmide. In Spalte 2 ist jeweils angegeben, in welcher Reihenfolge die Inserts in den Vektor pTA131 einkloniert wurden. In Spalte zwei sind die für die Synthese des Inserts verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. In Spalte drei ist angegeben, mit Hilfe welcher Restriktionsenzyme die jeweilige Klonierung durchgeführt wurde. Dabei wurden sowohl das Insert als auch der Vektor mit beiden Enzymen verdaut. Im Falle der Verwendung von *Eco*RV wurde lediglich der Vektor verdaut und das PCR-Produkt direkt über glatte Enden ligiert. In Spalte vier ist die Größe des Inserts in Basenpaaren angegeben. Das Konstrukt pTA131-up6do6 wurde von Frau Britta Stoll hergestellt (STOLL, 2013).

do7-Inserts wurden die Oligonukleotide IPCsh2KOdo und Csh2KOdo verwendet, für das up6-Insert die Oligonukleotide Cas6KOup und IPCas6KOup. Das Konstrukt pTA131-up6do6 wurde von Frau Britta Stoll hergestellt (STOLL, 2013). Eine Übersicht der Klonierungsstrategie ist in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

3.2.4. Integratives Plasmid für den Knockout von *cas5*

Zur Herstellung des integrativen Vektors pTA131-up5do5 wurde das zu entfernende *cas5*-Gen inklusive von ca. 500 Basenpaaren stromaufwärts und stromabwärts durch PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden Cas5KOup und Cas5KOdo amplifiziert und in den mit *EcoRV* linearisierten Vektor pTA131 ligiert. Durch eine inverse PCR mit den Oligonukleotiden iCas5KOup und iCas5KOdo wurde der Vektor inklusive der flankierenden Regionen amplifiziert und das entstandene Produkt religiert. Das erhaltene Konstrukt wurde durch Sequenzierung untersucht. Dabei ergab sich, dass bei der flankierenden Region stromaufwärts ein Nukleotid fehlt. Daraus folgt, dass bei der Erstellung des Knockouts nicht nur der offene Leserahmen von *cas5*, sondern zusätzlich ein Nukleotid stromaufwärts des Startcodons entfernt wird. Da jedoch zum Stopcodon des stromaufwärts liegenden Gen *cas7* ein Abstand von 10 Nukleotiden besteht, ist dieses davon nicht betroffen.

3.2.5. Reinigung von Cas-Protein-Komplexen

Es wurden insgesamt sechs Konstrukte verwendet, um die *cas*-Gene *cas5*, *cas6*, *cas7* und *cas8* auf einem Plasmid in *H. volcanii* einzubringen, wobei jeweils eines mit einem Affinitäts-Tag versehen wurde. Für das Konstrukt pTA927-(Flag)*cas6*875 wurde das Insert durch eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden Cas6FlagNup und 3-Cas5-BamHI durchgeführt und das entstandene Produkt über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *EcoRI* in den Vektor pTA927-Flag (siehe Kapitel 3.2.6.) kloniert. Für das Konstrukt pTA927-*cas6*8(HisFlag)75 wurde zunächst eine PCR mit den Oligonukleotiden FlagSnaBI und Flag2 durchgeführt, das entstandene Produkt mit den Restriktionsenzymen *SnaBI* und *HindIII* verdaut und in den Vektor pCDF1b ligiert, welcher mit *PmII* und *HindIII* linearisiert wurde. Dieses Konstrukt wurde mit *XhoI* linearisiert, die Enden mit der Pfu-Polymerase geglättet und danach mit *HindIII* verdaut. Durch eine PCR mit den Oligonukleotiden 5-Cas7-HindIII und 3-Cas5-BamHI wurde das Insert *cas7*5 amplifiziert, das Produkt mit *HindIII* verdaut und in pCDF1b-Flag ligiert. Das entstandene Konstrukt pCDF1b-(Flag)*cas7*5 diente als Matrize für die PCR mit den Oligonukleotiden HisFlagBamHI und 3-Cas5-XbaI, um das Insert HisFlag*cas7*5 zu amplifizieren. Mit Hilfe der Oligonukleotide Cas6FlagCup und 3-Cas8-NcoIBamHI wurde das Insert *cas6*8 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* in den Vektor pTA927 eingebracht. Dieses Konstrukt, ebenso wie das Insert HisFlag*cas7*5, wurde mit den Enzymen *BamHI* und *XbaI* verdaut, das Insert in den Vektor ligiert und so das letztendliche

Konstrukt pTA927-*cas68*(HisFlag)75 erhalten. Für das Konstrukt pTA927-*cas6*(HisFlag)875 wurde zunächst aus dem oben genannten Konstrukt pCDF1b-(Flag)*cas75* das Insert *cas75* mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *BamHI* ausgeschnitten. Stattdessen wurde das Insert *cas687* einkloniert, welches mit den Oligonukleotiden 5-Cas8-*HindIII* und 3-Cas5-*BamHI* amplifiziert und mit denselben Enzymen geschnitten wurde. Dieses Konstrukt diente als Matrize für die PCR mit den Oligonukleotiden HisFlag*BamHI* und 3-Cas5-*XbaI* zur Herstellung des Inserts HisFlag*cas875*. Mit den Oligos Cas6FlagCup und 3-Cas6-*BamHI* wurde das *cas6*-Gen amplifiziert und über die Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* in den Vektor pTA927 kloniert. Dieses Konstrukt wurde mit den Enzymen *BamHI* und *XbaI* linearisiert und das ebenfalls mit diesen Enzymen verdauete Insert HisFlag*cas875* eingebracht, was zum letztendlichen Konstrukt pTA927-*cas6*(HisFlag)875 führte. Für das Konstrukt pTA927-*cas5*FlagN wurde das *cas5*-Gen mit Hilfe der Oligonukleotide Cas5FagNup und Cas5FlagNdo amplifiziert und über die Schnittstellen *HindIII* und *EcoRI* in den Vektor pTA927-Flag (siehe oben) einkloniert. Für das Konstrukt pTA352-*cas687* wurde aus dem Konstrukt pTA927-*cas687* (siehe 4.2.1.) das Insert *cas687* inklusive des stromaufwärts liegenden *P.tnaA*-Promotors mit den Enzymen *ApaI* und *BamHI* ausgeschnitten und über diese Schnittstellen in den Vektor pTA352 eingebracht.

3.2.6. Mutationsanalyse von HvoCas6

Als Basis für die Herstellung der Konstrukte wurde das *cas6*-Gen in den Klonierungsvektor pBlue eingebracht. Dazu erfolgte die Amplifikation des Gens durch PCR mit Hilfe der Oligonukleotide Cas6FlagNup und Cas6FlagNdo und genomischer DNA des *H. volcanii*-Stammes H119 als Matrize. Das erhaltene Produkt wurde in den Vektor pBlue ligiert, welcher mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* linearisiert wurde. Die jeweiligen Mutationen wurden über Oligonukleotide erreicht, in denen das entsprechende Basentriplett durch das Basentriplett für Alanin ersetzt wurde (siehe Kapitel 2.3.). Dabei wurden zwei Strategien verfolgt. Für einen Teil der Mutanten wurde das QuikChange II Site-directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) entsprechend der Herstellervorgaben unter Verwendung der jeweiligen Oligonukleotide und des pBlue-*cas6*-Konstrukts als Matrize angewendet. Für den anderen Teil wurde eine inverse PCR mit phosphorylierten Oligonukleotiden und pBlue-*cas6* als Matrize durchgeführt und das erhaltene Produkt religiert. Aus den so letztendlich in beiden Fällen erhaltenen pBlue-*cas6*mut-Konstrukten wurden die jeweiligen mutierten *cas6*-Gene durch Verdau mit *HindIII* und *EcoRI* ausgeschnitten und in den linearisierten Vektor pTA927-Flag ligiert. Dieser wurde erhalten, indem aus einem bereits bestehenden Konstrukt, welches das *cas1*-Gen mit einem N-terminal fusionierten FLAG-Peptid enthält (DIEROLF, 2010), das *cas1*-Insert durch Verdau mit *HindIII* und *EcoRI* entfernt wurde. Für das Konstrukt mit dem nicht-mutierten *cas6*-Gen wurde dieses aus dem Konstrukt pBlue-*cas6* (siehe oben) mit *HindIII* und *EcoRI* ausgeschnitten und ebenfalls in pTA927-Flag ligiert. Die letztendlich erhaltenen Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

3.2.7. Reinigung von HvoCas6

Für das Konstrukt pET30a-*cas6*(H) wurde die Sequenz des *cas6*-Gens aus *H. volcanii* an die Expression in *E. coli* angepasst. Das Gen wurde von der Firma GeneArt inklusive der entsprechenden Klonierungsschnittstellen synthetisiert. Das Gen wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NcoI* und *XhoI* aus dem ursprünglichen Vektor herausgeschnitten und in den Vektor pET30a ligiert, welcher mit denselben Enzymen linearisiert wurde. Für das Konstrukt pET30a-*cas6*(ohneStop) wurde das *cas6*-Gen ohne Stopcodon mit Hilfe der Oligonukleotide 5-Cas6-*NcoI* und 3-Cas6-*HindIII*.Stop amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *HindIII* in den Vektor pET30a ligiert. Das Konstrukt pET30a-*cas6*-FlagN wurde hergestellt, indem das *cas6*-Gen inklusive der Sequenz für den N-terminalen FLAG-Tag mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *EcoRI* aus dem Konstrukt pTA927-*cas6*-FlagN (siehe Kapitel 3.2.6.) ausgeschnitten und in den Vektor pET30a ligiert wurde, welcher mit denselben Enzymen linearisiert wurde. Für die Herstellung des Konstrukts pTA963-*cas6* wurde das *cas6*-Gen mit Hilfe der Oligonukleotide 5-Cas6-*PciI* und 3-Cas6-*NotI* amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *PciI* und *NotI* verdaut und in den Vektor pTA963 ligiert, welcher mit denselben Enzymen geschnitten wurde. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

3.2.8. Herstellung von crRNA-Vorläufern

Zur Herstellung des Konstrukts TOPO-P2-4S3R wurde der Bereich vom ersten bis zum vierten Spacer des Locus P2 mit Hilfe der Oligonukleotide P2-Sp1-4 und P2-Sp4 und genomischer DNA des Wildtyps H119 als Matrize amplifiziert und direkt über glatte Enden in den Vektor pCR-BluntII-TOPO eingebracht. Das Konstrukt wurde durch Sequenzierung überprüft.

3.2.9. Reinigung von ClaCas6 aus *E. coli*

Für die Überproduktion von Cas6 aus *C. lactoaceticus* wurde die Sequenz für das Gen Calla_2409 an die Expression in *E. coli* angepasst. Das synthetische Gen wurde von der Firma Life Technologies inklusive der Klonierungsschnittstellen synthetisiert und in den Vektor pMA kloniert. Das Gen wurde mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* aus diesem Vektor ausgeschnitten und in den Vektor pET28a ligiert, welcher mit denselben Enzymen verdaut wurde. Das so erhaltene Konstrukt pET28a-*callacas6* wurde durch Sequenzierung überprüft.

3.3. Herstellung von spezifischen Antikörpern

3.3.1. Überproduktion von Proteinen in *E. coli*

Um ein Protein in *E. coli* überzuproduzieren, wurde das entsprechende Gen zunächst in einen Überexpressionsvektor kloniert. In dieser Arbeit wurde hierfür die Vektoren der pET-Reihe der Firma Novagen verwendet. Das inklonierte Gen wird dabei unter die Kontrolle des *T7*-Promotors gestellt. Eine Transkription findet erst statt, wenn die dazu passende Polymerase, die *T7*-RNA-Polymerase, exprimiert wird. Es wird daher ein spezieller Überexpressions-Stamm von *E. coli* verwendet, bei welchem das Gen für diese Polymerase unter der Kontrolle von induzierbaren Promotoren gestellt ist. In diesem Fall wurde der *E. coli*-Stamm BL21AI verwendet, bei welchem die Expression durch Zugabe von IPTG und Arabinose induziert werden kann. Zunächst wurden elektrokompente Zellen des BL21AI-Stamms mit 25 ng Plasmid-DNA transformiert. Eine Vorkultur von 50 ml 2xYT+Kan-Flüssigmedium wurde mit 100 µl des Transformationsansatzes inokuliert. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Am nächsten Tag wurde mit Hilfe der Vorkultur eine Hauptkultur in 2xYT+Kan-Flüssigmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C geschüttelt, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 erreicht hatte, sich also in der logarithmischen Wachstumsphase befand. Dann wurde die Expression des Gens durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) und Arabinose (Endkonzentration 2 mg/ml) induziert. Die Kultur wurde danach drei bis vier Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation (5000 rpm, 5 min, RT, JA10/JA14) geerntet. Zellpellets wurden bei Bedarf mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

3.3.2. Herstellung von Harnstoff-Zellextrakten aus *E. coli*

Um Antigen für die Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen verschiedene Cas-Proteine zu gewinnen, wurden Extrakte aus Einschlusskörperchen hergestellt. Dazu wurden die Zellen einer Überexpressionskultur (siehe Kapitel 3.3.1.) von 50 ml Volumen zunächst geerntet (5000 rpm, 5 min, RT, JA14), durch Resuspendieren in 50 ml Binde-Wasch-Puffer und erneutem Ernten gewaschen und letztendlich in 1 ml Binde-Wasch-Puffer resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren und um die genomische DNA zu zerstören folgte eine Ultraschallbehandlung von sechs Mal 30 Sekunden, wobei zwischen jeder Beschallung eine Inkubation von mindestens 30 Sekunden auf Eis erfolgte, um ein Überhitzen der Lösung und damit die Gefahr der Proteindenaturierung zu vermeiden (Einstellungen des Ultraschallgeräts: Duty cycle: constant, Output: 25 %). Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation pelletiert (12 krpm, 20 min, 4 °C, JA20). Das Pellet, welches die Einschlusskörperchen enthält, wurde durch lösen in 1 ml Binde-Wasch-Puffer mit Hilfe erneuter Ultraschallbehandlung und anschließendem pelletieren (siehe oben) zweimal gewaschen. Um die

Proteine aus den Einschlusskörperchen zu lösen, wurde das Pellet in 1 ml Binde-Wasch-Puffer+Urea aufgenommen und eine Stunde auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (12 krpm, 10 min, 4 °C, JA20) wurden zurückgebliebene, unlösliche Bestandteile abgetrennt und der lösliche Harnstoff-Zellextrakt abgenommen. Dieser wurde nach Schockgefrieren durch flüssigen Stickstoff bei -80 °C gelagert.

3.3.3. Gewinnung von spezifischen Antikörpern aus Mäusen

Um Antigen für die Immunisierung von Mäusen zu gewinnen, wurden zunächst Harnstoff-extrakte der entsprechenden Cas-Proteine anhand von 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch Western Blotting auf eine Nitro-zellulosemembran übertragen. Die Proteinbanden wurden durch Färbung mit PonceauS auf der Membran sichtbar gemacht. Mit Hilfe eines Skalpells wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten. Die Nitrozellulose-Stücke wurden durch Inkubation bei 60 °C in DMSO gelöst, wobei so wenig Volumen wie möglich eingesetzt wurde.

Vor der Immunisierung der Mäuse (Stamm Balb/c) wurden je ca. 200 µl Blut entnommen. Durch subkutane Injektion von 100 µl Antigen-Lösung wurde eine erste Immunisierung vorgenommen. Nach zwei Wochen erfolgte eine erneute Injektion von 100 µl Antigen-Lösung (Boost). Nach weiteren zwei Wochen wurden die Tiere getötet und ausgeblutet. Die Injektionen, Blutentnahmen sowie die fachgerechte Tötung der Tiere wurde von von Frau Dr. med. vet. Christina Sand, approbierte Tierärztin und Mitarbeiterin des Tierforschungszentrums der Universität Ulm, durchgeführt. Die fachgerechte Haltung und Pflege der Tiere erfolgte in speziellen Tierhaltungsbereichen des Tierforschungszentrums der Universität Ulm unter Betreuung durch ausgewiesene Versuchstierpfleger. Eine Genehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen gemäß § 10a des Tierschutzgesetzes lag vor (siehe Anhang 8.6.).

Zur Gewinnung des antikörperhaltigen Serums wurde das entnommene Blut zunächst 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zentrifugation (2000 rpm, 5 min, RT) wurden die Blutkörperchen abgetrennt und der Überstand, welcher dem Blutserum entspricht, abgenommen. Die Seren wurden bei -20 °C gelagert.

3.4. Transformation von *H. volcanii*

Um ein Plasmid in Zellen von *H. volcanii* einzubringen, wurde zunächst eine Flüssigkultur des jeweiligen Stamms im entsprechenden Medium über Nacht auf eine OD₆₅₀ von ca. 0,6 bis 1,2 angezogen. Für einen Transformationsansatz wurden 4 ml Flüssigkultur mit einer OD₆₅₀ von 0,8 verwendet, wobei bei höherer oder niedrigerer OD₆₅₀ die Menge entsprechend angepasst wurde. Bei mehreren Ansätzen bzw. bei Durchführung eines Interferenzttests wurden die Zellen aller Ansätze vereinigt. Die Zellen wurden durch achtminütige Zentrifugation bei

6000 rpm geerntet, in zwei ml Lösung A resuspendiert und erneut geerntet. Das Zellpellet wurde erneut in Lösung A resuspendiert, wobei pro Transformationsansatz 200 µl veranschlagt werden. Im Falle von mehreren Ansätzen wurde die Zellsuspension à 200 µl aliquotiert, wobei sichergestellt wurde, dass in jedem Transformationsansatz dieselbe Menge Zellen vorhanden ist. Zu jedem Ansatz wurden 20 µl 0,5 M EDTA pH 8 gegeben, durch invertieren gemischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe der DNA-Lösung, welche aus 15 µl Lösung B, 5 µl 0,5 M EDTA pH 8 und 1 µg Plasmid-DNA in 10 µl Wasser besteht. Die Plasmid-DNA wurde hierbei aus einem methylierungsdefizienten *E. coli*-Stamm gewonnen, da sie sonst von *H. volcanii* als fremd erkannt und degradiert wird. In diesem Fall wurde der *dam-/dcm*-defiziente *E. coli*-Stamm GM121 verwendet. Nach Zugabe der DNA-Lösung und Mischen durch Invertieren wurde weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 250 µl PEG-Lösung, bestehend aus 150 µl PEG und 100 µl Lösung B, und sorgfältiges Mischen durch wiederholtes Invertieren. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden 1,5 ml Lösung C zugegeben und die Zellen durch Zentrifugation (siehe oben) geerntet. Zu den Zellpellets wurde 1 ml Lösung D gegeben, ohne die Zellen zu resuspendieren, und 1,5 Stunden bei 45 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch einen Vortexmischer resuspendiert und 2,5 Stunden bei 45 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Ansätze erneut geerntet und die Zellpellets mit Hilfe einer 1 ml - Pipette in 500 µl Lösung E resuspendiert. Von dieser Suspension wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt, von diesen jeweils 50 µl auf einem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert und die Platten bei 45 °C inkubiert, bis ein Wachstum von Einzelkolonien zu beobachten war.

3.4.1. Überprüfung von transformierten Stämmen

Für die Herstellung von transformierten Stämmen wurde die unverdünnte Zellsuspension und eine 1:10-Verdünnung auf einem Medium ausplattiert, mit dessen Hilfe auf den Auxotrophie-Marker des jeweiligen Plasmids selektiert werden kann. Beim Einbringen von pTA927-Plasmiden (*pyrE2*-Markergen) wurde Uracil-Mangelmedium (Hv-Ca+Trp) verwendet, beim gleichzeitigen Einbringen von pTA927- und pTA352-Konstrukten (*LeuB*-Markergen) Uracil/Leucin-Mangelmedium (Hv-Min+Trp). Nach dem Wachstum von Kolonien wurde ein Einzelklon anhand von entsprechenden Test-PCRs untersucht, sowie erneut auf Selektionsmedium ausgestrichen. Im Falle der Stämme zur Untersuchung der HvoCas6-Mutanten wurde dabei einerseits eine PCR mit den Oligonukleotiden Cas6KOup und Cas6KOdo durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine Kontamination stattgefunden hat und der genomische Hintergrund tatsächlich $\Delta cas6$ ist. Um die Aufnahme des Plasmids mit den *cas6*-Genen zu verifizieren, wurde desweiteren eine PCR mit den genspezifischen Oligonukleotiden Cas6FlagNup und Cas6FlagNdo durchgeführt. Im Falle der Stämme, in denen verschiedene *cas*-Gene in den Stamm H26 Δcas (28) eingebracht wurden, wurde ebenfalls mit diversen genspezifischen Oligonukleotiden auf die Anwesenheit des Plasmids getestet. Die

Kontrolle des genomischen Hintergrunds Δcas erfolgte mit Hilfe der Oligonukleotide P1Sp1fw und HPAM9P2Sp10.

3.4.2. Interferenztests

Bei der Durchführung von Interferenztests wurden die entsprechenden Kontroll- und Angreiferplasmide durch Transformation (siehe Kapitel 3.4.) in die zu testenden *H. volcanii*-Stämme eingebracht. Dabei wurden vier Transformationsansätze gleichzeitig durchgeführt, wobei jeweils ein Kontrollplasmid (ohne Protospacer und PAM), und zwei Angreiferplasmide (mit Protospacersequenz und jeweils den PAMs TTC und ACT) eingebracht wurden und desweiteren ein Ansatz ohne Plasmidzugabe erfolgte (H₂O-Kontrolle). Nach der Transformation wurden drei Verdünnungen der Zellsuspension hergestellt (1:10, 1:100, 1:1000) und diese jeweils auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert. Beim Test der HvoCas6-Mutationsstämme und der Stämme „6875“+pTA927-cas3-FlagC bzw. „675“+pTA927-cas3-FlagC wurden die Plasmide pTA352 (Kontrollplasmid) und pTA352-PAM3 bzw. -PAM9 (Angreiferplasmide) verwendet und die Ansätze auf Uracil/Leucin-Mangelmedium (Hv-Min+Trp) ausplattiert. Beim Test der Knockout-Stämme wurden die Plasmide pTA409 (Kontrollplasmid) und pTA409-PAM3 bzw. -PAM9 (Angreiferplasmide) verwendet und die Ansätze auf Uracil-Mangelmedium (Hv-Ca+Trp) ausplattiert. Im Falle der Kontrollplasmide wurde jeweils die 1:100- und 1:1000-Verdünnung ausplattiert, bei der Kontrolle ohne Plasmid die unverdünnte Zellsuspension. Im Falle der Ansätze mit den Angreiferplasmiden wurden die 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnungen ausplattiert. Nach dem Wachstum wurde die Anzahl der Kolonien auf denjenigen Platten bestimmt, welche gut zählbare Einzelkolonien aufwiesen und die ermittelten Anzahlen jeweils auf die Zahl der Kolonien pro μg transformierte Plasmid-DNA aufgerechnet. Um die Reduktion der Transformationseffizienz zu berechnen, wurde jeweils der Quotient aus dem Wert des Angreiferplasmids und dem Wert des Kontrollplasmids berechnet. Die Werte von insgesamt vier Transformationsansätzen wurden gemittelt. Bei einem Wert von höchstens 0,01, was einer Reduktion der Transformationseffizienz um mindestens dem Hundertfachen entspricht, wurde eine Interferenzreaktion als erfolgreich definiert.

3.5. Herstellung von Knockout-Stämmen

Um bestimmte Bereiche aus dem Genom von *H. volcanii* zu entfernen, wurde die Pop-in/Pop-out-Methode nach Allers & Ngo angewendet (ALLERS&NGO, 2003). Dazu wird der entsprechende Stamm mit dem jeweiligen integrativen Plasmid transformiert (siehe Kapitel 3.4.), welches die flankierenden Regionen des zu entfernenden Bereichs enthält (siehe Kapitel 3.2.3., 3.2.4.). In diesem Fall wurde der Vektor pTA131 verwendet, welcher das *pyrE2*-Gen als Auxotrophiemarker aufweist. Nach der Transformation wurde die Zell-

suspension daher auf Uracil-Magelmedium (Hv-Ca-Trp) ausplattiert. Da das integrative Plasmid pTA131 keinen Replikationsursprung für *H. volcanii* besitzt, können damit Klone selektiert werden, welche das Plasmid durch homologe Rekombination über eine der flankierenden Regionen in das Genom aufgenommen haben. Von diesen Pop-in-Klonen wurde ein Einzelklon in Flüssigmedium überimpft und bis zu einer OD₆₅₀ von ca. 1,0 bei 45 °C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde entsprechend verdünnt und auf 5-Fluororotsäure-haltigen Selektionsplatten (Hv-Ca+Trp+5-FOA) ausgestrichen. Durch die vom *pyrE2*-Gen kodierten Orotat-Phosphoribosyltransferase kommt es zur Umsetzung der 5-Fluororotsäure zu einem toxischen Produkt. Daher kann auf diese Weise auf Klone selektiert werden, welche wiederum durch homologe Rekombination über eine der flankierenden Regionen das Plasmid wieder aus dem Genom entfernt haben (Pop-out). Dabei können sich sowohl Wildtyp- als auch Knockout-Klone ergeben, abhängig davon, über welche der flankierenden Regionen jeweils die Rekombination stattfindet (Abbildung 4.4). Daher wurden anhand von Test-PCRs potentielle Knockout-Klone von Wildtyp-Klonen unterschieden. Dabei wurden Oligonukleotide verwendet, welche jeweils stromaufwärts und stromabwärts des zu entfernenden Bereichs binden. Fehlt das entsprechende Gen, wird ein kürzeres Fragment im Vergleich zum Wildtyp erhalten. In Tabelle 3.3 sind die für die Kontrolle der hergestellten Knockoutstämme verwendeten Oligonukleotide zusammengefasst.

Stamm	Oligonukleotide	Fragment [Bp]
„6875“	Cas3KOup/ HPAM9P2Sp6	1104
„687“	Cas5KOup/ HPAM9P2Sp6	1108
„685“	Cas3KOup/ HPAM9P2Sp6	1104
„675“	Cas3KOup/ HPAM9P2Sp6	1104
„68“	Csh2KOup/ HPAM9P2Sp6	946
„67“	Cas5KOup/ HPAM9P2Sp6	1108
„65“	Csh1KOup/ Csh2KOdo	1145
„87“	Cas5KOup/ HPAM9P2Sp6	1108
„85“	VPAM9P1Ende/Cas6KOdo	1013
„75“	VPAM9P1Ende/Csh1KOdo	965
$\Delta cas5$	Cas5KOup/Cas5KOdo	1047

Tabelle 3.3: Verwendete Oligonukleotide zur Unterscheidung von Wildtyp- und Knockout-Klonen.

In der ersten Spalte ist der untersuchte Stamm angegeben, in Spalte zwei die für die Test-PCR verwendeten Oligonukleotide. In der dritten Spalte ist die Größe des Fragments in Basenpaaren angegeben, welche im Falle eines Knockout-Klons auftritt.

3.6. Analyse von genomischer DNA aus *H. volcanii*

3.6.1. Isolation von genomischer DNA

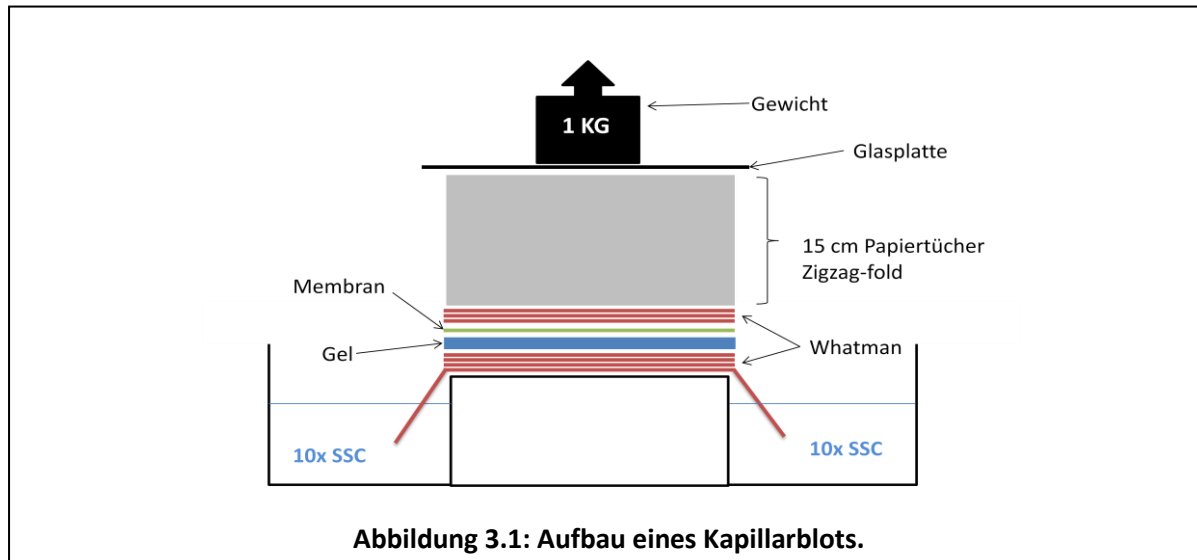
Eine Flüssigkultur wurde auf eine OD₆₅₀ von ca. 0,8 herangezogen. Ein ml dieser Kultur wurde in einem 2 ml-Eppendorfgefäß geerntet (6000 rpm, 5 min) und das Zellpellet in 200 µl ST-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lysepuffer wurde durch mehrmaliges Invertieren vorsichtig gemischt. Bei gleichzeitiger Bearbeitung mehrerer Proben wurden die folgenden Schritte bei einer Probe komplett durchgeführt, bevor mit der nächsten begonnen wurde. Pro Ansatz wurden zunächst 200 µl TE-Puffer in einem 2 ml-Eppendorfgefäß vorgelegt. Die Zelllösung wurde mit 500 µl 100 % Ethanol überschichtet. Mit Hilfe eines aus einer Pasteurpipette in der Bunsenbrennerflamme geformten Hakens aus Glas wurde die DNA, welche an der Phasengrenze zwischen Zelllösung und Ethanol ausfällt, vorsichtig aufgewickelt und in die 200 µl vorgelegten TE-Puffer abgestreift. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis keine viskose DNA mehr im Zelllysate vorhanden war. Ab diesem Zeitpunkt wurden mehrere Proben wieder parallel bearbeitet. Die DNA wurde durch Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 200 µl Isopropanol gefällt, abzentrifugiert (6000 rpm, 10 min) und mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde in 100-200 µl TE-Puffer resuspendiert, indem mehrere Tage bei 4°C geschwenkt wurde. Zur Entfernung von RNA wurden 2 µl RNase A zugegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

3.6.2. Southern Blot

Für die Analyse der Knockout-Stämme wurde zunächst 10 µg genomische DNA durch das Restriktionsenzym *Sa*I verdaut. Dazu wurde die DNA zunächst in einem 200 µl-Ansatz mit 20 µl Enzym und dem entsprechenden Puffer mindestens 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von weiteren 10 µl Enzym, 10 µl Puffer und 80 µl bidestilliertem Wasser. Nach einer weiteren Inkubationszeit bei 37 °C von mindestens 6 Stunden wurde die verdaut DNA einer Ethanol-Fällung unterzogen und in 20 µl Wasser aufgenommen.

Die verdaut genomische DNA wurde mit Agarose-Ladepuffer versetzt und durch ein Agarosegel bei 160 Volt aufgetrennt. Dabei wurde im Falle des *cas5*-Knockout-Stamms ein 0,8 %iges und bei den anderen Knockout-Stämmen ein 1,5 %iges Gel eingesetzt. Dann folgte die Übertragung der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Southern Blot). Das Gel wurde auf eine passende Größe zugeschnitten und zusammen mit einem fluoreszierenden Lineal zur späteren Orientierung unter UV-Licht fotografiert. Es folgten jeweils dreißigminütiges Schwenken in Denaturierungslösung und Neutralisierungslösung. Danach wurde ein Kapillarblot über Nacht durchgeführt, für den vorerst die Membran und die Whatman- und Papiertücher exakt auf die zum Gel passende Größe zugeschnitten wurden. Die zugeschnittenen Whatman-Papiere und die Nylonmembran wurden in 10xSSC-Puffer eingeweicht. Der Aufbau des Kapillarblots erfolgte wie in Abbildung 3.1 dargestellt. Nach

dem Kapillarblot wurde die Membran 15 Minuten getrocknet und dann die Nukleinsäuren durch Behandlung mit UV-Licht auf der Membran immobilisiert (Programm „Autocrosslink“).



3.6.3. Sondenhybridisierung von Southern Blots

Zur Detektion der entsprechenden Fragmente durch Sondenhybridisierung wurden im Falle der *cas*-Knockout-Stämme radioaktiv markierte Sonden verwendet. Zur Herstellung der Sonden wurden zunächst PCR-Reaktionen durchgeführt, die entstandenen Produkte mit Restriktionsenzymen verdaut, die Fragmente anhand eines Agarosegels aufgetrennt und die gewünschten Fragmente aus dem Gel extrahiert. In Tabelle 3.4 sind die jeweils verwendeten Oligonukleotide, Restriktionsenzyme und zur Markierung verwendeten Fragmente aufgelistet.

Sonde	Oligonukleotide	Verdau	Fragment [Nt]
P1	VPAM9P1Ende/IPCas6KOup	<i>Sall</i>	370
8H	Csh2KOup/3 -Cas8-NcoIBamHI	<i>Sall</i>	335
5V	Cas5FlagNup/Cas5FlagNdo	<i>Sall</i>	530
P2	iCas2KOdo/Cas2KOdoBamHI	<i>XbaI</i>	102

Tabelle 3.4: Herstellung der Sonden zu Analyse der Knockout-Stämme. In Spalte zwei sind die Oligonukleotide angegeben, welche für die Synthese der Sonden anhand einer PCR eingesetzt wurden. Als Matrize diente jeweils genomische DNA des Stamms H119. Die Produkte wurden mit den in Spalte drei angegebenen Restriktionsenzymen verdaut. In Spalte vier sind die Längen der Fragmente in Nukleotiden angegeben, welche im Weiteren markiert und als Sonde eingesetzt wurden.

Zur radioaktiven Markierung wurden je 30 ng der Fragmente in insgesamt 90 µl TE-Puffer aufgenommen, bei 95 °C fünf Minuten denaturiert und danach auf Eis inkubiert. Zur radioaktiven Markierung wurde das Rediprime™ II Random Prime Labeling System eingesetzt. Dieses enthält zufällige Hexanukleotide, alle weiteren Desoxynukleotide außer dCTP und das Klenow-Fragment als Polymerase in einem fertigen Mix, zu dem die denaturierten DNA-Fragmente und radioaktiv markiertes α -³²P- dCTP gegeben wird. Dabei wurden zwei Ansätze mit je 45 µl der oben genannten DNA-Lösung durchgeführt. Während einer Inkubationszeit von zehn Minuten bei 37 °C wurde eine zur eingesetzten DNA komplementäre Sonde gebildet, in die α -³²P- dCTP eingebaut wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA pH8 und 445 µl bidestilliertem Wasser abgestoppt. Die markierten Sonden wurden mit Hilfe einer Nap5-Säule gereinigt und durch je fünfminütige Inkubation bei 95 °C und auf Eis denaturiert. Die Southern-Blot-Membran wurde zunächst vier Stunden bei 42 °C in Prähybridisierungslösung geschwenkt und danach die markierten Sonden zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter Schwenken bei 42 °C. Die Membran wurde bei Raumtemperatur in 1xSSC/0,1% SDS einige Minuten gewaschen, in eine Folie eingeschweißt und über Nacht bei -80 °C in einer Filmkassette einem röntgensensitiven Film exponiert.

Die Detektion der Banden des *cas5*-Knockout-Stamms erfolgte mit Digoxigenin-markierten Sonden. Zur Herstellung der Sonde *cas5up* wurde zunächst eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden *Cas5KOup* und *iCas5KOup* durchgeführt, das Produkt mit *Sa*I verdaut, die Fragmente anhand eines Agarosegels aufgetrennt und das Fragment von 200 Basenpaaren aus dem Gel extrahiert. 3 µg des Fragments wurden denaturiert und mit Hilfe des DIG-DNA Labeling Kit mit Digoxigenin markiert. Dieses enthält zufällige Hexanukleotide, Digoxigenin-markierte Nukleotide und das Klenow-Enzym. Während einer Inkubationszeit von 20 Stunden bei 37 °C wird eine zum gewünschten Fragment komplementäre, Digoxigenin-markierte Sonde gebildet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 M EDTA pH 8 abgestoppt. Zur Herstellung der Sonde *cas5* wurde eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden *Cas5FlagNup* und *Cas5FlagNdo* unter Verwendung von Digoxigenin-markierten dUTPs durchgeführt. Die Southern-Blot-Membran wurde vier Stunden bei 42 °C in Prähybridisierungslösung geschwenkt und dann die Digoxigenin-markierte Sonde *cas5up* zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter Schwenken bei 42 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran mehrmals gewaschen (2x 5 min bei Raumtemperatur in 2xSSC/0,1%SDS, 15 min bei 42 °C in 0,5xSSC/0,1%SDS, 15 min bei 53 °C in 0,5xSSC/0,1%SDS). Danach erfolgte die Detektion durch den Digoxigenin-Antikörper. Dazu wurde die Membran eine Minute in DIG-Puffer 1a gewaschen und anschließend 30 Minuten in Blockinglösung geschwenkt. Der DIG-Antikörper wurde 1:10 000 in Blockinglösung verdünnt und die Membran 30 Minuten damit unter Schwenken inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen (2x 15 min in DIG-Puffer 1a, 5 min in DIG-Puffer 3) wurde die Membran mit 1,5 ml CSPD-Lösung (CSPD ready to use 1:100 verdünnt in Puffer 3) benetzt, in eine Tüte eingeschweißt und nach fünfminütiger Inkubation einem Film exponiert. Der Digoxigenin-Antikörper ist an eine alkalische Phosphatase gekoppelt. Durch die Kombination mit dem CSPD-Reagenz kommt es zu Chemilumineszenz und daraufhin zur Färbung des sensitiven Films. Um eine weitere Hybridisierung mit der

Sonde cas5 durchzuführen, wurde die Sonde cas5up von der Southern-Blot-Membran entfernt, indem diese zweimal für 15 Minuten bei 37 °C in Stripping Lösung und zweimal für fünf Minuten bei Raumtemperatur in 2x SSC-Lösung geschwenkt wurde. Danach erfolgte die Detektion mit der Sonde cas5 wie oben beschrieben.

3.7. Analyse der RNA aus *H. volcanii*

3.7.1. Isolation von RNA aus Flüssigkulturen

Um Gesamt-RNA aus *H. volcanii* zu isolieren wurden zunächst Flüssigkulturen bis zu einer OD₆₅₀ von 0,8 bis 1,0 bei 45 °C unter Schütteln inkubiert und danach durch Zentrifugation geerntet (5500 g, 15 min, RT). Das Zellpellet wurde in 500 µl Spheroblast-Lösung resuspendiert, die Zellsuspension mit 500 µl TRIzol-Reagenz versetzt und mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers gemischt. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform und erneutes kräftiges Mischen durch Schütteln mit dem Vortexer für 30 Sekunden. Durch Zentrifugation (14 krpm, 10 min, RT, Tischzentrifuge) wurden die Phasen getrennt und die obere, wässrige Phase mit Hilfe einer Pipette abgenommen. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol wurden die Nukleinsäuren gefällt und nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert (14 krpm, 10 min, RT, Tischzentrifuge). Das Nukleinsäure-Pellet wurde in 240 µl bidestilliertem, autoklaviertem Wasser gelöst und 30 µl DNase RQ1 und 30 µl des entsprechenden Puffers hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei 37 °C wurde der Ansatz einer Ethanol-fällung unterzogen und das erhaltene RNA-Pellet in Wasser gelöst.

3.7.2. Isolation von RNA aus Elutionsfraktionen

Um RNA aus Elutionsfraktionen zu isolieren, wurden zunächst die enthaltenen Proteine denaturiert und degradiert, indem zu 100 µl Proteinlösung 2 µl 10 %ige SDS-Lösung und 1 µl ProteinaseK (10 mg/ml) gegeben und der Ansatz 30 min bei 37 °C inkubiert wurde. Die Reste der denaturierten Proteine wurden durch Phenol/Chloroform-Behandlung entfernt, die RNA mit Ethanol gefällt und in bidestilliertem Wasser resuspendiert.

3.7.3. Sondenhybridisierung von Northern Blots

Zur Analyse der crRNA-Mengen in verschiedenen Stämmen wurden je 10 µg Gesamt-RNA (siehe Kapitel 3.7.1.) mit Hilfe eines 8 %igem Harnstoff-Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt. Bei der Untersuchung der aus Proteinfractionen isolierten RNA (siehe Kapitel 3.7.2.) wurden 600 ng RNA verwendet. Als Marker wurde ein radioaktiv markierter pGEM-

Marker aufgetragen. Nach dem Gellauf wurden die Nukleinsäurebanden über Nacht mit Hilfe der Trans Blot Cell (BioRad) bei 20 Volt auf eine Nylonmembran übertragen (Northern Blot). Durch Behandlung mit UV-Licht wurden die Nukleinsäuren kovalent an die Membran gebunden (Programm „Autocrosslink“). Zur Herstellung der Sonden wurden die Oligonukleotide P1Sp1 und 5S am 5'-Ende radioaktiv markiert. Dazu diente folgender Ansatz, welcher 45 Minuten bei 37 °C inkubiert wird:

1 µl	Oligonukleotid (100 µM)
11 µl	H ₂ O _{bidest}
2 µl	10 x PNK-Puffer A
1 µl	T4 Polynukleotid Kinase
5 µl	γ-P ³² -ATP (10 µCi/µl)

Die markierte Sonde wurde mit Hilfe einer Nap5-Säule gereinigt, fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Northern-Blot-Membran wurde vier Stunden bei 50 °C in Prähybridisierungslösung geschwenkt, sodann die Sonde P1Sp1 zugegeben und weiter über Nacht bei 50 °C geschwenkt. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur in Waschpuffer geschwenkt und in eine Folie eingeschweißt in einer Filmkassette bei -80 °C über Nacht einem röntgensensitiven Film exponiert. Für die zweite Detektion mit der 5S-Sonde wurde die vorige Sonde zunächst von der Membran entfernt, indem diese zweimal mit 0,1 % (w/v) SDS-Lösung gewaschen wurde. Dabei wurde die SDS-Lösung aufgeköcht, direkt auf die Membran gegeben und mindestens eine Stunde geschwenkt. Danach erfolgte eine erneute Prähybridisierung und Hybridisierung mit der 5S-Sonde.

3.7.4. Quantifizierung

Um die auftretenden Banden zu quantifizieren, wurden die hybridisierten, gewaschenen Northern Blots bei Raumtemperatur einer Phosphoimager-Platte exponiert. Mit Hilfe eines speziellen Scanners und entsprechender Software wurden die Signale eingelesen. Im Folgenden wurde die Intensität der Banden mit der Graphiksoftware ImageJ quantifiziert. Dabei wurde nicht nur die jeweilige Bande, sondern auch der Hintergrund erfasst. Zur Berechnung der Bandenintensitäten wurde der für den Hintergrund gemessene Wert von demjenigen der Bande subtrahiert. Um eventuelle Unterschiede in der RNA-Ladungsmenge zu berücksichtigen, wurden der Quotient aus den erhaltenen Werten für die P1Sp1-Detektion und der 5S-Detektion gebildet. Sie so erhaltenen absoluten crRNA-Mengen wurden in Prozent des Vergleichstamms umgerechnet. Im Falle der Untersuchung der HvoCas6-Mutanten wurde die Detektion mit der P1Sp1-Sonde dreifach durchgeführt und die Werte gemittelt.

3.8. Reinigung von Proteinen

3.8.1. Herstellung von *H. volcanii*-Zellextrakten

Zur Überproduktion von Cas-Proteinen in *H. volcanii* wurden Flüssigkulturen bei 45 °C unter Schütteln in Selektionsmedium abgezogen. Bei den Stämmen H26Δ*cas*(28)+pTA927-*casX*, H119Δ*cas*6+pTA927-*cas*6-FlagN und H1424+pTA963-*cas*6 wurde dafür Hv-Ca+Trp-Medium verwendet, beim Stamm H119Δ*cas*(7)+pTA927-*cas*5-FlagN+pTA352-*cas*687 Hv-Min+Trp-Medium. Diese Medien enthalten 0,25 mM Tryptophan, wodurch bereits eine Induktion des *P.tnaA*-Promotors stattfindet, unter dessen Kontrolle die jeweiligen *cas*-Gene stehen. Bei einer OD₆₅₀ von ca. 0,5 bis 0,8 erfolgte die Zugabe von angewärmter Trp-Boost-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 3 mM. Danach wurden die Kulturen weitere 3 bis 20 Stunden bei 45 °C unter Schütteln inkubiert.

Zur Herstellung von löslichen Zellextrakten aus *H. volcanii*-Überexpressionskulturen wurde die Flüssigkultur zunächst geerntet (6000 rpm, 15 min, RT, JA10/JA14) und die Zellen dann durch Resuspendieren in mindestens 1/5 Kulturvolumen angereichertem PBS und erneut ernten gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde in Lysepuffer resuspendiert, wobei das verwendete Volumen dem Kulturvolumen und der OD₆₅₀ nach folgender Formel angepasst wurde:

$$\frac{OD_{650} \times \text{Kulturvolumen [ml]}}{45} = \text{Lysepuffervolumen [ml]}$$

Im Falle der nachfolgenden Reinigung von HvoCas6 bei 1 M NaCl wurde dem Lysepuffer entsprechend NaCl zugefügt. Um die Zellen endgültig zu lysieren und um die genomische DNA zu zerstören folgte eine Ultraschallbehandlung (siehe Kapitel 3.3.2.) Durch Zentrifugation (20 krpm, 30 min, 4 °C, JA20) wurden die unlöslichen Bestandteile und Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand stellte den fertigen Zellextrakt dar und wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder nach Schockgefrieren mit Hilfe von flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

Im Falle der Überproduktion und nachfolgenden Reinigung von Cas6-His-Fusionsprotein wurden die geernteten Zellen mit His-Lyse/Equi-Puffer gewaschen, welcher 2 M NaCl enthielt. Die Zellen wurden in His-Lyse/Equi-Puffer+2M NaCl resuspendiert (siehe obige Formel), durch Ultraschallbehandlung lysiert und der lösliche Überstand durch Zentrifugation abgetrennt (siehe oben).

Für die Überprüfung der Löslichkeit von Proteinen wurde das Pellet in Lysepuffer aufgenommen, wobei hierfür ein dem löslichen Überstand entsprechendes Volumen verwendet wurde. Um eine ausreichende Verteilung der unlöslichen Bestandteile im Lysepuffer zu erreichen, wurden je nach Bedarf einige Ultraschall-Behandlungszyklen von 30 Sekunden (siehe oben) durchgeführt. Von beiden Fraktionen wurde der Proteingehalt bestimmt. Dabei

ergab sich für die löslichen Fraktionen im Falle der Cas6-Mutanten H41A und G258A eine Konzentration von 1,1 bzw. 0,85 µg/µl und für die unlöslichen Fraktionen 70 bzw. 60 ng/µl. Von den Fraktionen wurden jeweils 10 µl elektrophoretisch aufgetrennt und gefärbt bzw. mit Antikörper detektiert.

3.8.2. Herstellung von *E. coli*-Zellextrakten

Für die Herstellung von löslichen Zellextrakten aus *E. coli* wurden Überexpressionskulturen von einem Liter (siehe Kapitel 3.3.1.) geerntet und die Zellen in 10 ml Puffer resuspendiert. Dabei wurde je nach nachfolgender Reinigung His-Lyse/Equi-Puffer bzw. Flag-Lysepuffer verwendet. Im Falle der Reinigung bei 2 M NaCl wurde dem His-Lyse/Equi-Puffer entsprechend NaCl zugesetzt. Um die Zellen aufzuschließen, wurde die Lösung einer Ultraschall-Behandlung unterzogen (siehe Kapitel 3.3.2.). Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (20 krpm, 30 min, 4 °C, JA20) pelletiert und der lösliche Überstand abgenommen. Im Falle von HvoCas6 wurden die Extrakte durch flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert, während bei ClaCas6 eine Lagerung auf Eis bei 4 °C vorgenommen wurde.

3.8.3. Reinigung von Proteinen durch Affinitätschromatographie

Die Reinigung von FLAG-Fusionsproteinen aus Zellextrakten erfolgte mit Hilfe des Anti-FLAG M2 *affinity gel*. Dieses besteht aus Agarose-Kügelchen, an welche monoklonale Antikörper gegen das FLAG-Peptid kovalent gebunden sind. Für den Proteinreinigungsvorgang wurde eine entsprechende Menge FLAG-Agarose-Suspension in eine Leer-Säule (*Poly Prep Chromatography Column*) gefüllt. Pro ml Extrakt wurden ca. 120 µl Suspension verwendet, was einer Nettomenge von ca. 60 µl FLAG-Agarose pro ml Extrakt entspricht. Um das in der Aufbewahrungslösung enthaltene Glycerin zu entfernen und um die FLAG-Agarose zu äquilibrieren wurde diese zehn Mal jeweils mit dem zehnfachen Gelbettvolumen Flag-Waschpuffer gewaschen. Im Falle der Reinigung bei 150 mM NaCl wurde der Extrakt zunächst mit 5 M NaCl bis zu einer Endkonzentration von 150 mM versetzt. Der Extrakt wurde zur gewaschenen FLAG-Agarose gegeben und über Nacht bei 4 °C unter sanftem Schwenken inkubiert. Durch Austropfen der Säule wurde der Extrakt von der FLAG-Agarose getrennt und dieser Durchfluss bei Bedarf für weitere Reinigungen nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C aufbewahrt. Die FLAG-Agarose mit den gebundenen Fusionsproteinen und deren Interaktionspartnern wurde erneut zehnmal gewaschen (siehe oben), um nicht oder unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Zur Elution der spezifisch gebundenen Proteine wurden pro 60 µl Agarose (bzw. pro ml Extrakt) 100 µl Waschpuffer mit je 3 µl FLAG-Peptid versetzt (150 µg/ml Endkonzentration), mit der Agarose vermengt und 30 Minuten unter leichtem Schwenken inkubiert. Dadurch werden die

gebundenen Fusionsproteine durch das FLAG-Peptid von den Antikörper-Bindestellen der FLAG-Agarose-Matrix verdrängt und können mit der Elutionslösung von der Agarose getrennt werden. Im Falle der Reinigung bei 1 M NaCl wurde der Waschpuffer entsprechend mit NaCl versetzt. Für die Wiederverwendung der FLAG-Agarose wurde diese mit mindestens zweifachem Gelbettvolumen 0,1 M Glycin/HCl pH 3,5 gewaschen, um alle Proteine von der Matrix zu entfernen. Sodann wurde solange mit 1x PBS gewaschen, bis der pH-Wert des Durchflusses wieder neutral ist. Die regenerierte FLAG-Agarose wurde in einer Lösung aus 50 % (v/v) Glycerin in PBS bei 4 °C aufbewahrt.

Die Reinigung von His-Fusionsprotein erfolgte mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose. Diese besteht aus Agarosekügelchen, an welche Nitrilotriessigsäure-Moleküle gebunden sind. Dieser Chelatbildner bildet in wässriger Lösung stabile Komplexe mit Metallionen, in diesem Fall Ni^{2+} . Durch Interaktion zwischen dem His-Tag und den immobilisierten Ni^{2+} -Ionen binden die Fusionsproteine an die Ni-NTA-Agarosematrix. Die Elution erfolgt durch Zugabe von Imidazol, welches als Struktur analogon zu Histidin die Fusionsproteine verdrängt. Für den Reinigungsvorgang wurde 1 ml Ni-NTA-Agarose (entspricht 2 ml Suspension) in eine Leersäule gefüllt und durch Waschen mit 10 Gelbettvolumen His-Lyse/Equi-Puffer äquilibriert. Der Zellextrakt wurde mit der äquilibrierten Säulenmatrix vermischt und eine Stunde bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach Abtrennung des Extrakts wurde die Säulenmatrix zunächst mit 50 Gelbettvolumen His-Lyse/Equi-Puffer und dann mit derselben Menge His-Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 1 ml His-Elutionspuffer und Inkubation von zwei Minuten. Im Falle der Reinigung bei 2 M NaCl wurde den Puffern entsprechend NaCl zugefügt.

Die Elutionsfraktionen von Proteinen aus *H. volcanii* wurden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Elutionsfraktion von ClaCas6 wurde bei 4 °C auf Eis gelagert.

3.8.4. Reinigung von Proteinen durch Gelfiltration

Das Prinzip der Gelfiltration beruht auf einer Säulenmatrix, welche aus Partikeln mit Poren definierter Größe besteht. Beim Durchwandern des zu trennenden Proteingemischs durch die Säule können kleinere Proteine in die Poren eindringen und verteilen sich daher auf ein größeres Volumen der flüssigen Phase. Dadurch wird ihre Laufgeschwindigkeit im Vergleich zu größeren Molekülen, welche nicht in die Poren eindringen können, verzögert. Durch fraktioniertes Sammeln des Eluats können also Moleküle verschiedener Größe voneinander getrennt werden. Zusätzlich können durch Vergleiche mit den Elutionsmustern von Proteinen bekannter Größe Rückschlüsse auf die Größe der untersuchten Proteine bzw. Komplexe gezogen werden.

Zur Durchführung von Gelfiltrationen wurden der Äkta Purifier und die Säule Superdex 200 5/150 GL verwendet. Das gesamte System wurde zuerst mit bidestilliertem Wasser und dann

mit dem entsprechenden Puffer gespült, wobei jeweils derjenige Puffer verwendet wurde, welcher in der vorhergehenden Reinigung als Waschpuffer diente. Die Injektion der Probe erfolgte automatisch mit Hilfe eines 100 µl-Loops. Die Elution erfolgte mit 1,5 Säulenvolumen Puffer bei einer Flussrate von 0,3 ml/min. Das Eluat wurde in Fraktionen von 500 µl gesammelt.

3.9. Untersuchung der Prozessierung *in vitro*

3.9.1. Radioaktive Markierung von RNA

Für die radioaktive Markierung des 5'-Endes wurde folgender Ansatz verwendet:

10 µg	RNA-Oligonukleotid
2 µl	10 x PNK-Puffer A
2 µl	T4 Polynukleotid Kinase
2,5 µl	γ -P ³² - ATP (10 µCi/µl)
ad 20 µl	H ₂ O _{bidest}

Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Für die radioaktive Markierung des 3'-Endes wurde folgender Ansatz verwendet:

10 µg	RNA-Oligonukleotid
4 µl	ATP (10 mM)
4 µl	10x Puffer
1 µl	BSA
4 µl	DMSO
1 µl	Ribolock
2 µl	T4-RNA-Ligase
5 µl	³² P-pCp (10 µCi/µl)
ad 40 µl	H ₂ O _{bidest}

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert

Die Ansätze der 5'- und 3'-Markierung wurden mit Ethanol gefällt, das RNA-Pellet in 30 µl 1xPAA-Ladepuffer resuspendiert und anhand eines 8 %igen Harnstoff-Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde in Folie verpackt und für zwei Minuten einem röntgensensitiven Film exponiert. Dieser diente als Schablone, um die radioaktiv markierte RNA-Bande aus dem Gel auszuschneiden. Das Gelstück wurde über Nacht bei Raumtemperatur in 360 µl RNA-Elutionspuffer inkubiert. Der Überstand wurde durch einen SpinX-Filter abgetrennt, mit Ethanol gefällt und die markierte RNA in bidestilliertem Wasser resuspendiert.

3.9.2. Herstellung von markierten crRNA-Vorläufern

Zur Herstellung der markierten crRNA-Vorläufer P2-3S2R und P2-4S3R wurden zunächst PCR-Produkte mit Hilfe der Oligonukleotide T7-P2-Sp1 und P2-Sp3 bzw. P2-Sp4 und dem Konstrukt TOPO-P2-4S3R als Matrize hergestellt. Dabei wurde eine Polymerase verwendet, welche Produkte mit glatten Enden produziert. Die so erhaltenen Produkte wurden als Matrizen in einer *in vitro* Transkription eingesetzt, bei welcher radioaktiv markiertes dUTP eingebaut wird. Die so entstehenden Produkte sind daher durchgehend markiert. Dabei wurde folgender Ansatz verwendet:

500 ng	PCR-Produkt
4 µl	Transcription Optimized 5x Puffer
2 µl	dNTP-Mix (5:5:5:1)
1 µl	Ribolock
2 µl	DTT (100 mM)
2 µl	³² P-UTP (10 µCi/µl)
2 µl	T7-RNA-Polymerase
ad 20 µl	H ₂ O _{bidest}

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert, mit Ethanol gefällt, das RNA-Pellet in 30 µl 1xPAA-Ladepuffer resuspendiert, anhand eines 8 %igen Harnstoff-Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechende Bande aus dem Gel extrahiert (siehe Kapitel 3.9.1.).

3.9.3. *in vitro* Prozessierung

Für die Untersuchung der Prozessierung *in vitro* wurden verschiedene Mengen Protein mit radioaktiv markiertem Vorläufer unterschiedlich lange bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde folgender allgemeiner Ansatz verwendet:

x µg	Protein
x µl	markierte RNA (10 cpm)
5 µl	10x ivp-Puffer
ad 50 µl	H ₂ O _{bidest}

Je nach dem wurde den Ansätzen 5 M NaCl-Lösung zur entsprechenden Endkonzentration (150 mM, 1M, 2M) zugefügt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze zur Entfernung der Proteine mit Phenol/Chloroform behandelt, die RNA mit Ethanol gefällt, in 1xPAA-Ladepuffer resuspendiert und anhand eines Harnstoff-Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde in Folie verpackt und für mindestens 16 Stunden bei -80 °C einem röntgensensitiven Film exponiert.

3.10. Untersuchung von Protein-RNA-Interaktionen

3.10.1. EMSA

Für die Durchführung von *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) wurde folgender allgemeiner Ansatz verwendet:

2 µl	10x Bindepuffer
x µl	RNA
x µg	Protein
0,5 mM	PMSF
1 mM	DTT
ad 20 µl	H ₂ O _{bidest}

Dabei wurden zunächst 5'-radioaktiv markierte Repeat-RNA (siehe Kapitel 3.9.1.) und Bindepuffer auf die entsprechende Menge mit H₂O_{bidest} aufgefüllt, für fünf Minuten bei 80 °C inkubiert und danach bei Raumtemperatur für 20 Minuten abgekühlt. Dann erfolgte die Zugabe von PMSF (1 µl 10 mM), DTT (2 µl 10 mM) und Protein. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei verschiedenen Temperaturen wurden die Ansätze mit 1,5 µl Probenpuffer versetzt und auf ein natives 10 %iges Polyacrylamidgel geladen. Das Gel wurde vor dem Laden der Proben 30 Minuten einer Spannung von 60 V ausgesetzt. Zum Einlauf der Proben wurden 30 Minuten 30 V angesetzt und dann die Spannung für drei Stunden auf 60 V erhöht. Sodann wurde das Gel in Folie verpackt und über Nacht bei -80 °C einem röntgensensitiven Film exponiert.

3.10.2. Quervernetzung durch UV-Licht

Um Proteine mit interagierender RNA kovalent durch die Behandlung mit UV-Licht zu verbinden, wurden zunächst 5 µg Protein und radioaktiv markierte RNA (100 cpm) zur Bindung inkubiert (siehe Kapitel 3.10.1.). Da die Proben später eventuell massenspektrometrischen Analysen unterzogen werden sollten, wurde dabei Bindepuffer ohne Glycerin verwendet. Desweiteren wurde kein DTT zugegeben. Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C. Nach der Bindung wurden die Proben durch Behandlung mit UV-Licht (254 nm) im offenen Reaktionsgefäß quervernetzt (Stratalinker). Um den Erfolg der Quervernetzung zu kontrollieren, wurden die Proben mit 5 µl SDS-Ladepuffer versetzt und anhand eines SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt. Das Gel wurde in Folie eingepackt und über Nacht einem röntgensensitiven Film exponiert.

3.11. Nachweis von Proteinen

3.11.1. Antikörper-Detektion

Um spezifisch bestimmte Proteinbanden nachzuweisen, wurden die im Gel aufgetrennten Proteine zunächst auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Western Blot).

Zur Detektion von FLAG-Fusionsproteinen wurde die Membran mindestens eine Stunde in Blocking-Lösung geschwenkt, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Nach mindestens zweimaligem Waschen der Membran für fünf Minuten in TTBS wurde die geblockte Membran eine Stunde in Antikörperlösung geschwenkt. Diese wurde durch Verdünnung von Anti-FLAG HRP Konjugat in TTBS (1:1000) hergestellt und für mehrere Detektionen wiederverwendet (Lagerung bei 4 °C). Um hohe Hintergrundsignale aufgrund von unspezifisch gebundenem Antikörper zu vermeiden, wurde die Membran im Folgenden gründlich gewaschen, indem dreimal mindestens 10 Minuten in TTBS geschwenkt wurde. Zur Detektion der spezifischen Signale durch Chemilumineszenz wurden je 10 ml Lösung I und Lösung II gemischt, die Membran einige Minuten in dieser Mischung inkubiert und zwischen zwei Plastikfolien für verschiedene Zeiträume (eine Sekunde bis einige Minuten) Röntgenfilmen exponiert. Durch die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase kommt es zur Umsetzung des in Lösung I enthaltenen Luminols, wobei Chemilumineszenz entsteht und eine Färbung des Röntgenfilms erfolgt.

Für die Detektion mit den selbst hergestellten polyklonalen Antikörpern gegen verschiedene Cas-Proteine wurden die Membranen ebenfalls mindestens eine Stunde in Blockinglösung geschwenkt und danach mit TTBS gewaschen. Für die Herstellung der Antikörperlösung wurde das jeweilige Serum 1:1000 in Blockinglösung verdünnt. Zur Wiederverwendung wurde die Antikörperlösung bei -20 °C gelagert. Da die selbst hergestellten Antikörper keine gekoppelte Peroxidase haben, wurde im Folgenden mit einem weiteren Antikörper behandelt, welcher spezifisch Immunglobuline aus Mäusen erkennt und eine gekoppelte Peroxidase aufweist. Dazu wurde die Membran zunächst erneut einige Minuten in TTBS gewaschen und danach eine Stunde in der Zweitantikörperlösung (Anti-Maus IgG, 1:5000 in TTBS) geschwenkt. Nach gründlichem Waschen in TTBS erfolgte die Detektion der spezifischen Signale über Chemilumineszenz (siehe oben).

Die Detektion von His-Fusionsproteinen erfolgte mit den vom Hersteller empfohlenen Lösungen und durch Chemilumineszenz wie oben beschreiben.

3.11.2. Silberfärbung

Zur Färbung von Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen mit Hilfe von Silbernitrat wurde das zu färbende Gel nach der Elektrophorese zunächst mindestens 45 Minuten in Fixierungslösung und dann dreimal 5 Minuten in Waschlösung geschwenkt. Nach der

Vorbehandlung durch Schwenken von einer Minute in Natriumthiosulfatlösung und mehrmaligem kurzen Waschen mit bidestilliertem Wasser erfolgte die Imprägnierung mit Silbernitratlösung für 5 Minuten. Danach wurde nach erneutem mehrmaligem Waschen mit bidestilliertem Wasser die Entwicklungslösung zugegeben und solange unter Schwenken inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Nach kurzem Waschen mit bidestilliertem Wasser wurde die Färbung durch Zugabe von Stopplösung (10 % Essigsäure) abgebrochen. Nach fünf Minuten Inkubation folgte eine weitere fünfminütige Inkubation in 1 %iger Essigsäurelösung. Zur Aufbewahrung wurde das gefärbte Gel zunächst mindestens eine Stunde in 6 % (v/v) Glycerinlösung inkubiert und anschließend mit Hilfe eines Gelrockners in Zellophanfolie eingeschweißt.

3.11.3. Färbung mit Coomassie

Um Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie zu färben wurde das Gel nach der Elektrophorese in ca. 50 ml bidestilliertem Wasser in der Mikrowelle erwärmt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal mit frischem Wasser wiederholt, bevor das Gel in Coomassie-Färbelösung auf dieselbe Art erwärmt wurde. Danach wurde das Gel solange unter leichtem Schwenken in der Coomassie-Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert, bis Banden sichtbar wurden. Nach Abgießen der Färbelösung wurde das Gel mehrmals mit bidestilliertem Wasser unter Schwenken bei Raumtemperatur gewaschen. Zur Aufbewahrung wurden gefärbte Gele eine Stunde in 6 % (v/v) Glycerinlösung geschwenkt und danach mit Hilfe eines Gelrockners in Zellophan eingeschweißt.

3.11.4. Färbung mit Ponceau-Rot

Um Proteinbanden auf Nitrozellulose-Membranen anzufärben wurde die Membran einige Minuten in Ponceau-Färbelösung geschwenkt und nach Abgießen der Färbelösung einige Male mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Zur Aufbewahrung wurden gefärbte Membranen bei Raumtemperatur getrocknet und gelagert.

3.11.5. Massenspektrometrie

Um einzelne Proteinbanden zu identifizieren, wurden die Proteinfractionen anhand von 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt, wobei zu Vermeidung von Kontaminationen zwischen den Spuren für jede Probe eine extra Gel verwendet wurde. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt und die zu identifizierenden Banden mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten. Die folgenden Schritte wurden freundlicherweise von Herrn Kundan Sharma (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, Bioanalytical

Mass Spectrometry Group, Arbeitsgruppe Prof. H. Urlaub) durchgeführt. Die Proteine der einzelnen Banden wurden mit Trypsin verdaut (SHEVCHENKO *ET AL.*, 1996) und die erhaltenen Peptide anhand von LC-MS/MS (*liquid chromatography tandem mass spectrometry*) mit Hilfe eines Orbitrap XL Massenspektrometers (ThermoFisherScientific) analysiert. Im Falle der Untersuchung von Proteinen aus *H. volcanii* wurden die erhaltenen Daten mit Hilfe der MASCOT Software mit der Proteindatenbank von *H. volcanii* (www.halolex.mpg.de, PFEIFFER *ET AL.*, 2008) verglichen und so die Anzahl von einzigartigen Peptiden ermittelt. Für die Untersuchung von Proteinen aus *C. lactoaceticus* wurde die Gesamt-Datenbank von NCBI verwendet.

4. ERGEBNISSE

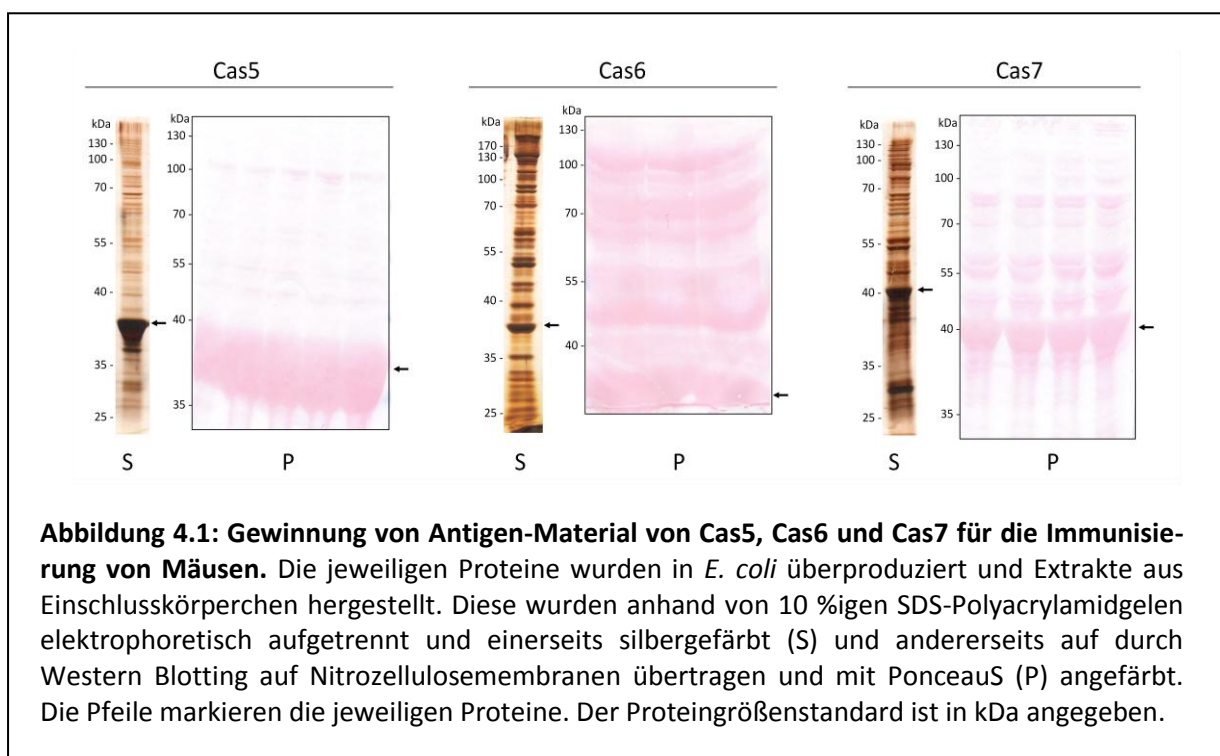
4.1. Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen Cas-Proteine

Für die Analyse von Proteinfractionen ist es hilfreich, wenn einzelne Proteine spezifisch nachgewiesen werden können. Eine einfache und schnelle Möglichkeit hierfür ist die Detektion von Western Blots mit Antikörpern. Um einzelne Cas-Proteine in Proteinfractionen zu identifizieren, sollten daher im Rahmen dieser Arbeit polyklonale Antikörper gegen die Cas-Proteine Cas5, Cas6 und Cas7 aus *H. volcanii* gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Cas-Proteine für die Gewinnung von Antigen-Material rekombinant in *E. coli* überproduziert und mit diesem im Folgenden Mäuse immunisiert. Das Immunsystem der Tiere reagiert darauf mit der Produktion von spezifischen Antikörpern, welche aus dem Blut gewonnen werden können.

4.1.1. Gewinnung von Antigen

Um Antigen für die Immunisierung zu erhalten, wurden die jeweiligen Cas-Proteine rekombinant in *E. coli* überproduziert. Dazu wurden die entsprechenden *cas*-Gene in pET-Expressionsvektoren kloniert (siehe Kapitel 3.2.1.). Um im Zuge der Immunreaktion der Tiere möglichst ausschließlich Antikörper gegen das gewünschte Protein zu erhalten, sollte das zur Immunisierung eingesetzte Antigen-Material möglichst keine anderen Proteine enthalten. Eine Reinigung der rekombinanten Proteine anhand von Affinitäts-Tags ist jedoch nicht möglich, da in diesem Fall auch Antikörper gegen den Affinitäts-Tag gebildet würden. Diese wären nicht mehr spezifisch gegen das entsprechende Protein gerichtet. Daher wurden die rekombinanten Proteine aus Einschlusskörperchen gewonnen. Bei der exzessiven Synthese von Proteinen in *E. coli* im Zuge der Überproduktion werden diese häufig zu einem mehr oder weniger großen Teil unvollständig oder nicht korrekt gefaltet. Dies ist insbesondere bei rekombinanten Proteinen oft der Fall. Die fehlerhaft gefalteten Proteine aggregieren im Zytoplasma in Form von sogenannten Einschlusskörperchen. Da diese Aggregate unlöslich sind, können sie von den löslichen Bestandteilen der Zelle durch Zentrifugation von Gesamt-Zellextrakten abgetrennt werden. Da der Hauptteil der zellulären Proteine in der löslichen Fraktion zu finden ist, stellt dies einen ersten Reinigungsschritt dar. Ein weiterer Vorteil ist die größere Ausbeute, da meist der größere Teil des überproduzierten Proteins in der unlöslichen Fraktion zu finden ist. Zuletzt ist der Umstand, dass die aus Einschlusskörperchen gewonnenen Proteine nicht korrekt gefaltet sind, für die Verwendung als Antigen nicht relevant, da die weitere Reinigung durch Auftrennung anhand eines SDS-Polyacrylamidgels unter denaturierenden Bedingungen stattfindet, ebenso wie die spätere Anwendung der Antikörper.

Die aus Zellen einer *E. coli*-Überexpressionskultur gewonnenen Einschlusskörperchen wurden mit Hilfe von harnstoffhaltigem Puffer in Lösung gebracht, anhand von SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und angefärbt, um die Anwesenheit der überproduzierten Proteine zu kontrollieren. Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, ergab sich für alle drei rekombinanten Proteine jeweils eine dominante Bande, welche der Größe der entsprechenden Proteine entspricht. Aufgetrennte Proteinfractionen wurden daraufhin anhand eines Western Blots auf Nitrozellulosemembranen übertragen und die Proteine mit Hilfe von PonceauS angefärbt. Die entsprechenden Proteinbanden wurden durch ein Skalpell aus der Membran ausgeschnitten, wobei darauf geachtet wurde, dass keine anderen Proteinbanden mit ausgeschnitten wurden. Die Membranstücke wurden in DMSO gelöst und diese antigenhaltige Lösung zur Immunisierung der Mäuse verwendet.



4.1.2. Testen der antikörperhaltigen Seren

Von den Mäusen wurde jeweils vor und nach der Immunisierung Blut entnommen. Dies wurde von einer approbierten Tierärztin und Mitarbeiterin des Tierforschungszentrums der Universität Ulm durchgeführt. Die zellulären Bestandteile des Bluts wurden durch Zentrifugation abgetrennt und so die antikörperhaltigen Blutseren gewonnen. Um zu testen, inwieweit die jeweiligen Seren Antikörper enthalten und um deren Spezifität einschätzen zu können, wurden verschiedene Proben anhand von SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, per Western Blot auf Nitrozellulosemembranen übertragen und diese dann mit den jeweiligen Seren detektiert. Dazu wurden die Seren 1:1000 in Blockinglösung verdünnt. Um eine

Detektion anhand einer Chemilumineszenzreaktion zu ermöglichen, wurde nach der Behandlung mit den Seren eine Inkubation mit einem Zweitantikörper durchgeführt, welcher spezifisch an murine Immunglobuline bindet (Anti-Maus IgG) und mit einer Peroxidase gekoppelt ist.

Zum Testen der Antikörper wurden zum einen lösliche Zellextrakte von *H. volcanii* und *E. coli* verwendet. Zum anderen wurde jeweils der für die Immunisierung hergestellte Harnstoff-Extrakt getestet. Zuletzt wurde eine Probe getestet, welche die Cas-Proteine Cas5, Cas6, Cas7 und Cas8 rekombinant und gereinigt enthält. Dazu wurden alle vier Cas-Proteine mit einem His-Tag fusioniert in *E. coli* überproduziert und mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose aus Harnstoff-Extrakten gereinigt (nicht gezeigt).

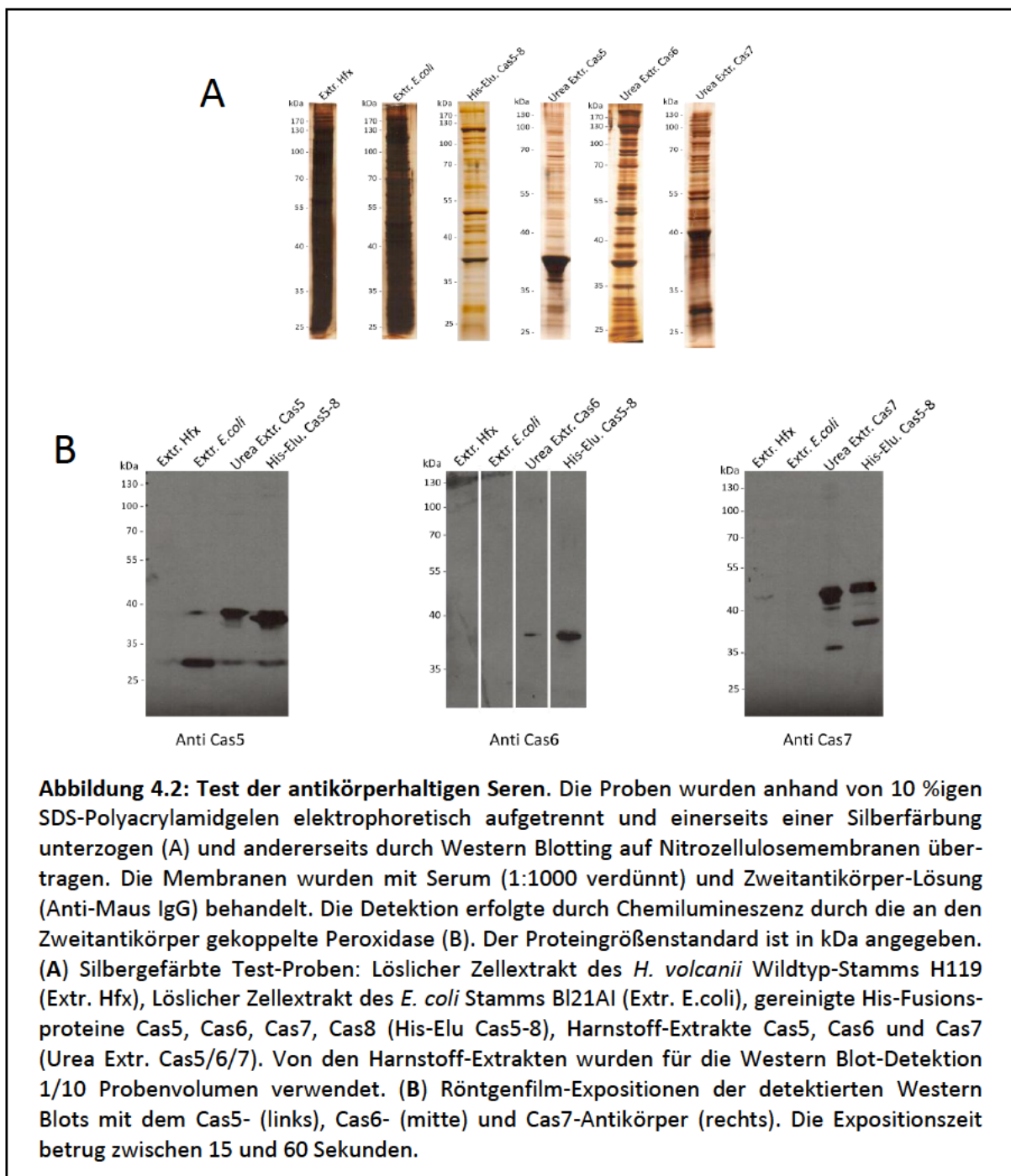
Beim Test des Cas5-Antikörpers konnte im Falle des Cas5-Harnstoff-Extrakts ein Signal bei ca. 38 kDa detektiert werden (siehe Abbildung 4.2). Dies entspricht der Cas5-Bande. Auch bei der Probe mit den co-exprimierten, gereinigten His-Fusionsproteinen ergab sich ein Signal in ähnlicher Höhe. In beiden Fällen ist ein schwaches Signal bei ca. 30 kDa sichtbar. Dieses Signal ist sehr stark auch im Falle des *E. coli*-Extrakts vorhanden. Hier ist außerdem eine schwache Bande bei ca. 38 kDa detektierbar. Es kann also gesagt werden, dass der Cas5-Antikörper das Cas5-Protein spezifisch erkennt. Allerdings scheint eine Kreuzreaktion mit einem *E. coli*-Protein von ca. 30 kDa Größe vorzuliegen, da ein entsprechendes Signal in allen *E. coli*-basierten Testproben detektiert wurde. Ein Abbauprodukt von Cas5 ist eher unwahrscheinlich, da das Signal im *E. coli*-Extrakt, in welchem kein Cas5 vorhanden ist, am stärksten auftritt. Im Zellextrakt von *E. coli* konnte außerdem ein schwaches Signal auf einer Höhe detektiert werden, welche Cas5 entspricht. Hier könnte es sich ebenfalls um eine Kreuzreaktion mit einem *E. coli*-Protein handeln, oder aber auch um eine Kontamination der Probe beim Laden des SDS-Gels mit der nebenliegenden Probe. Zuletzt kann festgestellt werden, dass eine Detektion des Cas5-Proteins in einem *H. volcanii*-Zellextrakt nicht möglich ist. Offensichtlich liegt der Anteil des Proteins im Wildtyp-Extrakt unter der Detektionsgrenze.

Für den Cas6-Antikörper ergaben sich im Falle der Extrakte aus *H. volcanii* und *E. coli* keine Signale. Für den Cas6-Harnstoff-Extrakt und die gereinigten His-Fusionsproteine konnten auf der erwarteten Höhe von Cas6 Signale erhalten werden. Es kann also festgestellt werden, dass der Cas6-Antikörper spezifisch an Cas6 bindet und keine Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen aus *E. coli* oder *H. volcanii* vorliegen. Eine Detektion des Cas6-Proteins in einem Extrakt des *H. volcanii*-Wildtypstamms ist jedoch nicht möglich, da die Menge von Cas6 unter der Detektionsgrenze liegt.

Beim Test des Cas7-Antikörpers ergaben sich Banden bei ca. 45 kDa im Falle des Harnstoff-Extrakts und der His-Fusionsproteine. Die Höhe der Banden entspricht der für Cas7 erwarteten. Außerdem konnten in diesen beiden Proben Banden bei geringeren Höhen detektiert werden. Da im Falle des *E. coli*-Extrakts keine Banden sichtbar sind, ist anzunehmen, dass es sich dabei um Abbauprodukte von Cas7 und nicht um Kreuzreaktionen handelt. Es kann also

festgestellt werden, dass der Cas7-Antikörper spezifisch an Cas7 bindet. Zuletzt konnte ein schwaches Signal für Cas7 im *H. volcanii*-Extrakt erhalten werden. Offensichtlich erreicht die Menge von Cas7 knapp die Detektionsgrenze. Dies kann darauf begründet sein, dass das Cas7-Protein im Vergleich zu Cas5 und Cas6, für welche keine Signale im *H. volcanii*-Zellextrakt erhalten werden konnten, vermehrt vorhanden ist oder auf einer größeren Affinität des Cas7-Antikörpers.

Im Falle aller drei Antikörper wurde jeweils unter gleichen Bedingungen das Prä-Immun-Serum getestet. In keinem Fall konnten dabei Banden erhalten werden (nicht gezeigt).



4.2. Untersuchung der crRNA-Prozessierungsmaschinerie in *H. volcanii*

4.2.1. Ermittlung der beteiligten Proteine

Anhand von Untersuchungen der RNA aus *H. volcanii* konnte gezeigt werden, dass alle drei CRISPR-Loci transkribiert und prozessiert werden. Durch Hybridisierung von Northern Blots mit Sonden, welche komplementär zur Spacer-Sequenzen sind, konnte im Wildtyp unter verschiedenen Wachstumsbedingungen reife crRNA detektiert werden (FISCHER *ET AL.*, 2012). Im Folgenden sollte ermittelt werden, welche Cas-Proteine für die Aufrechterhaltung einer stabilen Population von reifer crRNA verantwortlich sind. Dazu wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden in einen Stamm, bei welchem das gesamte *cas*-Operon deletiert ist, verschiedene Kombinationen von *cas*-Genen auf einem Plasmid eingebracht und untersucht, inwieweit damit jeweils die Prozessierung und Stabilisierung der crRNA wiederhergestellt werden kann (Komplementation). Zum anderen wurden zur Bestätigung dieser Ergebnisse diverse *cas*-Gene aus dem Genom des Wildtyps entfernt und im Folgenden die crRNA-Level und die Fähigkeit zur Interferenz untersucht. Von anderen Typ I CRISPR/Cas-Systemen ist bekannt, dass Cas1, Cas2 und Cas4 für die Adaptations-Phase wichtig sind und nicht an der crRNA-Biogenese oder der Interferenz beteiligt sind. Cas3 hingegen wurde als degradierende Nuklease im Zuge der Interferenzreaktion identifiziert (siehe Kapitel 1.2.2.). Daher wurden für die Ermittlung der an der Prozessierung und Stabilisierung der crRNA beteiligten Proteine im Rahmen dieser Arbeit die Cas-Proteine Cas5, Cas6, Cas7 und Cas8 untersucht.

4.2.1.1. Herstellung der Konstrukte und Stämme für die Komplementation

Für die Komplementation des Δcas -Stammes mit verschiedenen Kombinationen von *cas*-Genen wurden insgesamt zehn Plasmid-Konstrukte hergestellt. Die jeweiligen *cas*-Gene wurden unter der Kontrolle des Tryptophan-induzierbaren Promotors (*P.tnaA*) in den Expressionsvektor pTA927 kloniert. Dieser Promotor sorgt bei Zugabe von Tryptophan in das Wachstumsmedium für eine Überexpression der nachfolgenden Gene. Bei der Klonierung der Konstrukte wurden sowohl die Reihenfolge der Gene im genomischen Locus als auch die intergenischen Bereiche zwischen *cas8* und *cas7* bzw. zwischen *cas7* und *cas5* jeweils eingehalten (siehe Abbildung 1.7). Dazu wurden als Matrize für die Herstellung der Inserts entsprechende Knockout-Stämme verwendet, in welchen nur das offene Leseraster jeweils eines *cas*-Gens entfernt wurde ($\Delta cas7$ bzw. $\Delta cas8$, STOLL, 2013). Eine Ausnahme bildet das Konstrukt pTA927-*cas65*, bei dem die intergenischen Bereiche fehlen und beide *cas*-Gene nur durch eine Restriktionsschnittstelle getrennt sind. Die Details der Herstellung der Konstrukte ist dem Kapitel 3.2.2. zu entnehmen, eine schematische Darstellung ist in Abbildung 4.3 zu sehen. Die Plasmide wurden durch Transformation in den *H. volcanii*-Stamm H26 Δcas (28) eingebracht. In diesem Stamm ist durch Rekombination zwischen dem

12. Repeat des CRISPR-Locus P1 und dem 9. Repeat des Locus P2 das gesamte *cas*-Gen-Operon deletiert (FISCHER *ET AL.*, 2012).

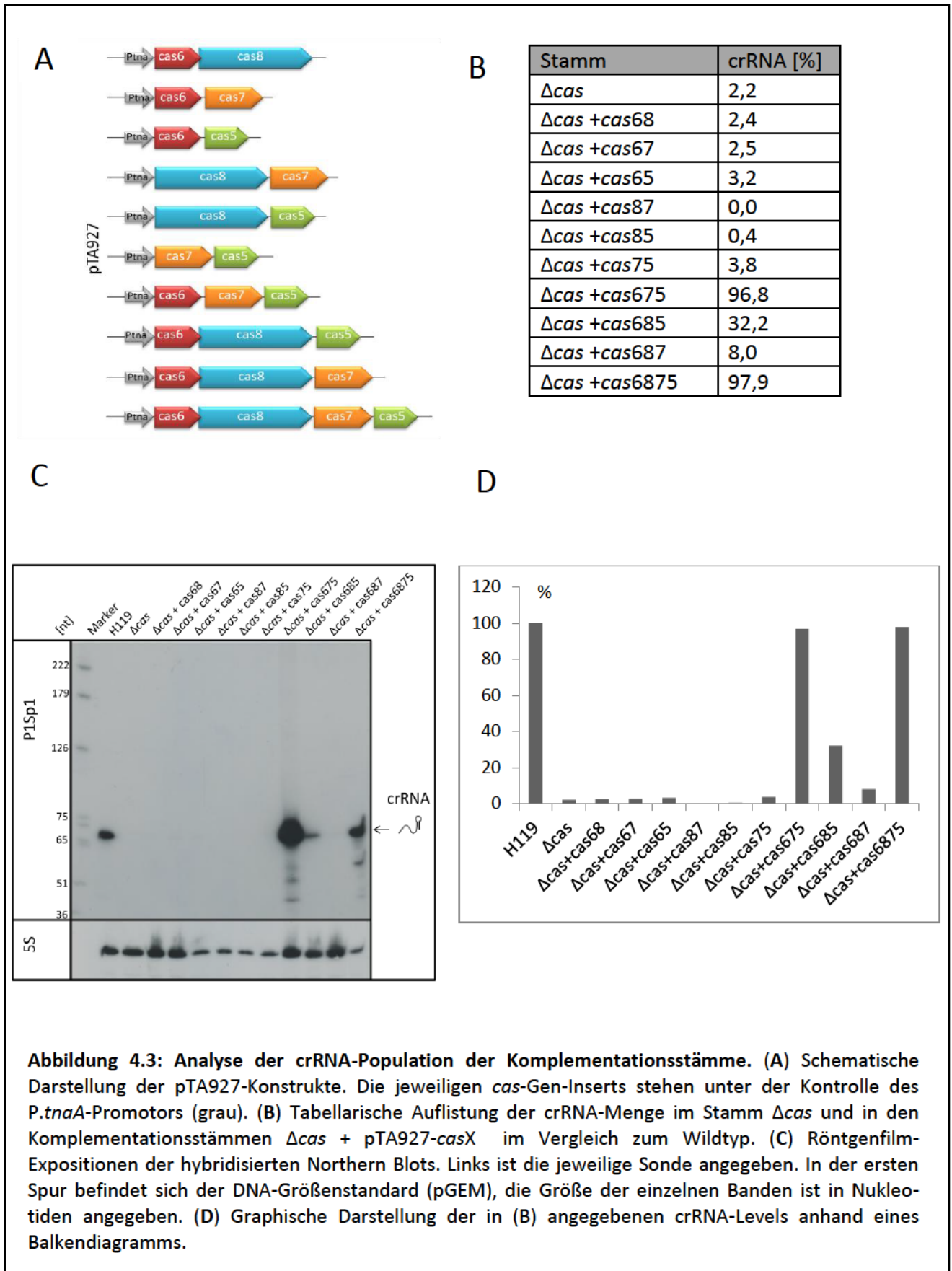
4.2.1.2. Analyse der crRNA-Level der Komplementationsstämme

Um die crRNA-Mengen zu vergleichen, wurde sowohl aus den jeweiligen Komplementationsstämmen als auch aus dem Wildtyp H119 und H26Δ*cas*(28) Gesamt-RNA isoliert, anhand eines Polyacrylamidgels aufgetrennt und ein Northern Blot durchgeführt. Anschließend erfolgte die Detektion der crRNA durch eine radioaktiv markierte Sonde, welche dem ersten Spacer des CRISPR-Locus P1 komplementär ist und damit an die entsprechende crRNA bindet (P1Sp1). In einer weiteren Detektion wurde eine Sonde verwendet, welche mit der konstitutiv exprimierten 5S-rRNA hybridisiert, um damit eventuelle Unterschiede in der Menge der geladenen RNA bestimmen zu können. Zuletzt erfolgte eine quantitative Bestimmung der crRNA-Menge im Falle jeder der verschiedenen Komplementationsstämme. Dazu wurde mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogramms (ImageJ) eine Quantifizierung der Intensität der erhaltenen Banden vorgenommen und der Wert für die crRNA-Banden ins Verhältnis zur 5S rRNA-Ladekontrolle gesetzt (siehe Kapitel 3.7.4.). Schließlich erfolgte die Bestimmung der Prozentualität der crRNA-Menge in den Komplementationsstämmen im Vergleich zum Wildtyp.

Wie in Abbildung 4.3 zu sehen ist, konnte im Falle der Komplementation mit den Konstrukten pTA927-*cas*675 und pTA927-*cas*6875 ein crRNA-Level vergleichbar zum Wildtyp beobachtet werden (98 % bzw. 97 %). Die Komplementation mit dem Konstrukt pTA927-*cas*685 ergab eine reduzierte crRNA-Menge von 32 % im Vergleich zum Wildtyp. Im Falle aller anderen Konstrukte konnte keine relevante Menge an reifer crRNA mehr detektiert werden, ebenso wie im Stamm H26Δ*cas*(28).

4.2.1.3. Herstellung der *cas*-Gen-Knockout Stämme

Um mehrere verschiedene *cas*-Gene aus dem Genom von *H. volcanii* zu entfernen, wurde die Pop-in/Pop-out-Methode nach Allers & Ngo angewendet (ALLERS&NGO, 2003). Dazu wird ein integratives Plasmid verwendet, welches flankierende Regionen zu dem zu entfernenden Bereich enthält. Dabei handelt es sich um ein Plasmid, welches keinen Replikationsursprung für *H. volcanii* aufweist und demzufolge nicht repliziert wird. Außerdem ist als Auxotrophie-Marker das *pyrE2*-Gen vorhanden, welches für die Orotat-Phosphoribosyltransferase kodiert, ein essentielles Enzym der Uracil-Synthese. Durch Einbringen des Plasmids in *H. volcanii*-Zellen durch Transformation und darauffolgende Selektion auf Uracil-Mangelmedium können Klone erhalten werden, welche das Plasmid durch homologe Rekombination über die flankierenden Regionen in das Genom integriert haben (Pop In). Im



Folgenden werden diese Zellen 5-Fluororotsäure ausgesetzt, welches durch die Orotat-Phosphoribosyltransferase in ein toxisches Produkt umgesetzt wird. Es können dadurch Klone selektiert werden, welche wiederum durch homologe Rekombination über eine der flankierenden Regionen das *pyrE2*-tragende Plasmid wieder aus dem Genom entfernt haben (Pop-out). Je nach dem, welche der flankierenden Regionen jeweils für die Rekombination benutzt wurde, ergeben sich bei den Pop-out-Klonen einerseits wieder Wildtyp-Zellen und andererseits Klone, bei welchen die entsprechende Region aus dem Genom entfernt wurde (siehe Abbildung 4.4).

Für die Entfernung verschiedener Bereiche innerhalb des *cas*-Operons wurden insgesamt sechs Konstrukte verwendet. Dafür wurden flankierende Regionen in den integrativen Vektor pTA131 eingebracht. Die Auswahl der flankierenden Bereiche ist der Abbildung 4.4 zu entnehmen. Die jeweiligen Konstrukte und deren Verwendung ist in Tabelle 4.1 angegeben, eine detaillierte Beschreibung der Herstellung in Kapitel 3.2.3. Die integrativen Plasmide wurden durch Transformation in verschiedene *H. volcanii*-Stämme eingebracht und die Pop-in/Pop-out Methode angewendet. Die so erhaltenen Pop-out-Klone wurden mittels Test-PCR überprüft, um Wildtyp-Klone von Knockout-Klonen zu unterscheiden (siehe Kapitel 3.5.). Potentielle Knockout-Klone wurden desweiteren durch Sondenhybridisierung eines Southern Blots überprüft, was im folgenden Kapitel näher beschrieben werden soll. Der Tabelle 4.1 ist ein Aufstellung der insgesamt generierten Knockout-Stämme zu entnehmen.

Stamm	Ursprungsstamm	verwendetes Plasmid	Genotyp (H119)
„6875“	H119	pTA131-up3do2	$\Delta cas1, \Delta cas2, \Delta cas3, \Delta cas4$
„687“	H119	pTA131-up5do2	$\Delta cas1, \Delta cas2, \Delta cas3, \Delta cas4, \Delta cas5$
„685“	H119 $\Delta cas7^*$	pTA131-up3do2	$\Delta cas1, \Delta cas2, \Delta cas3, \Delta cas4, \Delta cas7$
„675“	H119 $\Delta cas8^*$	pTA131-up3do2	$\Delta cas1, \Delta cas2, \Delta cas3, \Delta cas4, \Delta cas8$
„68“	H119	pTA131-up7do2	$\Delta cas1, \Delta cas2, \Delta cas3, \Delta cas4, \Delta cas5, \Delta cas7$
„67“	H119 $\Delta cas8^*$	pTA131-up5do2	$\Delta cas1, \Delta cas2, \Delta cas3, \Delta cas4, \Delta cas5, \Delta cas8$
„65“	H119 „6875“	pTA131-up8do7	$\Delta cas1, \Delta cas2, \Delta cas3, \Delta cas4, \Delta cas7, \Delta cas8$
„87“	H119 $\Delta cas6^*$	pTA131-up5do2	$\Delta cas1, \Delta cas2, \Delta cas3, \Delta cas4, \Delta cas5, \Delta cas6,$
„85“	H119 „685“	pTA131-up6do6	$\Delta cas1, \Delta cas2, \Delta cas3, \Delta cas4, \Delta cas6, \Delta cas7$
„75“	H119 „6875“	pTA131-up6do8	$\Delta cas1, \Delta cas2, \Delta cas3, \Delta cas4, \Delta cas6, \Delta cas8$

Tabelle 4.1: Aufstellung der generierten Knockout-Stämme. In der ersten Spalte erfolgt die Benennung des jeweiligen Stammes nach den noch vorhandenen *cas*-Genen. In Spalte zwei ist der Ursprungsstamm aufgeführt, welcher als Basis für die Entfernung der jeweiligen Bereiche diente. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Stämme wurden von Frau Britta Stoll generiert (STOLL, 2013). In der dritten Spalte ist das jeweils verwendete Plasmidkonstrukt angegeben. In der letzten Spalte ist der Genotyp des neu generierten Stammes angegeben, wobei für alle der genetische Hintergrund des Stammes H119 gilt ($\Delta leuB, \Delta trpA, \Delta pyrE2$).

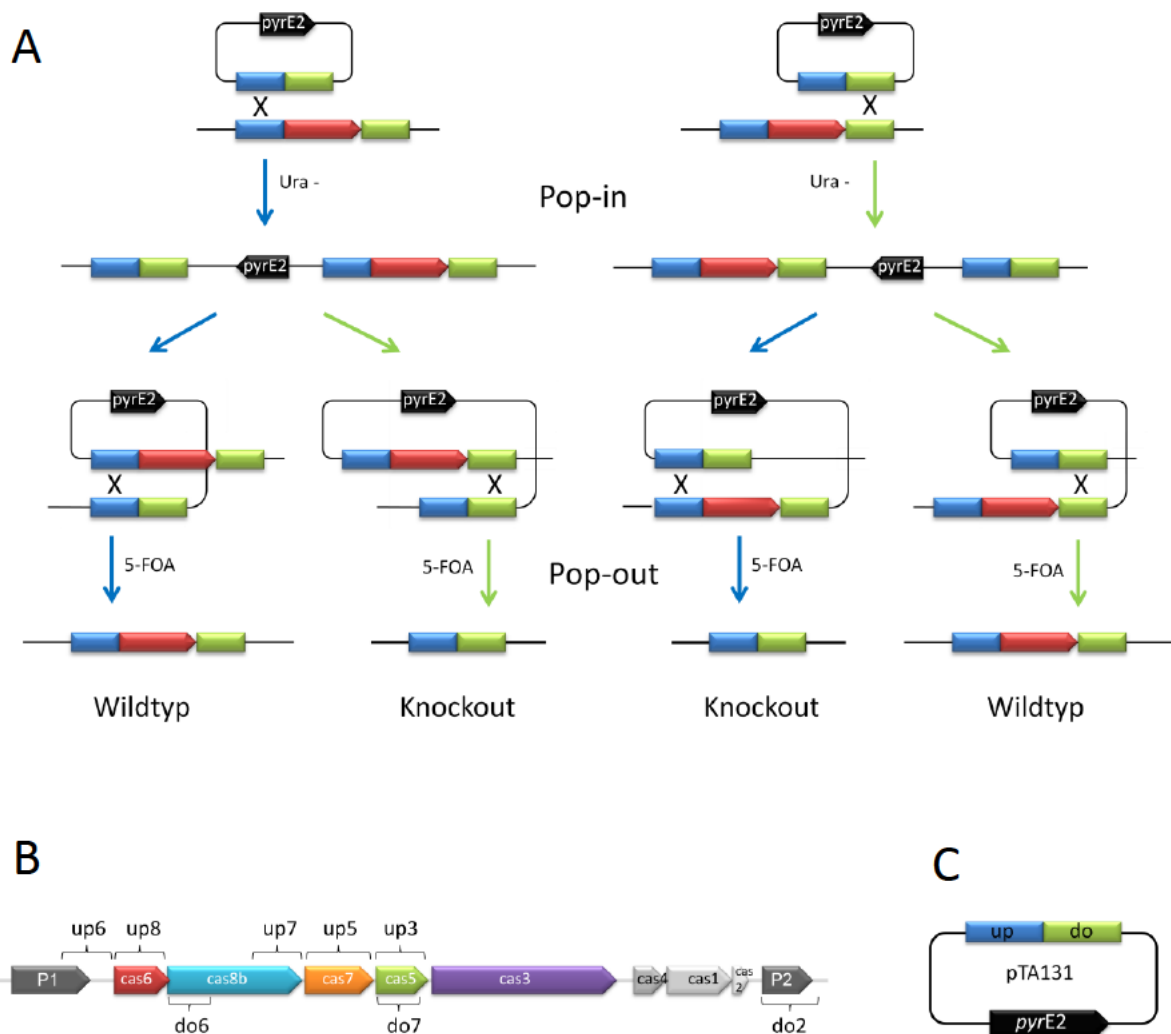
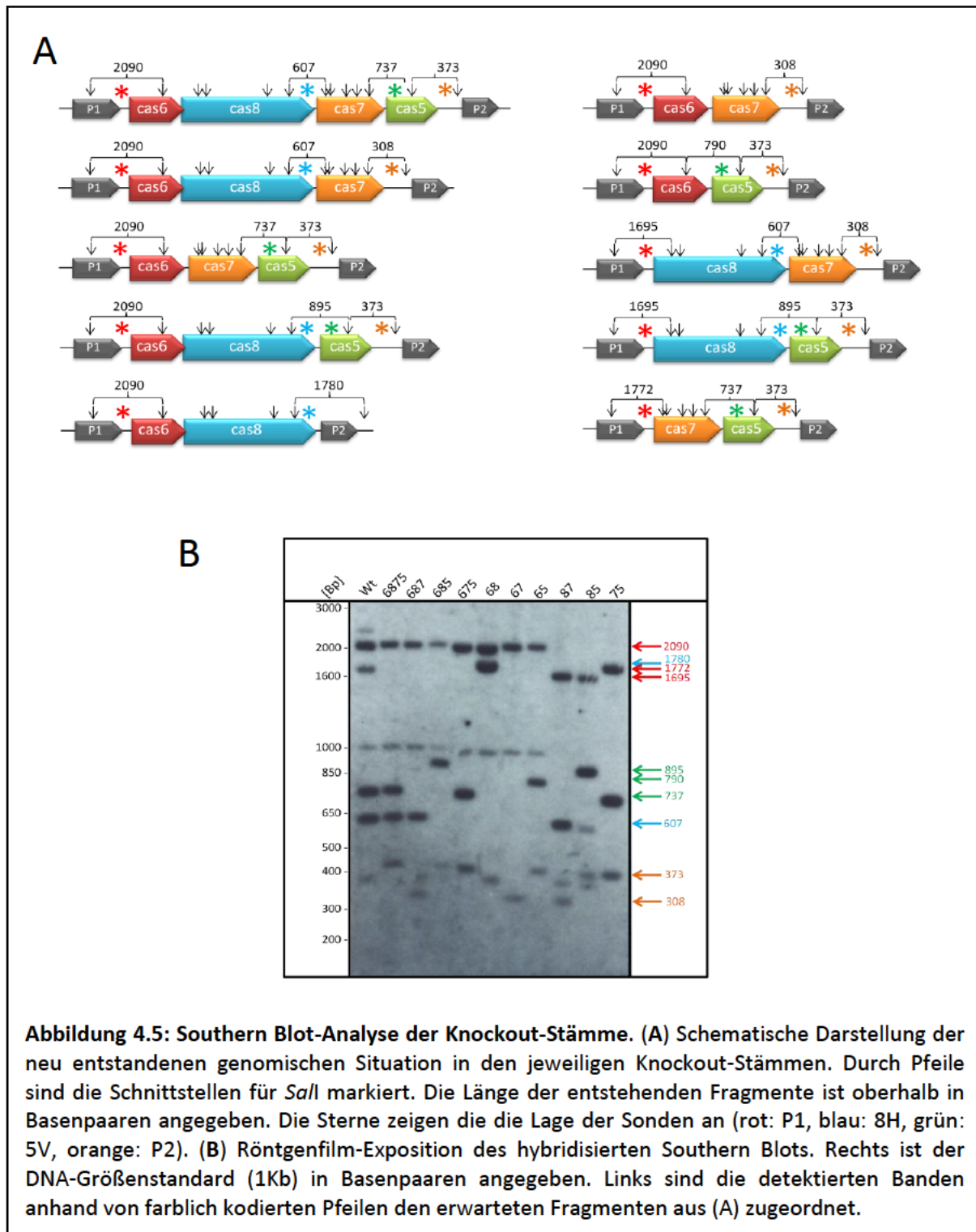


Abbildung 4.4: Herstellung der Knockout-Stämme. (A) Prinzip der Pop-in/Pop-out-Methode zur Entfernung von Genen (Knockout) in *H. volcanii* nach Allers und Ngo (ALLERS&NGO, 2003). Nach Transformation mit dem integrativen Plasmid, welches das *pyrE2*-Gen (schwarz) als Auxotrophie-Marker und die flankierenden Regionen (blau, grün) des zu entfernenden Bereichs (rot) trägt, kommt es zur Integration des Plasmids durch homologe Rekombination (X) über eine der flankierenden Regionen (Pop-in). Entsprechende Klone können mit Hilfe von Uracil-Mangelmedium selektiert werden. Durch erneute Rekombination (X) wird das Plasmid wieder aus dem Genom entfernt (Pop-out). Die Selektion erfolgt durch 5-Fluororotsäure (5-FOA). Je nach dem, über welche der flankierenden Regionen die jeweiligen Rekombinationen stattfinden (blau: stromaufwärts, grün: stromabwärts des zu entfernenden Bereichs), ergeben sich Wildtyp- oder Knockout-Klone. (B) Auswahl der flankierenden Regionen. In der schematischen Darstellung des *cas*-Operons von *H. volcanii* sind die als flankierende Regionen verwendeten Bereiche mit geschweiften Klammern eingezeichnet. Die Benennung erfolgt nach der Lage stromaufwärts (up) und stromabwärts (do) des zu entfernenden Bereichs und dem nebenliegenden Gen. P1 und P2 bezeichnen die CRISPR-Loci. (C) Schematische Darstellung der Konstrukte. In den integrativen Vektor pTA131, welcher das *pyrE2*-Gen (schwarz) enthält, werden jeweils beide flankierenden Regionen (blau, grün) eingebracht.

4.2.1.4. Überprüfung der Knockout-Stämme durch Southern Blot

Um die Entfernung der jeweiligen Bereiche des *cas*-Operons zu verifizieren, wurden potentielle Knockout-Klone, welche anhand von Test-PCRs identifiziert worden waren, einer Analyse durch Sondenhybridisierung eines Southern Blots unterzogen. Dazu wurde genomische DNA aus Flüssigkulturen der entsprechenden Klone isoliert und mit dem Restrik-



tionsenzym *SalI* verdaut. Die entstandenen Fragmente wurden anhand eines Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt und ein Southern Blot durchgeführt. Im Anschluss wurden mit Hilfe von vier verschiedenen radioaktiv markierten Sonden diverse Fragmente detektiert (Abbildung 4.5). Eine detaillierte Angabe zur Herstellung der Sonden ist dem Kapitel 3.6.3. zu entnehmen.

Wie in Abbildung 4.5 ersichtlich ist, konnten alle für die entsprechenden Knockouts erwarteten Fragmente detektiert werden, wobei die Banden im Falle der Sonde P2 vergleichsweise schwach sind. Allerdings ergaben sich auch diverse weitere, schwache Banden, welche jedoch keinen durch *SalI*-Verdau des *cas*-Operons entstehenden Fragmenten zugeordnet werden können.

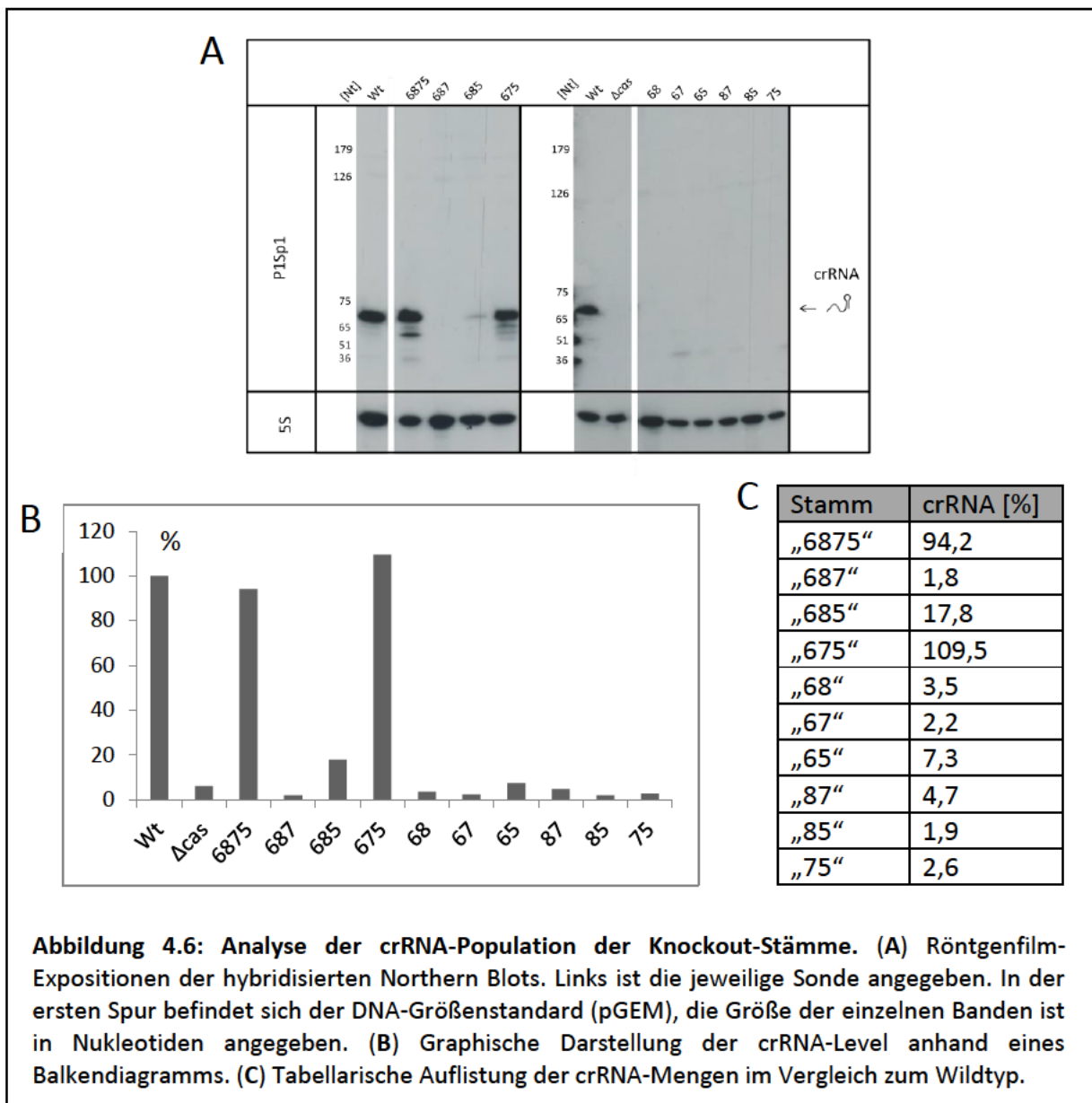
4.2.1.5. Analyse der crRNA-Level der Knockout-Stämme

Die intrazellulären crRNA-Mengen in den jeweiligen Knockout-Stämmen wurden anhand von Northern-Blot-Analysen ermittelt. Dazu wurden Detektionen mit den Sonden P1Sp1 und 5S durchgeführt, die erhaltenen Banden quantifiziert und die Prozentualität der crRNA-Menge im Vergleich zum Wildtyp ermittelt (siehe Kapitel 4.2.1.2.).

Wie in Abbildung 4.6 ersichtlich wird, konnte im Falle der Knockout-Stämme „6875“ und „675“ zum Wildtyp vergleichbare crRNA-Level von 94 % und 110 % ermittelt werden. Der Stamm „685“ zeigt eine reduzierte crRNA-Menge von 18 %. In allen anderen Knockout-Stämmen konnte keine relevanten Mengen crRNA detektiert werden.

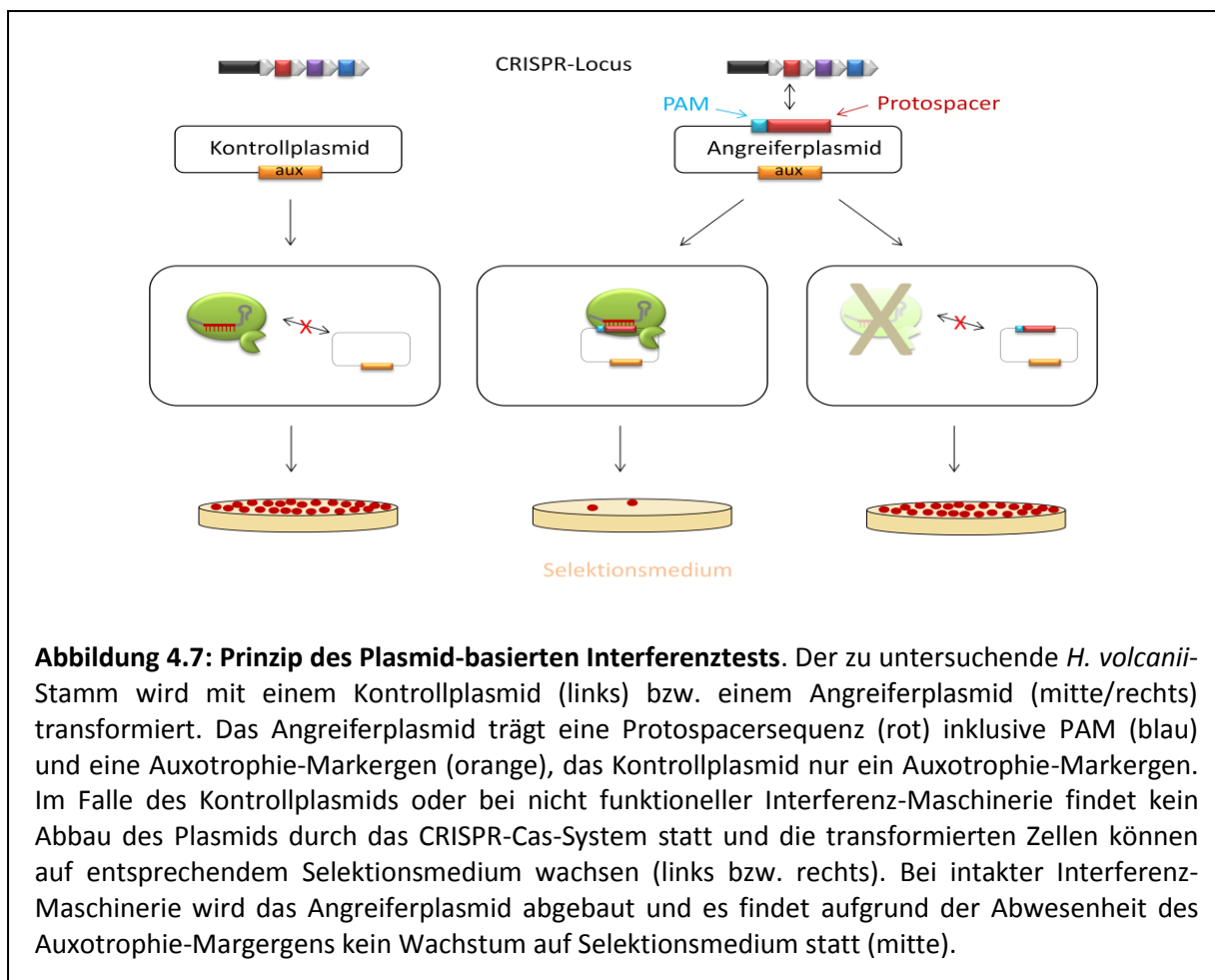
4.2.1.6. Untersuchung der Interferenz in den Knockoutstämmen „6875“ und „675“

Um zu ermitteln, ob die Stämme „6875“ und „675“ zur Interferenz fähig sind, wurden Interferenztests durchgeführt. Dazu wurde ein Angreifer mit Hilfe eines Plasmids imitiert, welches eine entsprechende Protospacer-Sequenz inklusive eines PAM-Motivs trägt. Dieses Konstrukt wird durch Transformation in den *H. volcanii*-Stamm eingebracht. Im Falle einer erfolgreichen Interferenzreaktion wird das Plasmid als fremd erkannt und abgebaut. Da das Plasmid außerdem einen Auxotrophie-Marker enthält, kann auf entsprechendem Selektionsmedium eine reduzierte Transformationseffizienz beobachtet werden. Als Kontrolle der Transformation dient ein Plasmid ohne Protospacer und PAM (Abbildung 4.7). Die Transformationsansätze werden auf einem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert, bei 45 °C inkubiert, die Anzahl der gewachsenen Kolonien ermittelt und die Werte für die Angreiferplasmide mit denjenigen des Kontrollplasmids ins Verhältnis gesetzt. Eine erfolgreiche Interferenzreaktion ist definiert, wenn die Reduktion der Transformationseffizienz im Falle des Angreiferplasmids mindestens das Hundertfache im Vergleich zum Kontrollplasmid beträgt (FISCHER ET AL., 2012). Für den Interferenztest der Stämme „6875“ und „675“ wurden



als Angreiferplasmide pTA409-Konstrukte verwendet, welche als Auxotrophie-Marker das *pyrE2*-Gen aufweisen. Dieses kodiert für die Orotat-Phosphoribosyltransferase, ein essentielles Enzym der Uracil-Synthese. Daher kann auf Uracil-Mangelmedium selektiert werden.

Zusätzlich wurde in die Stämme „6875“ und „675“ das *cas3*-Gen auf einem Plasmid in Form des Konstrukts pTA927-*cas3*-FlagC (DIEROLF, 2010) eingebracht. Mit diesen Stämmen wurden ebenfalls Interferenztests durchgeführt. Da der Vektor pTA927 ebenfalls das *pyrE2*-Gen als Auxotrophie-Marker besitzt, wurde im Falle dieser Stämme für den Interferenztest der Vektor pTA352 mit dem Markergen *leuB* verwendet. Dieses kodiert für die 3-Isopropylmalat-Dehydrogenase, welche Teil der Leucin-Synthese ist. In diesem Fall kann durch Uracil- und Leucin-Mangelmedium auf beide Plasmide selektiert werden. Die Angreiferplasmide enthalten eine zum ersten Spacer des CRISPR-Locus P1 komplementäre Protospacer-Sequenz und ein funktionelles PAM-Motiv. Jeder Stamm wurde mehrmals und mit jeweils



zwei verschiedenen PAM-Motiven getestet (TTC bzw. ATC). Die Ergebnisse sind im Detail im Anhang 8.10. aufgeführt und in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Dabei ergab sich, dass die Stämme „6875“ und 675“ nicht zur Interferenz fähig sind. Ebenso konnte für den Stamm „675“+pTA927-*cas3*-FlagC keine Interferenz beobachtet werden. Lediglich der Stamm „6875“+pTA927-*cas3*-FlagC zeigte eine erfolgreiche Interferenzreaktion.

Stamm	Reduktionsfaktor	Interferenz
„6875“	1,067	-
„6875“+pTA927- <i>cas3</i> -FlagC	0,003	+
„675“	1,003	-
„675“+pTA927- <i>cas3</i> -FlagC	1,211	-

Tabelle 4.2: Überprüfung der Interferenzreaktion der Stämme „6875“ und „675“ mit und ohne Expression von *cas3*. Angegeben ist jeweils die durchschnittliche Reduktion der Transformations-effizient für das Angreiferplasmid bezogen auf das Kontrollplasmid bei vier Interferenztests. Bei einer Reduktion um mindestens das Hundertfache (Faktor 0,01) ist eine erfolgreiche Interferenz (+) definiert, andernfalls ist die Interferenz nicht erfolgreich (-).

4.2.2. Untersuchung eines *cas5*-Knockout-Stamms

Um die Auswirkung der Entfernung der einzelnen *cas*-Gene auf die Funktion des CRISPR/Cas-Systems genauer untersuchen zu können, wurden innerhalb der Arbeitsgruppe Knockout-Stämme von jedem einzelnen *cas*-Gen generiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dabei ein *cas5*-Knockout-Stamm hergestellt. Dabei wurde die Pop-In/Pop-out-Methode angewendet (siehe Kapitel 4.2.1.3.)

4.2.2.1. Herstellung und Überprüfung des *cas5*-Knockout Stamms

Zur Entfernung des *cas5*-Gens aus dem Genom von *H. volcanii* wurde das integrative Plasmid-Konstrukt pTA131-up5do5 verwendet. Details zur Herstellung sind dem Kapitel 3.2.4. zu entnehmen. Das Konstrukt wurde durch Transformation in den *H. volcanii*-Stamm H119 eingebracht und durch Selektion auf Uracil-Mangelmedium bzw. 5-Fluororotsäurehaltigem Medium Pop-in und Pop-out-Klone selektiert. Pop-out-Klone wurden mittels PCR getestet, um zwischen Wildtyp- und Knockout-Klonen zu unterscheiden (siehe Kapitel 3.5.). Ein potentieller Knockout-Klon wurde im Folgenden durch Southern-Blot-Analyse verifiziert. Die entsprechenden Fragmente wurden durch Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde detektiert, welche in der flankierenden Region stromaufwärts des *cas5*-Gens bindet. Da das Genom von *H. volcanii* polyploid ist und in mehreren Kopien in der Zelle vorliegt, wurde eine weitere Detektion mit einer Sonde durchgeführt, welche innerhalb des *cas5*-Gens hybridisiert. Dadurch kann sichergestellt werden, dass bei allen Genomkopien die Knockout-Situation vorhanden ist und keine Kopie des *cas5*-Gens mehr vorhanden ist.

Wie in Abbildung 4.8 ersichtlich ist, konnten die erwarteten Banden detektiert werden. Im Falle der Detektion mit der Sonde, welche im stromaufwärts liegenden Bereich bindet (*cas5*up) ergibt sich beim untersuchten $\Delta cas5$ -Klon eine Bande von ca. 2300 Basenpaaren, während die Wildtyp-Kontrolle eine Bande von 733 Basenpaaren aufweist. Im Falle der Detektion mit der Sonde, welche innerhalb des *cas5*-Gens bindet, sind beim $\Delta cas5$ -Klon keine Banden zu sehen, wohingegen bei der Wildtyp-Kontrolle beide zu erwartenden Banden bei 733 und 2367 Basenpaaren detektiert wurden.

4.2.2.2. Analyse des crRNA-Level im *cas5*-Knockout-Stamm

Um die Menge an reifer crRNA im *cas5*-Knockout-Stamm zu bestimmen, wurde Gesamt-RNA isoliert und die crRNA-Population mit Hilfe von Sondenhybridisierung eines Northern Blots analysiert (siehe Kapitel 4.2.1.2.). Wie in Abbildung 4.8 zu sehen ist, kann im Falle des *cas5*-Knockout-Stamms keine reife crRNA mehr detektiert werden.

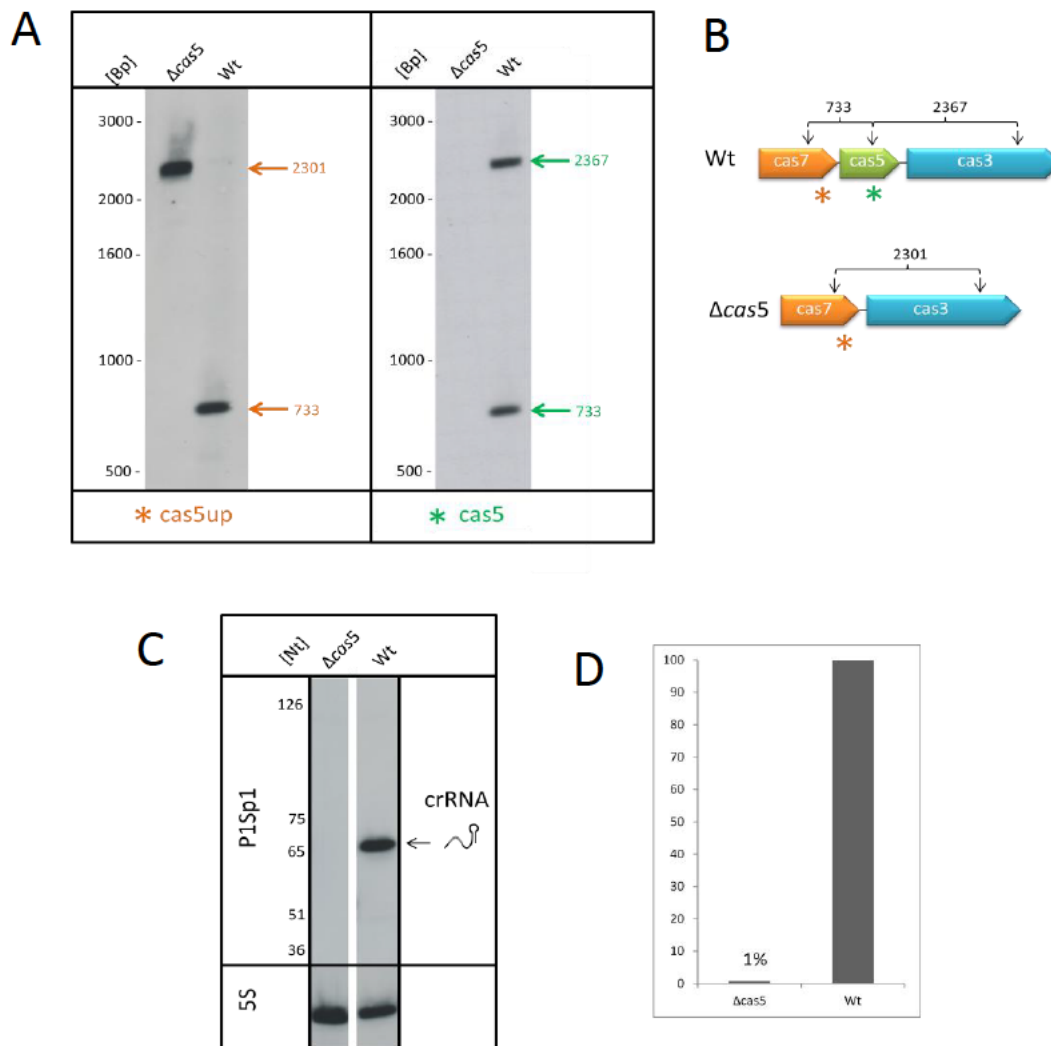


Abbildung 4.8: Analyse des *cas5*-Knockout-Stamms. (A) Röntgenfilm-Expositionen der hybridisierten Southern Blots. Unten sind die jeweils verwendeten Sonden angegeben. Die Digoxigenin-markierten Sonden wurden durch einen spezifischen Antikörper und Chemilumineszenz detektiert. Links ist der DNA-Größenstandard (1Kb) in Basenpaaren angegeben, rechts sind die Fragmente den erwarteten aus (B) zugeordnet. (B) Schematische Darstellung der genomischen Situation im Wildtyp (Wt) und im *cas5*-Knockout-Stamm ($\Delta cas5$). Die Pfeile markieren Restriktionsschnittstellen von *Sal*I. Durch Klammern sind die durch den Verdau entstehenden Fragmente und deren Größe in Basenpaaren angegeben. Die Lage der Sonden ist durch farbige Sterne (*) angezeigt. Die Sonde *cas5up* (orange) erstreckt sich über 200 Nukleotide stromaufwärts des *cas5*-Gens, die Sonde *cas5* (grün) entspricht der vollen Länge des *cas5*-Gens. (C) Analyse der crRNA-Population. Röntgenfilm-Expositionen von hybridisierten Northern Blots. Links sind die radioaktiv markierten Sonden angegeben. Der DNA-Größenstandard (pGEM) ist in Nukleotiden angegeben. (D) Quantifizierung der crRNA-Menge im *cas5*-Knockout-Stamm im Vergleich zum Wildtyp.

4.2.3. Untersuchung des putativen Cascade-Komplexes

Von anderen Typ I CRISPR/Cas-Systemen ist bekannt, dass sowohl für die Biogenese der reifen crRNA, als auch für die nachfolgende Interferenz ein Cascade-Komplex aus diversen Cas-Proteinen vorkommt. Dabei sind Cas5, Cas6, Cas7 und Cas8 als Untereinheiten vertreten (siehe Abbildung 1.5). Um zu ermitteln, ob auch in *H. volcanii* ein Cascade-Komplex gebildet wird und welche Cas-Proteine daran beteiligt sind, wurde jeweils eine der putativ beteiligten Komponenten mit einem Affinitäts-Tag versehen, aus einem Gesamt-Zellextrakt gereinigt und überprüft, ob andere Proteine gebunden vorliegen und daher mitgereinigt werden. Wie sich in den vorhergehenden Untersuchungen der crRNA-Prozessierungsmaschinerie ergab, sind die drei Cas-Proteine Cas5, Cas6 und Cas7 an der Prozessierung und/oder der Stabilisierung der crRNA in *H. volcanii* beteiligt. Daher wurden diese Cas-Proteine als putative Komplex-Untereinheiten überprüft. Im Falle von Cas8 konnte gezeigt werden, dass dieses Protein nicht für eine stabile crRNA-Population notwendig ist. In anderen Typ I CRISPR/Cas-Systemen ist Cas8 ebenfalls Teil des Cascade-Komplexes. Seine Bedeutung kommt jedoch erst in der Interferenzphase zum Tragen und liegt in der Erkennung der PAM-Sequenz und möglicherweise in der Rekrutierung von Cas3 als degradierende Nuklease (siehe Kapitel 1.2.2.). Daher wurde auch Cas8 auf eine mögliche Beteiligung an einem Komplex überprüft.

4.2.3.1. Herstellung der Konstrukte und Stämme zur Reinigung des Komplexes

Die gewünschten *cas*-Fusionsgene wurden mit Hilfe eines Plasmids in *H. volcanii* eingebracht. Da die *cas*-Gene vom Genom eher schwach exprimiert werden, wurde nicht nur das mit Affinitäts-Tag versehene *cas*-Gen, sondern auch die anderen putativen Untereinheiten unter Kontrolle des Tryptophan-induzierbaren Promotors *P.tnaA* in das Plasmid kloniert. Auf diese Weise kann vermieden werden, dass eine putative Komponente des Komplexes unterrepräsentiert ist und aus diesem Grund nicht erfasst wird. Dabei wurde die im genomischen Locus vorliegende Reihenfolge der *cas*-Gene eingehalten, um eine möglichst natürliche Situation zu bewahren. Die Einzelheiten der Klonierung sind dem Kapitel 3.2.5. zu entnehmen. Die jeweiligen Plasmide wurden durch Transformation in den *H. volcanii*-Stamm H26Δ*cas*(28) eingebracht, wobei für die Reinigung von *cas5* die Konstrukte pTA927-*cas5*FlagN und pTA352-*cas687* zusammen in den Stamm H119Δ*cas*(7) eingebracht wurden. Um zu überprüfen, ob bei der Affinitätsreinigung möglicherweise Proteine unspezifisch an die Säulenmatrix binden, wurde als Kontrolle außerdem der Stamm H26Δ*cas*(28)+pTA927-*cas687* (siehe 4.2.1.) verwendet, bei dem ebenfalls alle vier putativen Untereinheiten unter Kontrolle des induzierbaren Promotors auf einem Plasmid vorhanden sind, jedoch keine mit einem Affinitäts-Tag versehen ist. Alle verwendeten Konstrukte sind in Abbildung 4.9 schematisch dargestellt.

4.2.3.2. Reinigung der Komponenten des putativen Komplexes

Von den fünf verschiedenen Stämmen wurden jeweils Gesamt-Zellextrakte hergestellt und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Aus dem löslichen Überstand wurden die jeweiligen mit FLAG-Affinitäts-Tag versehenen Cas-Proteine mit Hilfe von FLAG-Agarose gereinigt, welche spezifische Antikörper gegen das FLAG-Peptid gebunden hat. Im Falle des Kontrollstamms, welcher kein FLAG-Fusionsprotein enthält, wurde ebenso verfahren. Die Proteine in den Elutionsfraktionen der jeweiligen Reinigungen wurden anhand von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und einerseits angefärbt (Abbildung 4.9) und andererseits durch Western Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Um die erhaltenen Proteinbanden zu identifizieren, wurden Detektionen von Western Blots mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt (Abbildung 4.10). Dabei wurde einerseits ein Antikörper gegen den Affinitäts-Tag (Anti-FLAG) und zum anderen Cas-spezifische Antikörper (siehe Kapitel 4.1.) verwendet.

Desweiteren wurden einzelne Banden einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Dazu wurden die Elutionsfraktionen anhand von SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt, durch Coomassie angefärbt und die jeweiligen Banden mittels eines Skalpells ausgeschnitten. Die in den Banden enthaltenen Proteine wurden mit Trypsin verdaut und die dabei entstandenen Peptidfragmente massenspektrometrisch untersucht. Dabei ergeben sich für die Peptide spezifische Spektren, welche durch den Vergleich mit Datenbanken Proteinen zugeordnet werden können. So kann für jedes Protein ein Wert von einzigartigen Peptiden angegeben werden, welche diesem zugeordnet werden konnten. Die durch den Trypsin-Verdau entstehenden Peptide können jedoch, vor allem bei kleineren Fragmenten, in mehreren Proteinsequenzen vorkommen und daher auch diesen zugeordnet werden. Außerdem werden beim Ausschneiden der Banden aus dem Polyacrylamidgel auch Spuren anderer Proteine mit ausgeschnitten. Daher ergeben sich bei der Analyse einer Bande Peptid-Werte für mehrere Proteine. Statistisch gesehen ergeben sich bei größeren Proteinen auch höhere Werte. Es ist daher hilfreich, den Peptid-Wert ins Verhältnis zur Proteingröße zu setzen. Letztendlich ist bei demjenigen Protein mit dem höchsten Peptid-Wert, aber auch mit dem größten Peptid-Wert/Proteingrößen-Verhältnis die Wahrscheinlichkeit maximal, dass es sich tatsächlich um dieses Protein handelt. Die massenspektrometrischen Analysen wurden freundlicherweise von Herrn Kundan Sharma (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, Arbeitsgruppe Prof. H. Urlaub) durchgeführt. Die analysierten Banden und Auszüge der Abgleiche mit der Proteindatenbank von *H. volcanii* sind der Abbildung 4. 11 zu entnehmen. Die detaillierten Ergebnisse finden sich im Anhang 8.5.

Wie in den Abbildungen 4.9 und 4.10 ersichtlich wird, konnten bei den Reinigungen aller vier Fusionsproteine diverse Proteinbanden erhalten werden. Im Falle der Reinigung des Extrakts des Kontrollstamms, in welchem keines der überproduzierten Proteine einen Affinitäts-Tag aufweist, ergaben sich keine deutlich sichtbaren Banden. Bei der Reinigung des Cas6-Fusionsproteins zeigte sich eine starke Bande bei ca. 40 kDa, welche sowohl durch den FLAG-

Antikörper als auch den Cas6-Antikörper detektiert wurde. Es ist daher anzunehmen, dass es sich bei dieser Bande um das mit dem FLAG-Tag versehene Cas6-Protein handelt. Desweiteren ist bei ca. 45 kDa eine deutliche Bande erkennbar, welche mit Hilfe des Cas7-

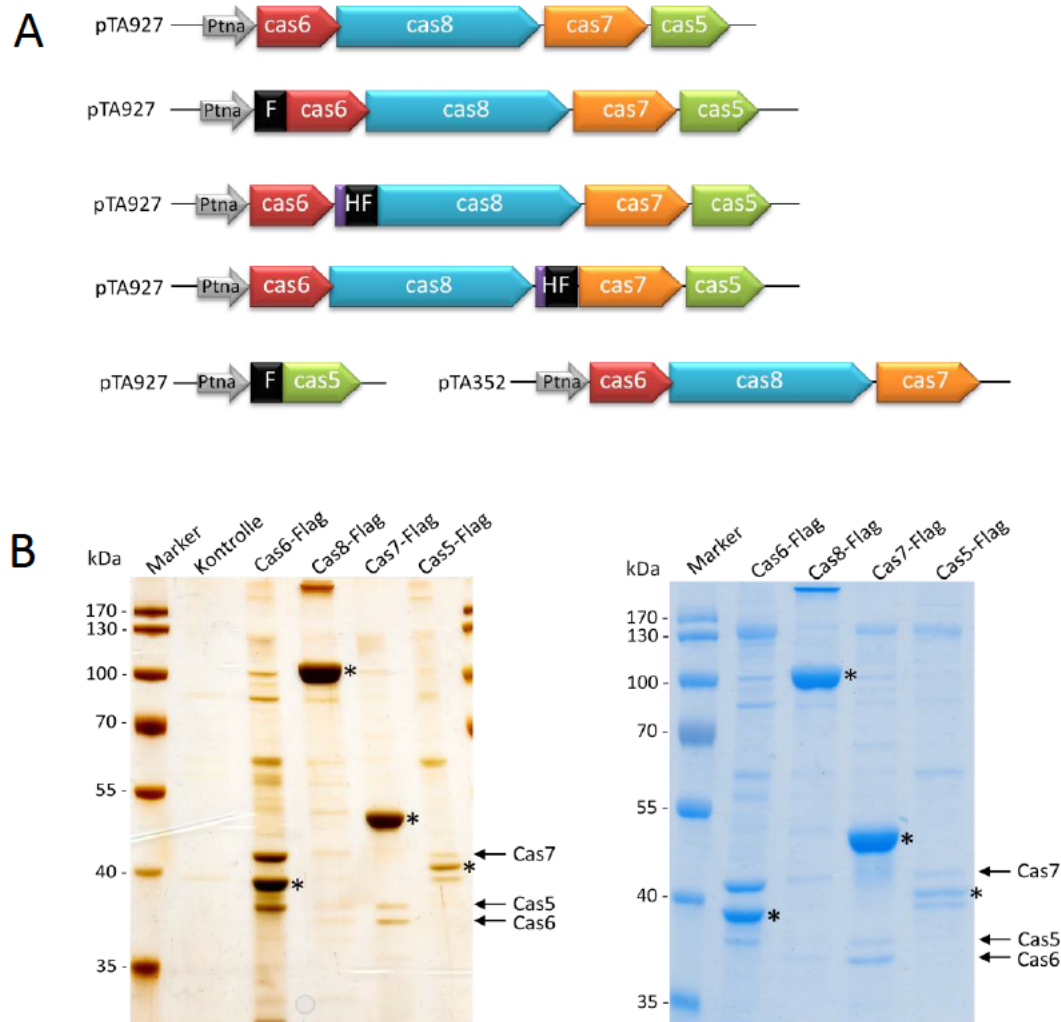


Abbildung 4.9: Reinigung der Komponenten des Cascade-Komplexes. (A) Schematische Darstellung der verwendeten pTA927- bzw. pTA352-Konstrukte. Die jeweiligen *cas*-Gene stehen unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors *P.tnaA* (grau). Jeweils ein *cas*-Gen ist mit einem FLAG- oder 6xHis+FLAG-Affinitäts-Tag (F bzw. HF) fusioniert. Für die Reinigung von Cas5 befinden sich die vier untersuchten *cas*-Gene auf zwei Plasmiden, welche zusammen in einem Stamm vorliegen. (B) Elutionsfraktionen der affinitätschromatographischen Reinigung. Die jeweiligen Fusionsproteine wurden mit Hilfe von FLAG-Agarose aus Zellextrakten gereinigt. Die Elutionsfraktionen wurden anhand von 10% igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinbanden durch Silber (links) bzw. Coomassie (rechts) angefärbt. Der Protein-Größenstandard ist links in kDa angegeben. Durch Sterne (*) sind jeweils die Banden der FLAG-Fusionsproteine markiert. Rechts sind durch Pfeile die Cas5, Cas6 und Cas7 entsprechenden Banden bezeichnet. Die Identifikation erfolgte durch Antikörperdetektion und massenspektrometrische Analyse (siehe Abbildungen 4.10 und 4.11).

Antikörpers detektiert werden konnte, wobei dieser Antikörper jedoch ein weiteres, schwaches Signal bei ca. 40 kDa zeigt. Die massenspektrometrische Analyse der Bande bei ca. 45 kDa (Abbildung 4.11, #1) ergab den höchsten Peptid-Wert für Cas7. Eine weitere deutliche Bande ist bei der Reinigung des Cas6-Fusionsproteins bei ca. 38 kDa zu sehen. Diese konnte mit Hilfe des Cas5-Antikörpers detektiert werden, wobei sich auch hier ein weiteres, schwächeres Signal bei ca. 40 kDa ergab. Bei der massenspektrometrischen Analyse der Bande bei ca. 38 kDa (#2) ergab sich der der höchste Peptid-Wert für Cas5. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass bei der Reinigung des Cas6-Fusionsproteins Cas5 und Cas7 mitgereinigt wurden, wobei alle Proteine im Vergleich zum Proteingrößenstandard ein höheres Molekulargewicht vermuten lassen als das für die Länge der Aminosäuresequenz zu erwartende theoretische. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Proteine in *H. volcanii* aufgrund der Anpassung an die ionenstarke Umgebung im Zytosol viele negativ geladene, saure Aminosäurereste aufweisen. Dadurch können sich die SDS-Moleküle, durch

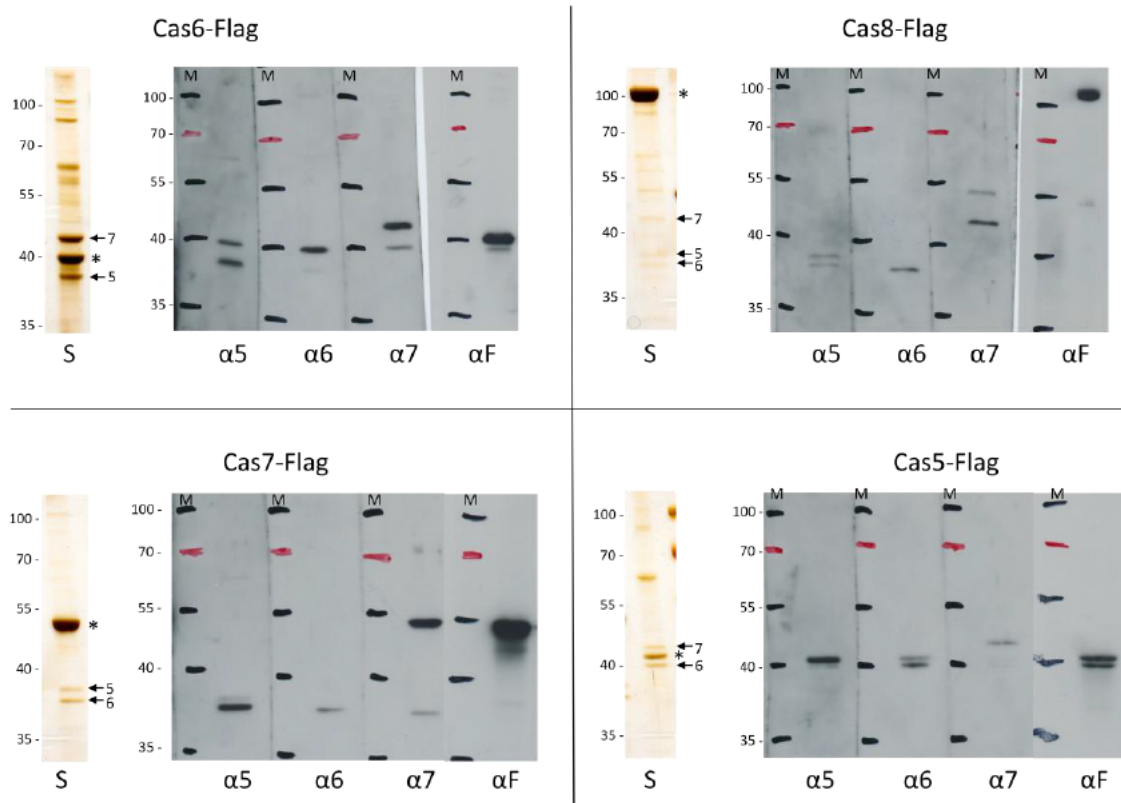
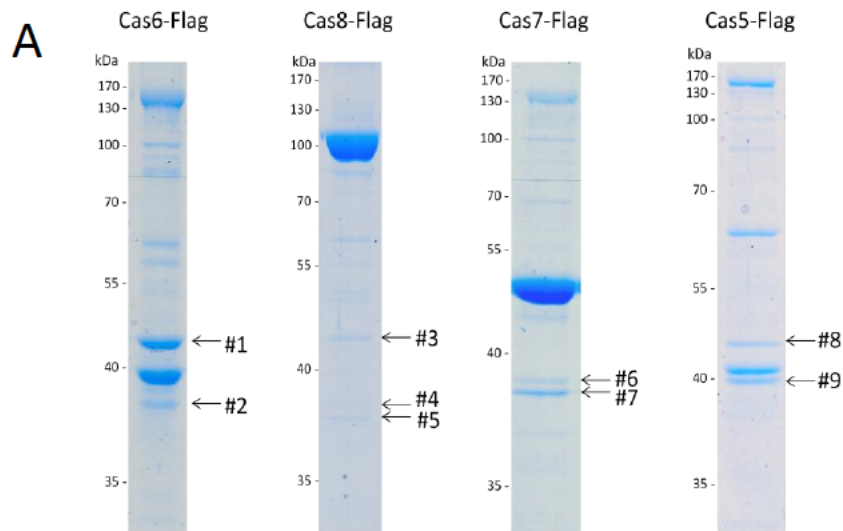


Abbildung 4.10: Antikörper-Detektionen der Elutionsfraktionen der Cas-Fusionsprotein-Reinigungen. Oberhalb ist jeweils das gereinigte Fusionsprotein angegeben. Links ist jeweils die silbergefärbte Elutionsfraktion gezeigt (S). Die anhand der massenspektrometrischen Analyse (siehe Abbildung 4.11) identifizierten Banden sind mit Pfeilen bezeichnet (5=Cas5, 6=Cas6, 7=Cas7). Der Stern (*) markiert das jeweilige FLAG-Fusionsprotein. Links sind jeweils die Antikörperdetektionen von Western Blots der Elutionsfraktionen durch die Antikörper Anti-Cas5 ($\alpha 5$), Anti-Cas6 ($\alpha 6$), Anti-Cas7 ($\alpha 7$) und Anti-FLAG (αF) abgebildet. Die Markerbanden des Proteingrößenstandards (M) sind eingezeichnet und in kDa angegeben.

welche eine einheitliche Ladung der denaturierten Proteine während der Gelelektrophorese erreicht werden soll, schlechter anlagern. Daraus folgt, dass die Proteine weniger negativ geladen sind und sich daher im elektrischen Feld im Vergleich zu den Proteinen des Größenstandards langsamer fortbewegen.

Die Reinigung des Cas8-Fusionsproteins zeigte eine dominante Bande bei ca. 100 kDa, welche durch die Detektion mit dem FLAG-Antikörper eindeutig als Cas8 identifiziert werden konnte. Ansonsten konnten nur schwache weitere Banden erhalten werden. Die Detektionen mit den Cas-Protein-spezifischen Antikörpern ergaben für den Cas5-Antikörper zwei Signale bei ca. 37 und 38 kDa, für den Cas6-Antikörper ein Signal bei ca. 37 kDa und für den Cas7-Antikörper ein stärkeres Signal bei ca. 45 kDa und ein schwächeres bei ca. 52 kDa. Durch die massenspektrometrische Analyse zeigte sich, dass die durch den Cas6-Antikörper erkannte Bande auch den höchsten Peptid-Wert für Cas6 aufwies (#5). Für diejenige Bande, welche das stärkere Signal bei der Detektion mit dem Cas7-Antikörper ergab (#3), zeigten sich hohe Peptid-Werte sowohl für Cas8 als auch für Cas7. Cas8 ist aufgrund seines theoretischen Molekulargewichts jedoch nicht bei dieser Größe zu erwarten. Außerdem ist das Verhältnis von Peptid-Wert zu Proteingröße deutlich geringer als bei Cas7. Der hohe Peptid-Wert für Cas8 bei dieser Bande ist wahrscheinlich eher auf Abbauprodukte des Cas8-Fusionsproteins zurückzuführen. Desweiteren zeigt die Bande im Vergleich dieselbe Größe wie die in den Cas5- und Cas6-Reinigungen eindeutig als Cas7 identifizierten Banden. Es ist also anzunehmen, dass es sich bei dieser Bande um Cas7 handelt. Bei der massenspektrometrischen Analyse der Bande bei ca. 38 kDa (#4) konnte ein hoher Peptid-Wert für Cas5 ermittelt werden, allerdings auch für Cas8. Im Verhältnis zur Größe von Cas8 ist dieser jedoch vergleichsweise gering. Es handelt sich daher wahrscheinlich um Abbauprodukte. Desweiteren entspricht diese Bande derselben Größe wie die als Cas5 identifizierte Bande bei der Reinigung der Cas6- und Cas7-Fusionsproteine. Es kann also festgehalten werden, dass in der Elutionsfraktion bei der Reinigung des Cas8-Fusionsproteins Cas5, Cas6 und Cas7 zu finden sind, allerdings nur in geringem Ausmaß.

Die Reinigung des Cas7-Fusionsproteins ergab neben einer dominanten Bande bei ca. 54 kDa zwei weitere Banden bei ca. 37 und 38 kDa. Die Bande bei ca. 54 kDa konnte anhand der Detektionen mit dem FLAG-Antikörper und dem Cas7-Antikörper als das Cas7-Fusionsprotein identifiziert werden, wobei der Cas7-Antikörper ein weiteres schwaches Signal bei ca. 37 kDa zeigte. Die dort zu findende Bande wurde allerdings auch vom Cas6-Antikörper erkannt und zeigte außerdem in der massenspektrometrischen Analyse den höchsten Peptid-Wert für Cas6 (#7). Die Bande bei ca. 38 kDa (#6) wies den höchsten Peptid-Wert für Cas5 auf und wurde auch vom Cas5-Antikörper detektiert. Allerdings ergab sich auch ein zweites, sogar stärkeres Signal bei ca. 37 kDa. Da diese Bande jedoch als Cas6 identifiziert wurde und auch aufgrund des Vergleichs zu den anderen Reinigungen ist anzunehmen, dass es sich dabei um ein unspezifisches Signal handelt und die Bande bei ca. 38 kDa Cas5 entspricht. Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass bei der Reinigung des Cas7-Fusionsproteins Cas5 und Cas6 mitgereinigt wurden.



B

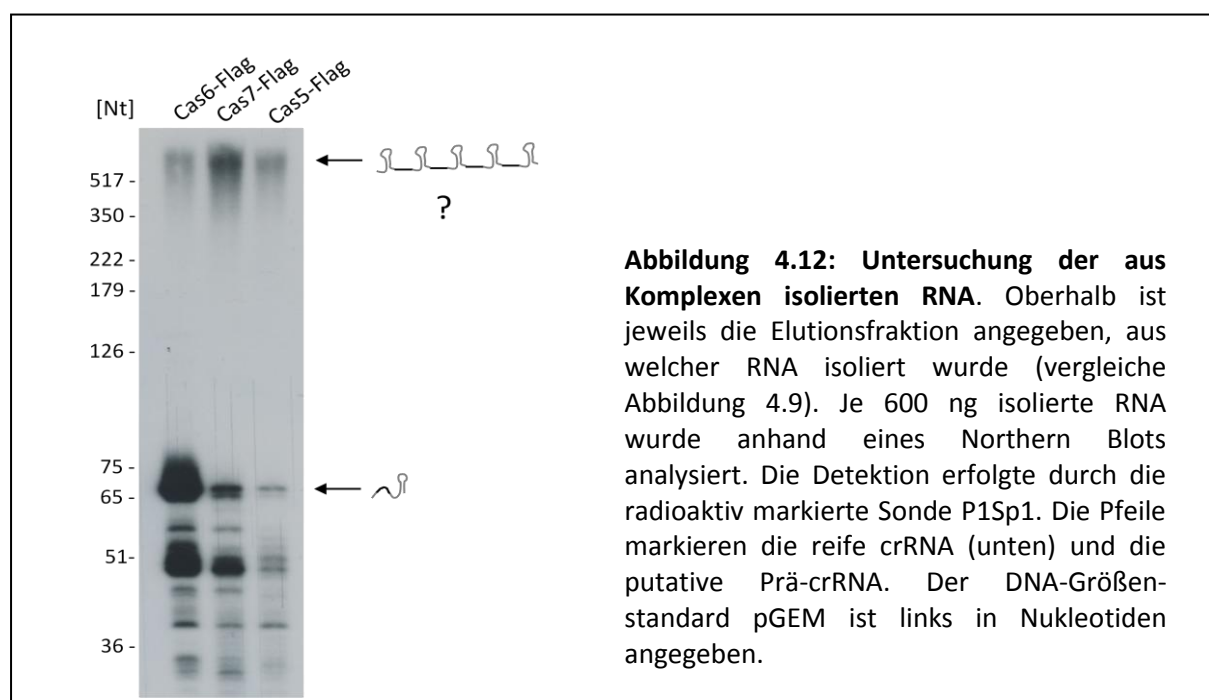
Bande	Identifizierte Proteine	Größe [kDa]	Anzahl einzigartiger Peptide	Verhältnis Peptide/Größe
#1	Cas7	38	49	1,3
	RadA	37	22	0,6
#2	Cas5	29	36	1,2
	Cas6	31	20	0,6
#3	Cas8	76	32	0,4
	Cas7	38	30	0,8
#4	Cas5	29	10	0,3
	Cas8	76	10	0,1
#5	Cas6	31	25	0,8
	Cas5	29	14	0,5
#6	Cas5	29	23	0,8
	Cas6	31	13	0,4
#7	Cas6	31	38	1,2
	Cas5	29	12	0,4
#8	Cas7	38	26	0,7
	RadA	37	20	0,5
#9	Cas6	31	22	0,7
	Cas5	29	11	0,4

Abbildung 4.11: Massenspektrometrische Analyse einzelner Proteinbanden. (A) Coomassie-gefärbtes Proteingel der elektrophoretisch aufgetrennten Elutionfraktionen. Oben ist jeweils das gereinigte Cas-Fusionsprotein vermerkt. Der Proteingrößenstandard ist in kDa angegeben. Die mit # gekennzeichneten Banden wurden ausgeschnitten und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen (B) Auszug der Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse. Für jede Bande sind diejenigen Proteine angegeben, für welche die meisten und zweitmeisten einzigartigen Peptide gefunden wurden. In Spalte drei ist die Größe des jeweiligen Proteins angegeben, in Spalte vier die Anzahl der einzigartigen Peptide. In Spalte fünf wurde das Verhältnis von Peptid-Wert zur Proteingröße berechnet.

Bei der Reinigung des Cas5-Fusionsproteins ergaben sich vier dominante Banden bei ca. 60 kDa, 45 kDa, 41 kDa und 39 kDa. Die Bande bei ca. 45 kDa konnte sowohl anhand des Cas7-Antikörpers als auch durch die massenspektrometrische Analyse als Cas7 identifiziert werden (#8). Desweiteren weist sie dieselbe Größe auf wie die bei den anderen Reinigungen als Cas7 identifizierten Banden. Die Bande bei ca. 41 kDa wird sowohl vom Cas5- als auch vom FLAG-Antikörper detektiert, weswegen anzunehmen ist, dass es sich hier um das Cas5-Fusionprotein handelt. Die Bande bei ca. 39 kDa ergab bei der massenspektrometrischen Analyse den höchsten Peptid-Wert für Cas6 und wurde außerdem vom Cas6-Antikörper erkannt. Allerdings ergab sich auch bei der Detektion mit dem FLAG-Antikörper ein Signal für diese Bande. Überraschend ist hierbei auch, dass die Größe dieser Bande nicht den ca. 37 kDa entspricht, die sich bei den anderen Reinigungen für Cas6 ergaben. Es kann also nicht mit zweifelsfreier Sicherheit gesagt werden, dass es sich bei dieser Bande um Cas6 handelt. Jedoch kann eindeutig festgestellt werden, dass Cas7 bei der Reinigung des Cas5-Fusionsproteins mitgereinigt wurde.

4.2.3.3. Isolation von RNA aus den putativen Komplexen

Um zu untersuchen, ob bei der Ko-Aufreinigung der Komplexe crRNA mitgereinigt wurde, wurde aus den Eluaten RNA isoliert. Dabei wurden die Elutionsfraktionen der Ko-Aufreinigungen von Cas5-Flag, Cas6-Flag und Cas7-Flag verwendet. Aus allen drei Eluaten konnte RNA isoliert werden. Gleiche Mengen der gewonnenen RNA wurden anhand eines Harnstoff-Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt und ein Northern Blot durchgeführt. Die Isolation der RNA und die Detektion des Northern Blots wurden freundlicherweise von Frau Elisabeth Bruckbauer durchgeführt. Zur Detektion der crRNA wurde die Sonde P1Sp1 ein-



gesetzt (vergleiche Kapitel 4.2.1.2.). Bei allen drei Ko-Aufreinigungs-Proben konnte bei ca. 70 kDa die reife crRNA als dominante Bande detektiert werden, wobei diese bei der Cas6-Probe am stärksten ausgeprägt war. Zusätzlich fanden sich in allen Proben weitere Banden bei geringeren Höhen. Zuletzt konnte bei einer Größe von über 517 Nukleotiden in allen drei Proben eine Bande detektiert werden, welche in der Cas7-Probe verhältnismäßig am stärksten in Erscheinung tritt. Diese Bande könnte die Prä-crRNA darstellen, da der CRISPR-Locus P1 eine Größe von ca. 1 Kb aufweist. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in allen drei Elutionsfraktionen reife crRNA vorlag, wobei die größte Menge crRNA in der Cas6-Elution zu finden war, während in der Cas7-Elution möglicherweise die Prä-crRNA dominiert.

4.2.3.4. Gelfiltration

Vergleicht man die Elutionsfraktionen der Cascade-Ko-Aufreinigungen (siehe Abbildung 4.9), kann festgestellt werden, dass das jeweils mit Affinitäts-Tag versehene Cas-Protein verstärkt repräsentiert ist. Es scheint also nur ein gewisser Teil der Fusionsproteine komplexiert mit anderen Cas-Proteinen vorzuliegen, während der Rest ungebunden gereinigt wurde. Es ist daher nicht möglich, anhand der Elutionsfraktionen Rückschlüsse auf die Stöchiometrie des Komplexes zu ziehen. Daher wurde der Versuch unternommen, mit Hilfe einer Gelfiltration die Komplexe sowohl von den ungebundenen Fusionsproteinen, als auch von Verunreinigungen durch unspezifisch mitgereinigte Proteine zu trennen.

Die Eluate der Ko-Aufreinigungen Cas6-Flag und Cas7-Flag wurden einer Gelfiltration unterzogen. Die erhaltenen Fraktionen wurden anhand eines SDS-Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt und mit Silbernitrat angefärbt. Wie in Abbildung 4.13 zu sehen ist, konnte für beide Proben ein vergleichbares Elutionsmuster erhalten werden. So findet sich in beiden Fällen ein großer Teil des Proteins in der Fraktion A2, was einem Elutionsvolumen von ca. 1 bis 1,5 ml entspricht. Im Vergleich mit dem Proteinstandard kann erkannt werden, dass dies einer Größe von über 670 kDa entspricht. Ein weiterer großer Teil findet sich in der Fraktion A4 bzw. A5 bei einem Elutionsvolumen von ca. 2,5 ml. Dies entspricht einer Größe von etwas mehr als 17 kDa. Desweiteren zeigen die Absorptionskurven diverse kleinere Ausschläge bei ca. 1,5 bis 2 ml Elutionsvolumen (Fraktion A3), was einer Größe zwischen 44 und 670 kDa entspricht. Es wäre denkbar, dass diese den Komplex darstellen, während der Ausschlag in Fraktion A4 das ungebundene Fusionsprotein darstellen könnte. Die Ausschläge der Kurven liegen jedoch sehr nah beieinander, sodass eine Einschätzung der Größe nur sehr ungenau vorgenommen werden kann. Anhand der Färbung der Fraktionen wird sichtbar, dass durch die Gelfiltration keine Trennung der in den Eluat vorliegenden Proteine erreicht werden konnte. So finden sich in allen Fraktionen dieselben Proteine in denselben Mengenverhältnissen wie im ursprünglichen Eluat. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass die Kurvenausschläge überlappen. Es kann jedoch festgestellt werden, dass der Großteil der Proteine in höhermolekularen Aggregaten von über 670 kDa Größe vorliegt.

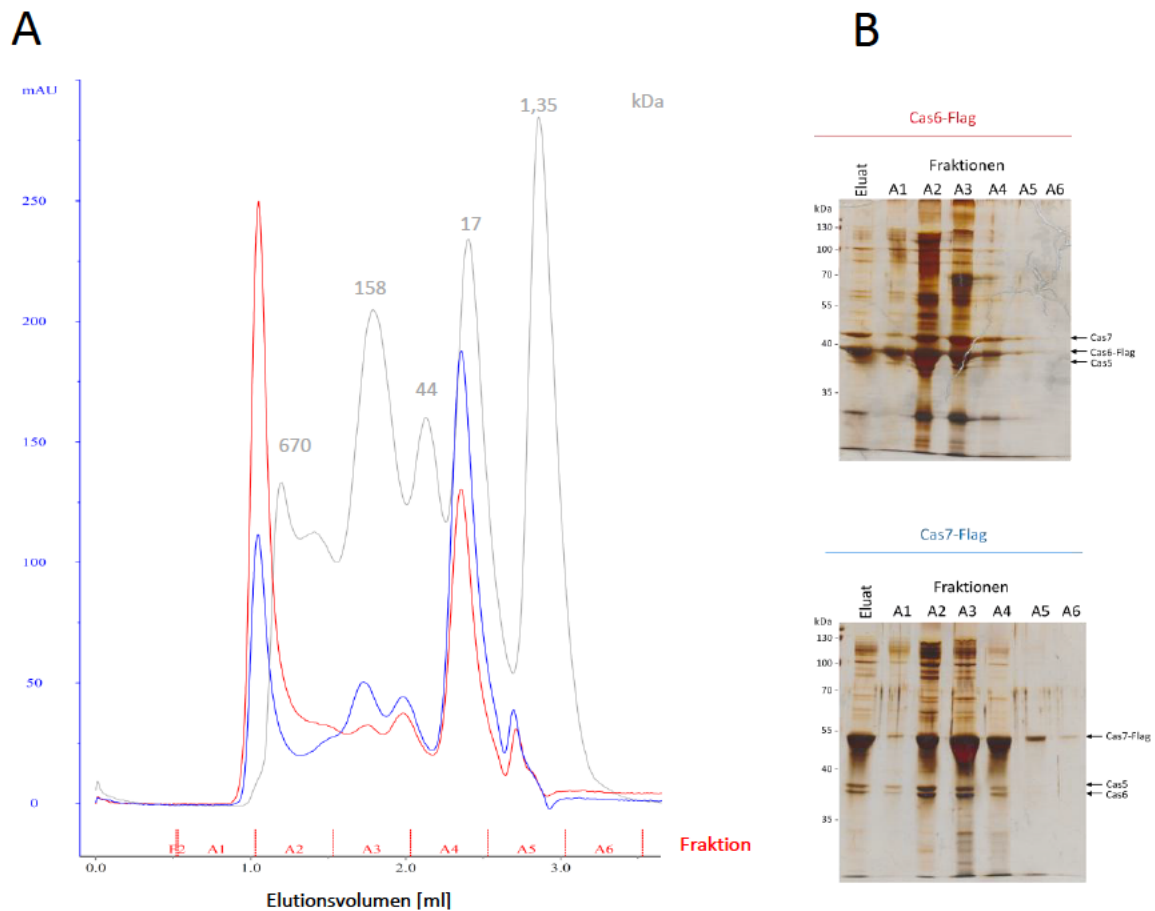


Abbildung 4.13: Gelfiltration von Ko-Aufreinigungs-Eluaten. Von den Elutionsfraktionen der Ko-Aufreinigungen Cas6-Flag und Cas7-Flag wurden 55 bzw. 75 µg anhand einer Superdex 200 5/150-Säule aufgetrennt. Unter denselben Bedingungen wurde außerdem 10 µl Proteinstandard (*Gel filtration standard*, Biorad) aufgetrennt. (A) Darstellung der Elutionsmuster der Gelfiltrationsläufe als Kurvendigramm. Die X-Achse bezeichnet das Elutionsvolumen in ml, auf der Y-Achse ist die Proteinmenge durch den Absorptionwert bei 280 nm (*milli absorbance units*) angegeben. Oberhalb der X-Achse sind in rot die Fraktionen angegeben, welche getrennt gesammelt wurden (A1-A6, je 0,5 ml). Die Absorptionskurve des Proteinstandards ist grau dargestellt und die Peaks jeweils mit der Größe des Markerproteins in kDa bezeichnet. Die Absorptionskurven der Eluate Cas6-Flag und Cas7-Flag sind in rot bzw. in blau eingezeichnet. (B) Elektrophoretische Auftrennung der Fraktionen A1 bis A6. Die Proteine wurden mit Silbernitrat angefärbt. In Spur 1 ist jeweils ein Aliquot des untersuchten Eluats aufgetragen. Links ist der Proteingrößenstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder) in kDa angegeben. Rechts sind die Banden der entsprechenden Cas-Proteine mit Pfeilen markiert. Oben: Eluat Cas6-Flag. Unten: Eluat Cas7-HisFlag.

4.3. Untersuchung von Cas6 aus *H. volcanii* (HvoCas6)

4.3.1. Mutationsanalyse von HvoCas6

Durch die Untersuchung verschiedener Knockout-Stämme konnte gezeigt werden, dass drei Cas-Proteine, Cas5, Cas6 und Cas7, *in vivo* für die Produktion und/oder Stabilisierung der crRNA essentiell sind. Es konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die crRNA-Population vollständig wiederhergestellt werden kann, indem die benötigten *cas*-Gene auf einem Plasmid kodiert in den Knockout-Stamm eingebracht werden. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, ohne das Genom selbst zu manipulieren, Mutationsanalysen dieser Gene durchzuführen, um funktionelle Aminosäuren innerhalb der Proteinsequenz zu identifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Cas6-Protein dahingehend untersucht. Dazu wurden verschiedene Mutationen in das *cas6*-Gen eingeführt, welche jeweils im Austausch einer Aminosäure im Cas6-Protein resultieren. Die jeweiligen Gene wurden anhand eines Plasmids in einen Stamm eingebracht, in welchem das *cas6*-Gen aus dem Genom deletiert ist (STOLL, 2013). Diese Stämme wurden hinsichtlich der crRNA-Population und Fähigkeit zur Interferenz untersucht.

4.3.1.1. Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren

Anhand der Analyse von Kristallstrukturen können aufgrund der Lage von Aminosäureresten im Raum Rückschlüsse auf ihre Funktion hinsichtlich Katalyse oder Bindung zu anderen Proteinen oder Nukleinsäuren gezogen werden. Da von Cas6 aus *H. volcanii* keine Kristallstruktur bekannt ist, wurden bioinformatische Vergleiche zu anderen Cas6-Proteinen vorgenommen, bei denen bereits katalytisch aktive Aminosäuren identifiziert werden konnten, um so die Auswahl an putativ funktionellen Resten einzugrenzen. Beim Vergleich der Primärstrukturen ergab sich, dass HvoCas6 wenig Sequenzähnlichkeit mit anderen Cas6-Proteinen, sowohl vom Typ I als auch vom Typ III, aufweist (Abbildung 4.14). Da jedoch bekannt ist, dass Cas6-Proteine trotz geringer Übereinstimmungen in ihrer Aminosäuresequenz ähnliche RNA-bindende Faltungen besitzen, wurde eine bioinformatische Vorhersage der Tertiärstruktur vorgenommen, um möglicherweise Ähnlichkeiten auf dieser Ebene zu finden. Dazu wurde die Aminosäuresequenz mit Hilfe des Phyre²-Servers (*protein homology/analogy recognition engine*, KELLEY&STERNBERG, 2009) untersucht. Dieses Programm berechnet aufgrund der Aminosäureabfolge Bereiche, in denen eine Ausbildung von α -Helices oder β -Faltblattstrukturen wahrscheinlich ist. Diese putative Sekundärstruktur wird mit einer Datenbank von Sekundärstrukturen von Proteinen verglichen, von welchen Kristallstrukturen bekannt sind, und nach Homologien gesucht. Auf der Basis der Tertiärstruktur der Proteine mit der höchsten Ähnlichkeit werden Modelle der dreidimensionalen Faltung des untersuchten Proteins oder Teile dessen erstellt. Dabei ergab sich eine hohe

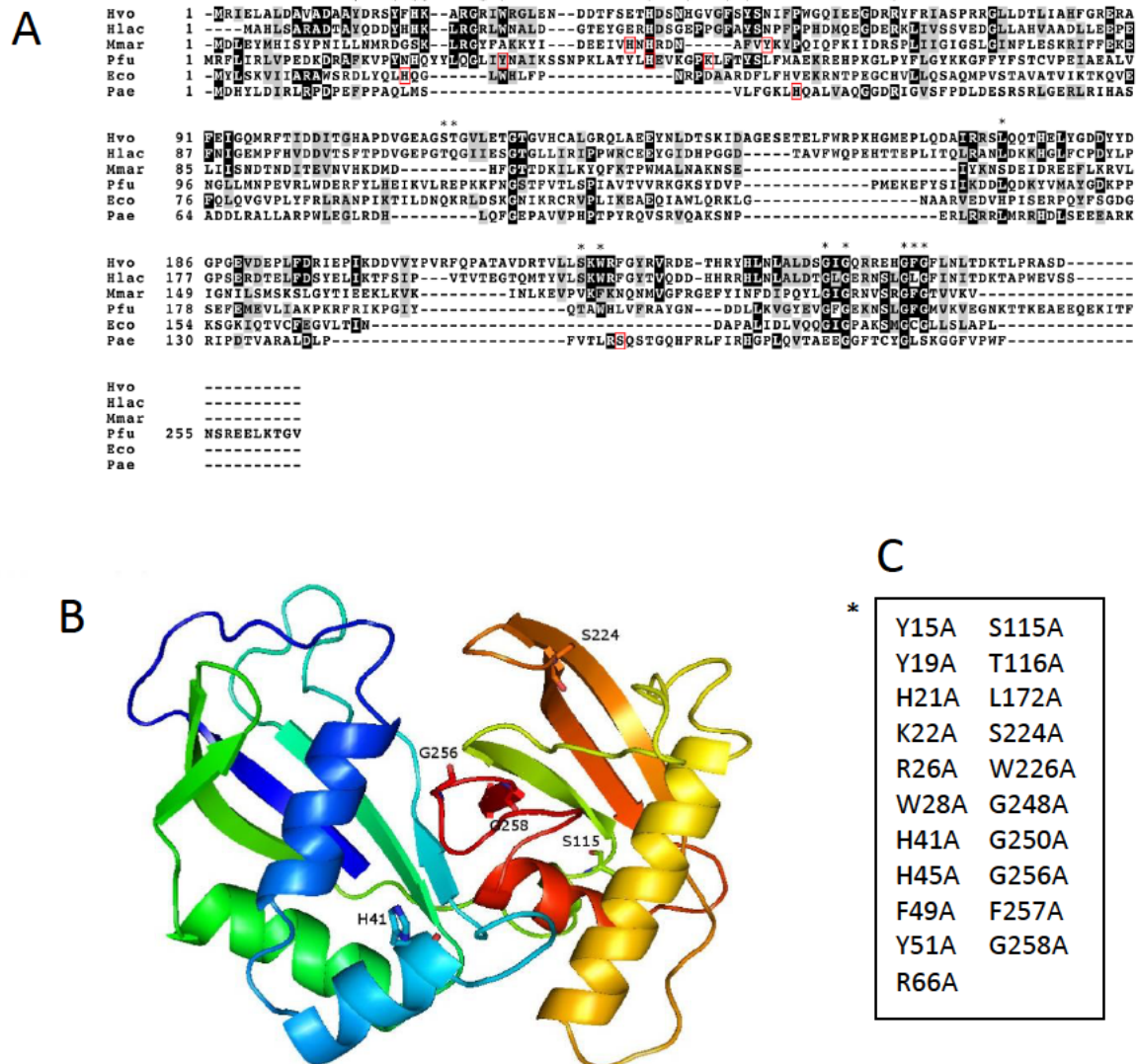


Abbildung 4.14: Bioinformatische Analyse von Cas6 aus *H. volcanii*. (A) Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener Cas6-Proteine mit Hilfe der ClustalW Servers (Swiss Institute of Bioinformatics). Schwarz unterlegt sind Reste, welche in mindestens drei der sechs Sequenzen identisch sind. Grau unterlegt sind chemisch ähnliche Reste. Hvo: *H. volcanii* (Subtyp I-B), Hlac: *Halorubrum lacusprofundi* (I-B), Mmar: *M. maripaludis* (I-B), Pfu: *P. furiosus* (III-B), Eco: *E. coli* (I-E), Pae: *P. aeruginosa* (I-F). Rot markiert sind Aminosäuren, welche als katalytisch aktiv identifiziert wurden. Sterne bezeichnen die zur Mutation ausgewählten Aminosäuren innerhalb der Sequenz von HvoCas6. (B) Vorhersage der putativen Tertiärstruktur von HvoCas6 mit Hilfe des Phyre² Servers und graphische Darstellung durch Bearbeitung mit der Pymol Graphiksoftware. Die regenbogenartige Farbgebung beginnt am N-Terminus mit blau und endet am C-Terminus mit rot. Darstellung der Sekundärstrukturen anhand von Pfeilen (β -Faltblatt) und Schrauben (α -Helix). Die Reste H41, S115, S224, G256 und G258 sind inklusive ihrer Seitenketten eingezeichnet. (C) Auflistung der zur Mutation ausgewählten Aminosäuren von HvoCas6. Die Benennung erfolgt durch die Bezeichnung der Aminosäure im Einbuchstabencode, der Position des Restes innerhalb der Primärstruktur und der als Surrogat eingesetzten Aminosäure Alanin.

strukturelle Ähnlichkeit mit Cas6 aus *P. furiosus* über annähernd die ganze Länge des Proteins (Details siehe Anhang 8.8.).

Auch wenn der Vergleich der Proteinsequenzen wenig Übereinstimmungen zeigt, kann deutlich erkannt werden, dass die bei anderen Cas6-Proteinen identifizierten katalytischen Reste vornehmlich am Amino-Terminus (N-Terminus) zu finden sind. Desweiteren sind hauptsächlich Histidine, aber auch Tyrosine Teile des aktiven Zentrums, in *P. furiosus* desweiteren ein Lysin. Als Ausnahme ist ein Serin im Cas6 aus *P. aeruginosa* zu nennen, welches sich eher am Carboxy-Terminus (C-Terminus) des Proteins befindet. Die größten Übereinstimmungen finden sich ebenfalls am C-Terminus und bestehen aus mehreren Glycinresten. Dieses Motiv hat die Abfolge GhGxxxxGhG (wobei h eine hydrophobe und x eine beliebige Aminosäure darstellt) und ist in Cas6-Proteinen stark konserviert (HAFT ET AL., 2005, MAKAROVA ET AL., 2011c).

Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurden insgesamt 21 Aminosäuren innerhalb der Proteinsequenz von HvoCas6 für die Mutationsanalyse ausgewählt, so beispielsweise diverse Histidine und Tyrosine im N-terminalen Bereich, wobei H41 im Sequenzvergleich an derselben Position zu finden ist wie das katalytisch aktive Histidin aus *P. furiosus*. Die anderen zwei Reste der Triade finden keine Entsprechung in bei *H. volcanii*. Daher wurden diejenige Aminosäure, welche der Position des Tyrosins entspricht (Tryptophan 28), und diverse basische Reste wie Lysine und Arginine im N-terminalen Bereich gewählt. Zuletzt wurden zwei Serine und die vier Glycine am C-Terminus der Mutationsanalyse unterzogen (Abbildung 4.14). Die ausgewählten Aminosäuren wurden durch Alanin ersetzt, da dieses mit einer unpolaren Methylgruppe als Rest eine geringe räumliche Ausdehnung besitzt und daher kaum sterische Hinderungen bei der Proteinfaltung verursacht.

4.3.1.2. Herstellung der Konstrukte und Stämme

Die mutierten Versionen des *cas6*-Gens wurden in den *Haloferax*-Expressionsvektor pTA927 kloniert, welcher einen Tryptophan-induzierbaren Promotor (*P.tnaA*) aufweist. Dadurch ergibt sich eine artifizielle Expressionssituation im Vergleich zum *cas6*-Gen im Genom, welches aufgrund seines nativen Promotors geringer exprimiert wird. Um die Auswirkungen der Mutationen realistischer einschätzen zu können, wurde daher auch ein Plasmidkonstrukt hergestellt, welches das native *cas6*-Gen ohne Mutation aufweist. Um zu einem späteren Zeitpunkt die Möglichkeit der Reinigung der Proteine zu haben, wurde jeweils am N-Terminus ein FLAG-Peptid-Tag fusioniert (detaillierte Herstellung der Konstrukte siehe Kapitel 3.2.6.). Die letztendlich erhaltenen Konstrukte pTA927-*cas6mut*-FlagN bzw. pTA927-*cas6*-FlagN (Abbildung 4.15) wurden durch Transformation in den *H. volcanii*-Stamm H119Δ*cas6* eingebracht.



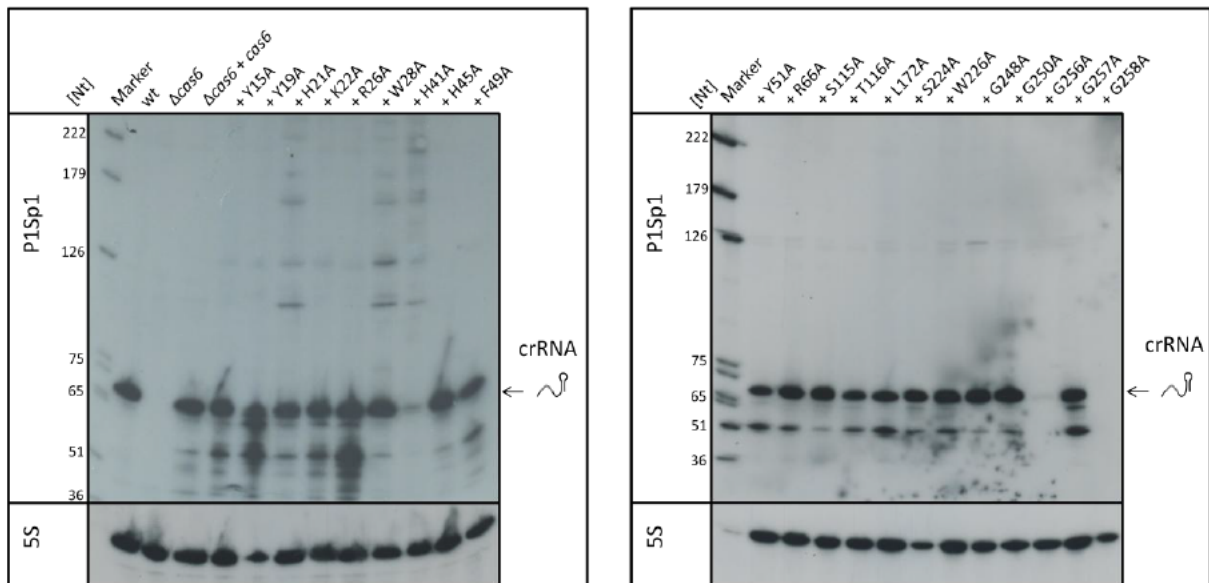
Abbildung 4.15: Schematische Darstellung der Konstrukte pTA927-cas6mut-FlagN zur Mutationsanalyse von HvoCas6. Das jeweilige mutierte *cas6*-Gen (rot) ist stromaufwärts mit der Sequenz für das FLAG-Peptid (schwarz) fusioniert. Die Transkription erfolgt unter der Kontrolle des induzierbaren Tryptophanase-Promotors *P.tnaA* (grau).

4.3.1.3. Analyse der Auswirkungen der Mutationen auf die crRNA-Population

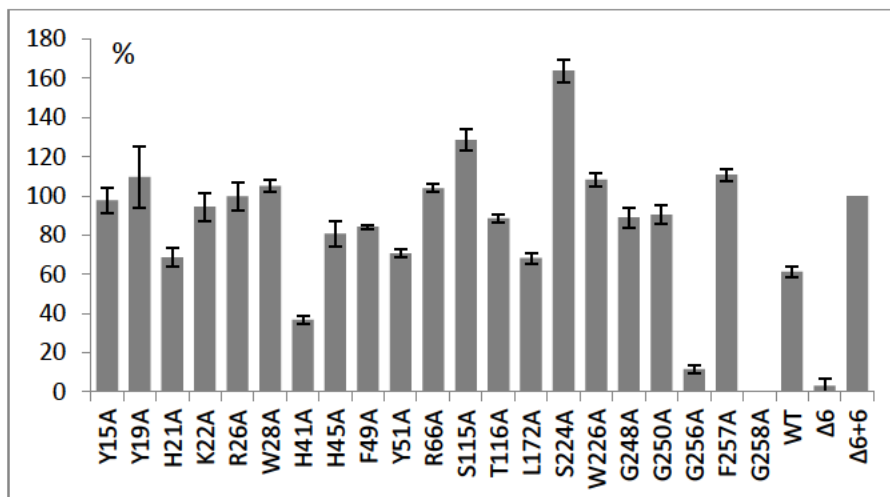
Um zu überprüfen, inwieweit die Mutationen innerhalb des *cas6*-Gens Auswirkungen auf das intrazelluläre crRNA-Level haben, wurden alle $\Delta cas6$ +pTA927-*cas6*mut-FlagN-Stämme, der Stamm ohne Mutation im *cas6*-Gen ($\Delta cas6$ +pTA927-*cas6*-FlagN) und der Wildtyp H119 untersucht, indem Gesamt-RNA isoliert und anhand eines Northern Blots mit anschließender Sondenhybridisierung analysiert wurde (siehe Kapitel 4.2.1.2.). Die RNA wurde mit Hilfe eines Polyacrylamidgels aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Anschließend erfolgte die Detektion der crRNA durch die Sonde P1Sp1 und die Detektion der 5S rRNA als Ladekontrolle. Die erhaltenen Banden wurden quantifiziert und die Prozentualität der crRNA-Menge der Mutationsstämmen ermittelt. Wie in Abbildung 4.16 ersichtlich ist, wurde im Falle des Wildtyps ein reduziertes crRNA-Level von 61 % im Vergleich zum Komplementationsstamm $\Delta cas6$ +pTA927-*cas6*-FlagN beobachtet. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der native Promotor des *cas6*-Gens im genomischen Kontext eine schwächere Expression des Proteins zur Folge hat als der induzierbare Promotor des Plasmids unter den angewendeten Bedingungen. Dies führt zu einer effektiveren Prozessierung und/oder Stabilisierung der crRNA und daher zu einem erhöhten Level im Komplementationsstamm. Um die Auswirkung der Mutationen besser abschätzen zu können, wurden die crRNA-Mengen in den Mutationsstämmen daher auf den Komplementationsstamm mit dem nicht-mutierten *cas6*-Gen bezogen.

Wie in Abbildung 4.16 zu sehen ist, ergab sich bei drei Mutanten eine deutliche Reduzierung des crRNA-Levels. So ist im Falle der Mutante H41A nur noch 37 % und bei der Mutante G256A 12 % reife crRNA zu beobachten. Durch die Mutation G258A ist keine crRNA mehr detektierbar. Einige andere Mutanten zeigen eine schwache Reduktion auf 70 bis 80 % (H21A, H45A, Y51A, L172A). Zuletzt ist im Falle zweier Mutanten eine Erhöhung der crRNA Menge zu beobachten, bei Mutante S115A auf 129 % und bei Mutante S224A auf 164 %. Alle weiteren Mutanten zeigen keine drastische Veränderung der crRNA-Population. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass bei allen Mutanten eine zusätzlich Bande bei ca. 51 Nukleotiden detektiert wurde, welche jedoch nicht im Wildtyp auftaucht.

A



B



C

Stamm	crRNA [%]	+/- [%]
Y15A	98	6
Y19A	110	16
H21A	69	5
K22A	94	7
R26A	100	7
W28A	105	3
H41A	37	2
H45A	81	7
F49A	84	1
Y51A	71	2
R66A	104	2
S115A	129	6
T116A	89	2
L172A	68	3
S224A	164	6
W226A	108	3
G248A	89	5
G250A	90	5
G256A	12	2
G257A	111	3
G258A	0	0
Wt	61	3
$\Delta cas6$	3	4
$\Delta 6+6$	100	-

Abbildung 4.16: Analyse des crRNA-Level in den HvoCas6-Mutanten. Sondendetektion von Northern Blots mit den Sonden P1Sp1 und 5S. (A) Röntgenfilm-Expositionen der hybridisierten Blots. Links ist der DNA-Größenstandard (pGEM) in Nukleotiden angegeben. Der Pfeil markiert die reife crRNA bei ca. 70 Nukleotiden. (B) Graphische Darstellung der Quantifizierung der crRNA-Level anhand eines Balkendiagramms. Angegeben ist die relative crRNA-Menge in Prozent. (C) Tabellarische Auflistung der crRNA-Level. Erste Spalte: Bezeichnung des entsprechenden Stamms (im Falle der Mutanten anhand der Bezeichnung der Mutation, der Stamm $\Delta cas6+pTA927-cas6$ -Flag N ist mit $\Delta 6+6$ bezeichnet), zweite Spalte: crRNA-Menge in Prozent, dritte Spalte: Standardabweichung in Prozent.

4.3.1.4. Analyse der Auswirkungen der Mutationen auf die Interferenz

Um zu überprüfen, ob die Mutationen innerhalb des *cas6*-Gens Auswirkungen auf die Fähigkeit des CRISPR/Cas-Systems zu Degradierung fremder Nukleinsäuren haben, wurden Interferenztests durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.1.6.) Dabei wurde im Falle des $\Delta cas6$ -Stamms als Angreifer- bzw. Kontrollplasmide die pTA409-Konstrukte verwendet und für die Komplementationsstämme die pTA352-Konstrukte. Jeder Stamm wurde mehrmals und mit jeweils zwei verschiedenen PAM-Motiven getestet (TTC bzw. ATC). Die Ergebnisse der Interferenztests sind im Detail im Anhang 8.10. aufgeführt und in Tabelle 4.3 zusammengefasst. So ergab sich, dass der Stamm $\Delta cas6$ nicht zur Interferenz fähig ist. Durch Einbringen des *cas6*-Gens auf einem Plasmid (Stamm $\Delta cas6$ -pTA927-*cas6*-FlagN) ist die Interferenzreaktion wieder möglich. Im Falle der Mutanten konnte ermittelt werden, dass die Mutationen G256A und G258A zum Verlust der Interferenzfähigkeit führen. Die Mutante H41A zeigte im Durchschnitt zwar reduzierte Transformationsraten, jedoch ist die Reduktion weit geringer als bei Stämmen mit intakter Interferenzreaktion. Alle anderen Mutanten-Stämme zeigten eine erfolgreiche Interferenz.

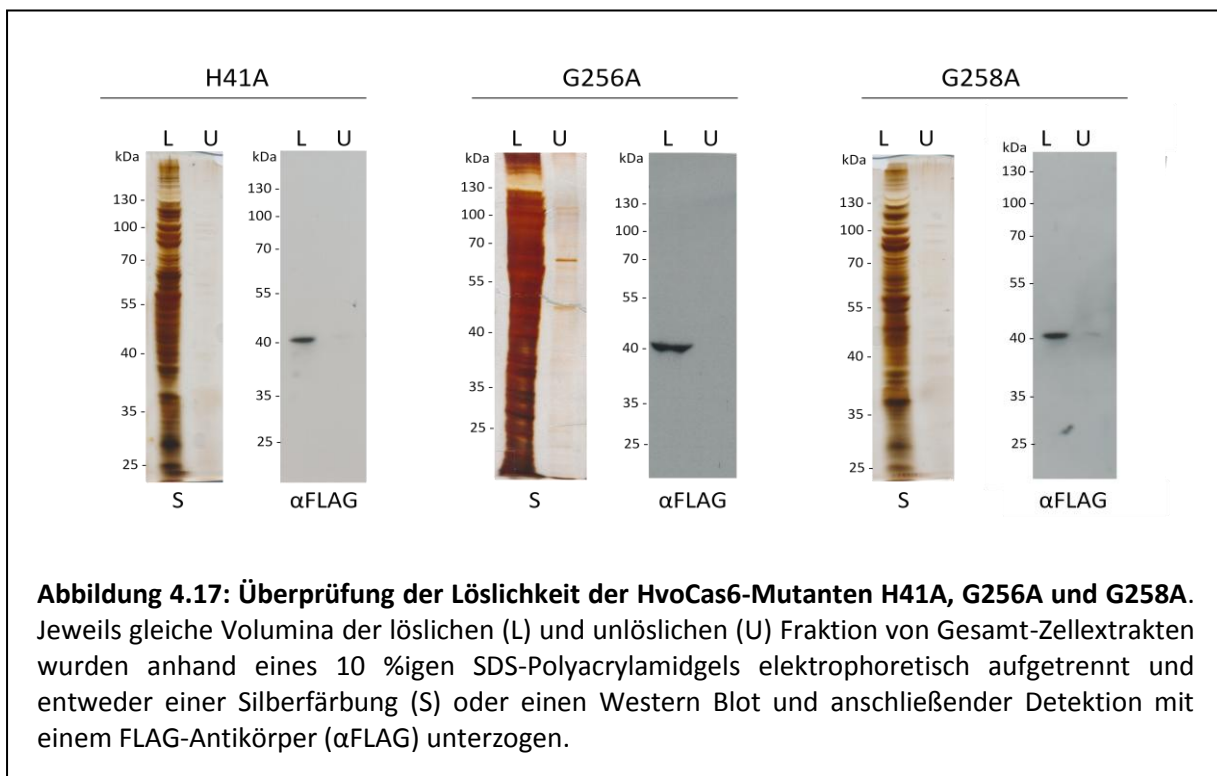
Stamm	Reduktionsfaktor	Interferenz		Stamm	Reduktionsfaktor	Interferenz
Y15A	0,003	+		T116A	0,001	+
Y19A	0,002	+		L172A	0,004	+
H21A	0,004	+		S224A	0,001	+
K22A	0,005	+		W226A	0,003	+
R26A	0,004	+		G248A	0,005	+
W28A	0,002	+		G250A	0,004	+
H41A	0,218	[-]		G256A	1,146	-
H45A	0,001	+		F257A	0,003	+
F49A	0,004	+		G258A	1,025	-
Y51A	0,003	+		$\Delta 6+6$	0,003	+
R66A	0,004	+		$\Delta cas6$	0,953	-
S115A	0,002	+				

Tabelle 4.3: Überprüfung der Interferenzreaktion der HvoCas6-Mutanten. Angegeben ist jeweils die durchschnittliche Reduktion der Transformationseffizienz für das Angreiferplasmid bezogen auf das Kontrollplasmid bei vier Interferenztests. Bei einer Reduktion um mindestens das Hundertfache (Faktor 0,01) ist erfolgreiche Interferenz (+) definiert, andernfalls ist die Interferenz eingeschränkt oder nicht erfolgreich ([-] bzw. -). Die Stämme sind mit der jeweiligen Mutation bezeichnet. Die Bezeichnung des Stammes $\Delta cas6$ +pTA927-*cas6*-FlagN (*cas6* ohne Mutation) ist $\Delta 6+6$.

4.3.1.5. Überprüfung der Löslichkeit

Bei der Analyse der HvoCas6-Mutanten ergab sich, dass bei drei Mutanten sowohl die crRNA-Population reduziert als auch die Fähigkeit zur Interferenz gestört ist. In diesen Fällen wurde die Expression der Proteine näher untersucht, um sicherstellen zu können, dass die Einschränkung in der Aktivität wirklich auf den Austausch der Aminosäure zurückzuführen ist und nicht darauf begründet ist, dass das Protein nicht gebildet bzw. nicht korrekt gefaltet und daraufhin abgebaut wird. Dazu wurden Gesamt-Zellextrakte hergestellt und durch Zentrifugation die unlöslichen Bestandteile von den löslichen getrennt. Sollte das jeweilige Protein exprimiert und korrekt gefaltet sein, findet es sich in der löslichen Fraktion wieder. Nicht korrekt gefaltete Proteine werden zum späteren Abbau in der Zelle in sogenannte Einschlusskörperchen verpackt. Diese befinden sich im unlöslichen Teil des Zellextrakts. Zum Vergleich der Fraktionen wurde der unlösliche Teil in einer dem löslichen Teil entsprechenden Menge Flüssigkeit aufgenommen.

Die löslichen und unlöslichen Fraktionen der Zellextrakte der Mutanten H41A, G256A und G258A wurden anhand von SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und im Folgenden einerseits durch Färbung der Proteinbanden und andererseits durch Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot) mit anschließender Antikörper-Detektion analysiert. Da die mutierten HvoCas6-Proteine mit einem N-terminalen FLAG-Tag versehen sind, konnte dazu ein spezifischer Antikörper gegen dieses Peptid verwendet werden. Für alle drei Mutanten konnte das jeweilige Protein in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 4.17).



4.3.2. Reinigung von HvoCas6

Um Untersuchungen der Funktion von Cas6 *in vitro* durchführen zu können, wurde der Versuch unternommen, HvoCas6 mit Hilfe von Affinitäts-Tags aus Zellextrakten zu reinigen. Dazu wurden HvoCas6-Fusionsproteine einerseits rekombinant in *E. coli* und andererseits in *H. volcanii* überproduziert.

4.3.2.1. Reinigung von HvoCas6 aus *E. coli*

Um HvoCas6 rekombinant in *E. coli* überzuproduzieren wurde das *cas6*-Gen in den Überexpressionsvektor pET30a kloniert. Dabei wurden drei Konstrukte hergestellt, welche in drei verschiedenen Fusionsproteinen resultieren. Beim Konstrukt pET30a-*cas6*(H) wurde die Gensequenz an die Expression in *E. coli* angepasst, um die Ausbeute an rekombinantem Protein zu erhöhen. Dabei wird unter anderem die Verwendung der Kodons für eine Aminosäure an die Häufigkeit der entsprechenden in *E. coli* vorkommenden Basentriplets angeglichen (siehe Anhang 8.7.). Die Aminosäureabfolge bleibt selbstverständlich erhalten. Bei den Konstrukten pET30a-*cas6*(ohneStop) und pET30a-*cas6*-FlagN wurde die unveränderte Gensequenz verwendet. Die jeweiligen Fusionsproteine weisen einen N-terminalen 6xHis- und S-Protein-Tag (pET30a-*cas6*(H)), zusätzlich einen C-terminalen 6xHis-Tag (pET30a-*cas6*(ohneStop)) und einen N-terminalen FLAG-Tag (pET30a-*cas6*-FlagN) auf. Eine schematische Darstellung findet sich in Abbildung 4.18, die Details zur Klonierung der Konstrukte sind dem Kapitel 3.2.7. zu entnehmen. Die Plasmide wurden durch Elektroporation in den *E. coli*-Stamm BL21 codon plus eingebracht. Dieser *E. coli*-Stamm weist zusätzliche Gene für tRNAs auf, welche in *E. coli* selten, in anderen Organismen jedoch häufiger verwendet werden und ist daher für die heterologe Expression optimiert. Die Proteine wurden überproduziert und lösliche Zellextrakte hergestellt. Im Folgenden wurden die His-Fusionsproteine mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose und das FLAG-Fusionsprotein mit Hilfe von FLAG-Agarose gereinigt. Dabei wurde im Falle des Konstrukts pET30a-*cas6*(H) den Puffern NaCl in einer Endkonzentration von 2 M zugefügt. Zur Überprüfung des Erfolgs der Expression und der Reinigung wurden jeweils Aliquots der löslichen Extrakte und der Elutionsfraktionen anhand von SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und im Folgenden einerseits mit Silbernitrat angefärbt und andererseits durch Western Blotting auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte über die Affinitäts-Tags mit His- bzw. FLAG-spezifischen Antikörpern. In Abbildung 4.18 ist zu sehen, dass in allen drei Fällen die jeweiligen Fusionsproteine sowohl im löslichen Extrakt als auch in der Elutionsfraktion nachgewiesen werden konnten. Anhand der Silberfärbung ist jedoch erkennbar, dass in allen drei Fällen das Fusionsprotein nicht die dominante Bande in den Elutionsfraktionen darstellt und eine Vielzahl weiterer Proteinbanden verschiedener Größen sichtbar ist.

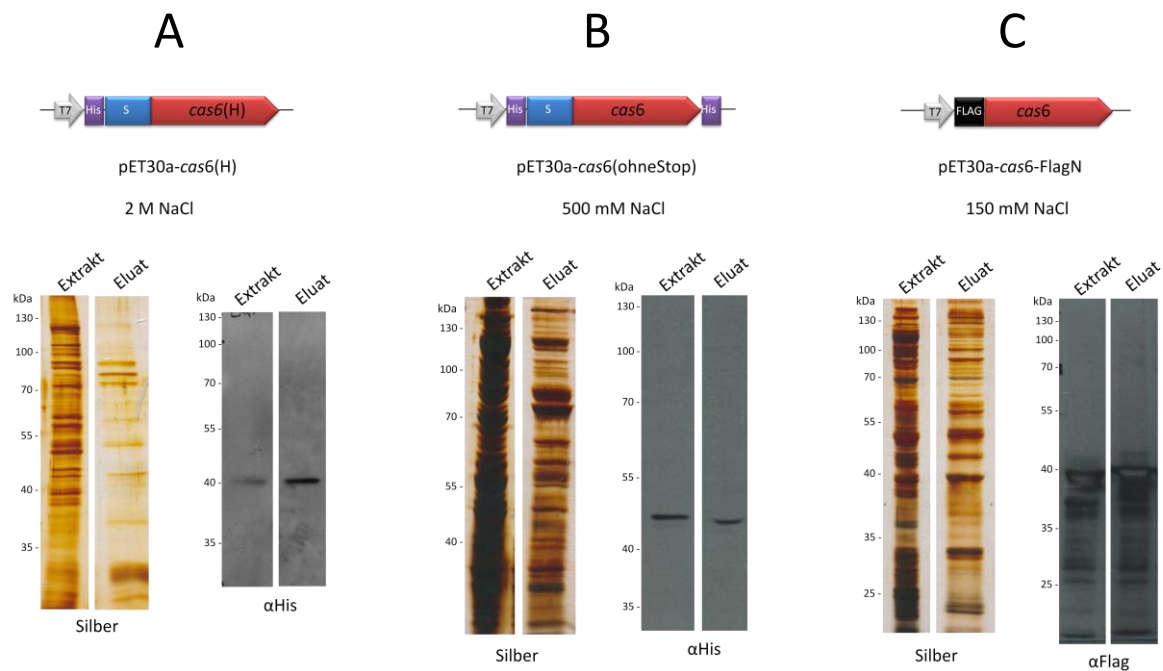
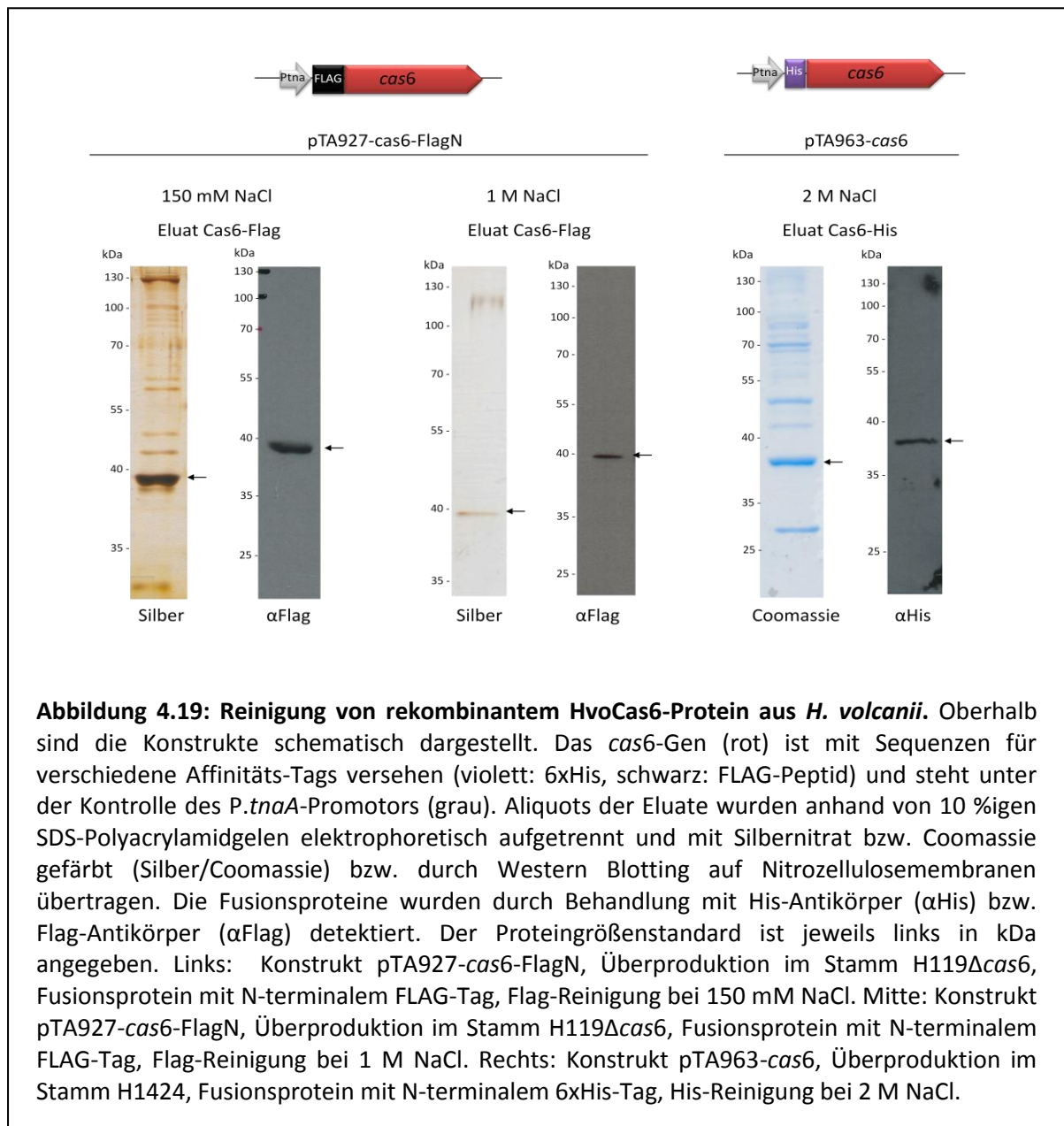


Abbildung 4.18: Reinigung von rekombinantem HvoCas6-Protein aus *E. coli*. Oberhalb sind die Konstrukte schematisch dargestellt. Das *cas6*-Gen (rot) ist jeweils mit Sequenzen für verschiedene Affinitäts-Tags versehen (violett: 6xHis, blau: S-Protein, schwarz: FLAG-Peptid) und stehen unter der Kontrolle des T7-Promotors (grau). Aliquots der löslichen Extrakte und Eluate wurden anhand von 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt (Silber) bzw. durch Western Blotting auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Die Fusionsproteine wurden durch Behandlung mit His-Antikörper (α His) bzw. Flag-Antikörper (α Flag) detektiert. Der Proteingrößenstandard ist jeweils links in kDa angegeben. **(A)** Konstrukt pET30a-*cas6*(H), Fusionsprotein mit N-terminalem 6xHis- und S-Proteinanhang, His-Reinigung bei 2 M NaCl. **(B)** Konstrukt pET30a-*cas6*(ohneStop), Fusionsprotein mit N-terminalem 6xHis- und S-Proteinanhang und C-terminalem 6xHis-Anhang, His-Reinigung bei 500 mM NaCl. **(C)** Konstrukt pET30a-*cas6*-FlagN, Fusionsprotein mit N-terminalem FLAG-Anhang, Flag-Reinigung bei 150 mM NaCl.

4.3.2.2. Reinigung von HvoCas6 aus *H. volcanii*

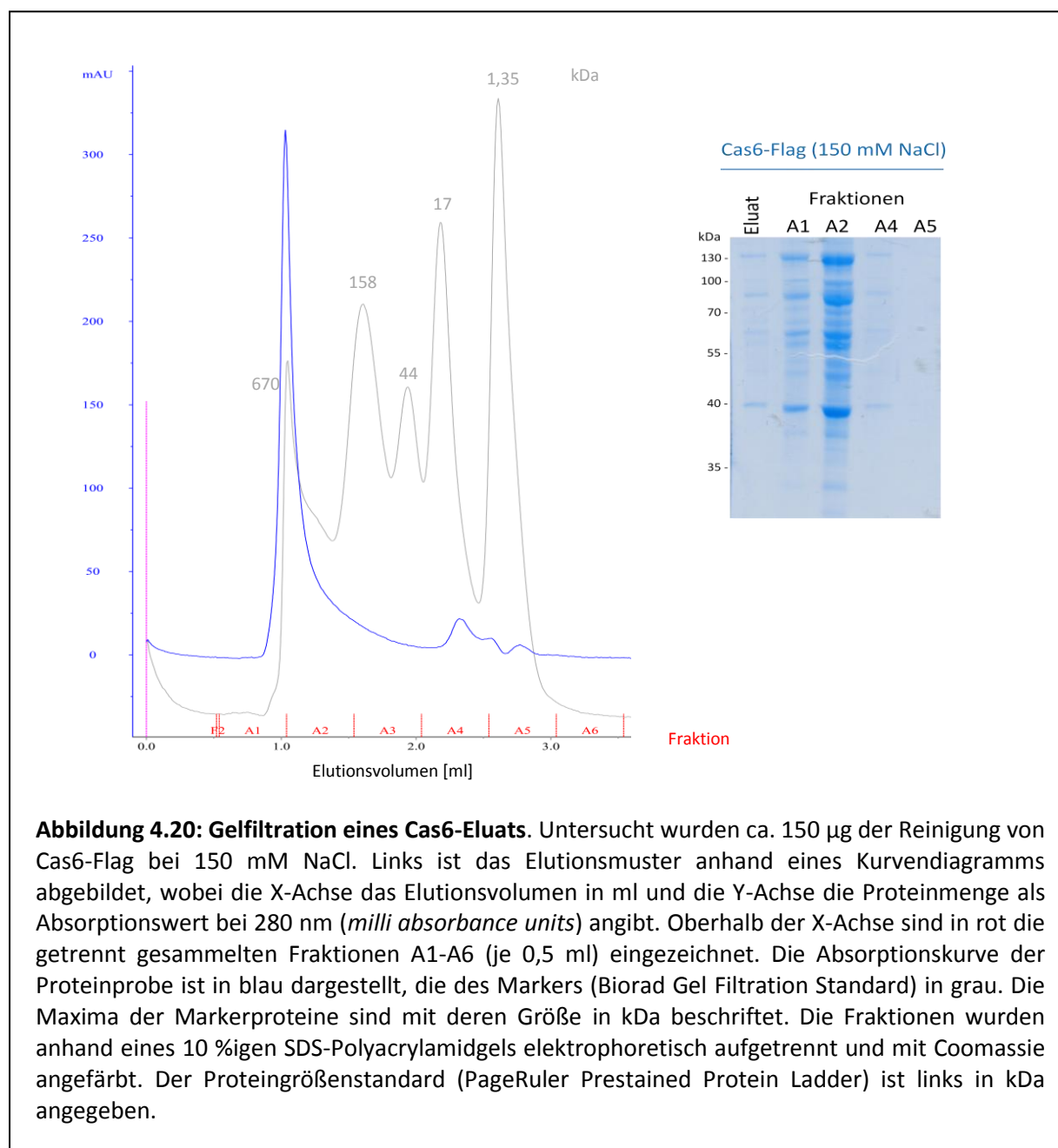
Für die Reinigung von HvoCas6 aus *H. volcanii* wurden zwei Konstrukte verwendet, welche jeweils in Fusionsproteinen mit N-terminalem FLAG- bzw. 6xHis-Tag resultieren. Die Konstrukte sind schematisch in Abbildung 4.19 dargestellt, die Detail der Klonierung sind dem Kapitel 3.2.6. bzw. 3.2.7. zu entnehmen. Für die Reinigung von HvoCas6 via FLAG-Tag wurde ein löslicher Zellextrakt des Stamms H119Δ*cas6*+pTA927-*cas6*-FlagN (siehe Kapitel 4.3.1.2.) hergestellt und das Fusionsprotein anhand von FLAG-Agarose gereinigt. Dabei wurde die Herstellung des Extrakts und die Reinigung zum einen bei 150 mM und zum anderen bei 1 M NaCl durchgeführt. Für die Reinigung unter Hochsalzbedingungen via 6xHis-

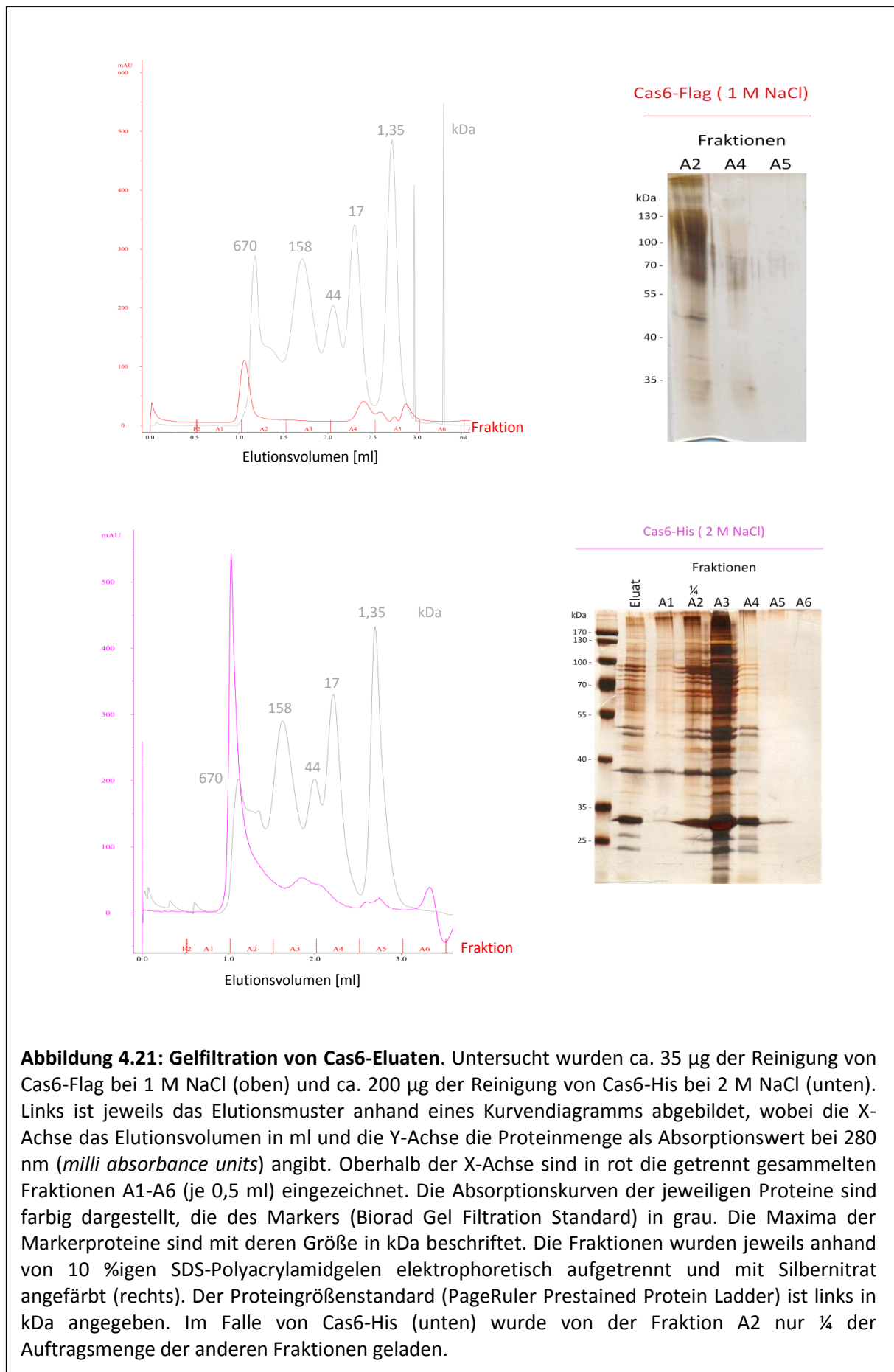
Tag wurde das pTA963-Konstrukt in den *H. volcanii*-Stamm H1424 eingebracht. Das Fusionsprotein wurde überproduziert und aus löslichem Zellextrakt mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose gereinigt. Zur Überprüfung der Reinigung wurden die Elutionsfraktionen anhand von SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und einerseits angefärbt und andererseits die entsprechenden Fusionsproteine mit Hilfe von Antikörperdetektion von Western Blots identifiziert. Dabei wurden jeweils Antikörper gegen die entsprechenden Affinitäts-Tags verwendet. Wie in Abbildung 4.19 zu sehen ist, konnten unter allen drei Bedingungen die Fusionsproteine erfolgreich gereinigt werden. In den Elutionsfraktionen sind neben dem gereinigten HvoCas6 auch andere Proteine vorhanden, wobei jedoch die Fusionsproteine jeweils die dominante Bande darstellen.



4.3.2.3. Gelfiltration

Die Elutionsfraktionen der Cas6-Reinigungen aus *H. volcanii*-Extrakten wurden einer Gelfiltration unterzogen, um eine weitere Reinigung zu erreichen. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und angefärbt. Wie in Abbildung 4.20 und 4.21 ersichtlich ist, befindet sich bei allen drei Cas6-Eluaten der Hauptteil der Proteine in der Fraktion A2 bei einem Elutionsvolumen von ca. 1 bis 1,5 ml. Im Vergleich mit dem Proteinmarker entspricht dies einer Größe von ca. 670 kDa. Anhand der Färbung der elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen ist ersichtlich, dass sowohl Cas6 als auch andere in den Reinigungen enthaltenen Proteine in höhermolekularen Aggregaten vorliegen. Es konnte also keine weitere Reinigung erreicht werden.





4.4. Untersuchung der Prozessierung *in vitro*

Durch die Untersuchung der RNA in verschiedenen *H. volcanii*-Stämmen konnte ermittelt werden, dass die Cas-Proteine Cas5, Cas6 und Cas7 essentiell für die Aufrechterhaltung einer stabilen Population an reifer crRNA *in vivo* sind. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass diese Proteine in einem Komplex vorliegen. Es ist anzunehmen dass nur eines dieser Cas-Proteine die prozessierende Endonuklease darstellt, während die anderen möglicherweise eher für die Bindung und/oder Stabilisierung der Prä-crRNA bzw. reifen crRNA benötigt werden, um diese vor Degradierung zu schützen. Es ist dabei denkbar, dass einerseits die Prozessierung unabhängig von der Komplexbildung stattfindet und die reife crRNA Voraussetzung für die Bildung des Komplexes ist. Andererseits könnte die Ausbildung des Komplexes Voraussetzung für die Prozessierung sein. Anhand der *in vivo*-Untersuchungen kann nicht unterschieden werden, welche Vorgänge in welcher Reihenfolge stattfinden, da nur der stationäre Zustand der crRNA-Population erfasst werden kann. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Prozessierung der Prä-crRNA auch *in vitro* stattfindet, da dies eine gute Möglichkeit darstellt, die Vorgänge genauer zu untersuchen. So sollte untersucht werden, ob Cas6, welches in anderen Organismen als Endonuklease identifiziert werden konnte, alleine die Prozessierung bewerkstelligen kann. Desweiteren sollte getestet werden, ob die durch Ko-Aufreinigung erhaltenen Komplexe *in vitro* crRNA-Vorläufer schneiden.

Um die geeigneten Parameter für eine erfolgreiche *in vitro* Prozessierungsreaktion zu finden, wurden diverse Bedingungen getestet. So wurden einerseits unter Niedrig- und Hochsalzbedingungen aus *H. volcanii* gereinigtes Cas6 (siehe Kapitel 4.3.2.2.) und andererseits Ko-Aufreinigungen des Cascade-Komplexes (siehe Kapitel 4.2.3.2.) verwendet. Dabei wurden diejenigen Ko-Aufreinigungseluate verwendet, bei denen Cas6 bzw. Cas7 mit dem Affinitäts-Tag versehen wurden (Cas6-Flag bzw. Cas7-Flag). So ist in der ersten Probe das Cas6-Protein am stärksten repräsentiert und in der zweiten Cas7, wobei in beiden alle drei Cas-Proteine vorhanden sind, welche *in vivo* für eine stabile crRNA-Population vonnöten sind (Abbildung 4.9). Von den Proteinproben wurden verschiedene Mengen bis zu 10 µg getestet. Als RNA-Vorläufer dienten Teile des CRISPR-Locus P2, welche durchgehend radioaktiv markiert wurden (siehe Kapitel 3.9.2.). Der Vorläufer P2-3S2R beinhaltet die ersten drei Spacer und zwei dazwischenliegende Repeats, während der Vorläufer P2-4S3R die ersten vier Spacer und entsprechend drei Repeats aufweist (siehe Abbildung 4.22 G). Zudem wurde als Vorläufer Repeat-RNA des Locus P2 eingesetzt, wobei diese einerseits am 5'- und andererseits am 3'-Ende radioaktiv markiert wurde (siehe Kapitel 3.9.1.). Durch die Endmarkierung kann bei einer eventuellen Prozessierung nur eines der zwei Spaltprodukte detektiert werden. Desweiteren wurden diverse Puffer-Bedingungen getestet, bei denen der pH-Wert und die Salz-Zusammensetzung variieren. Zuletzt wurden verschiedene Inkubationszeiten zwischen 10 Minuten und 16 Stunden angesetzt.

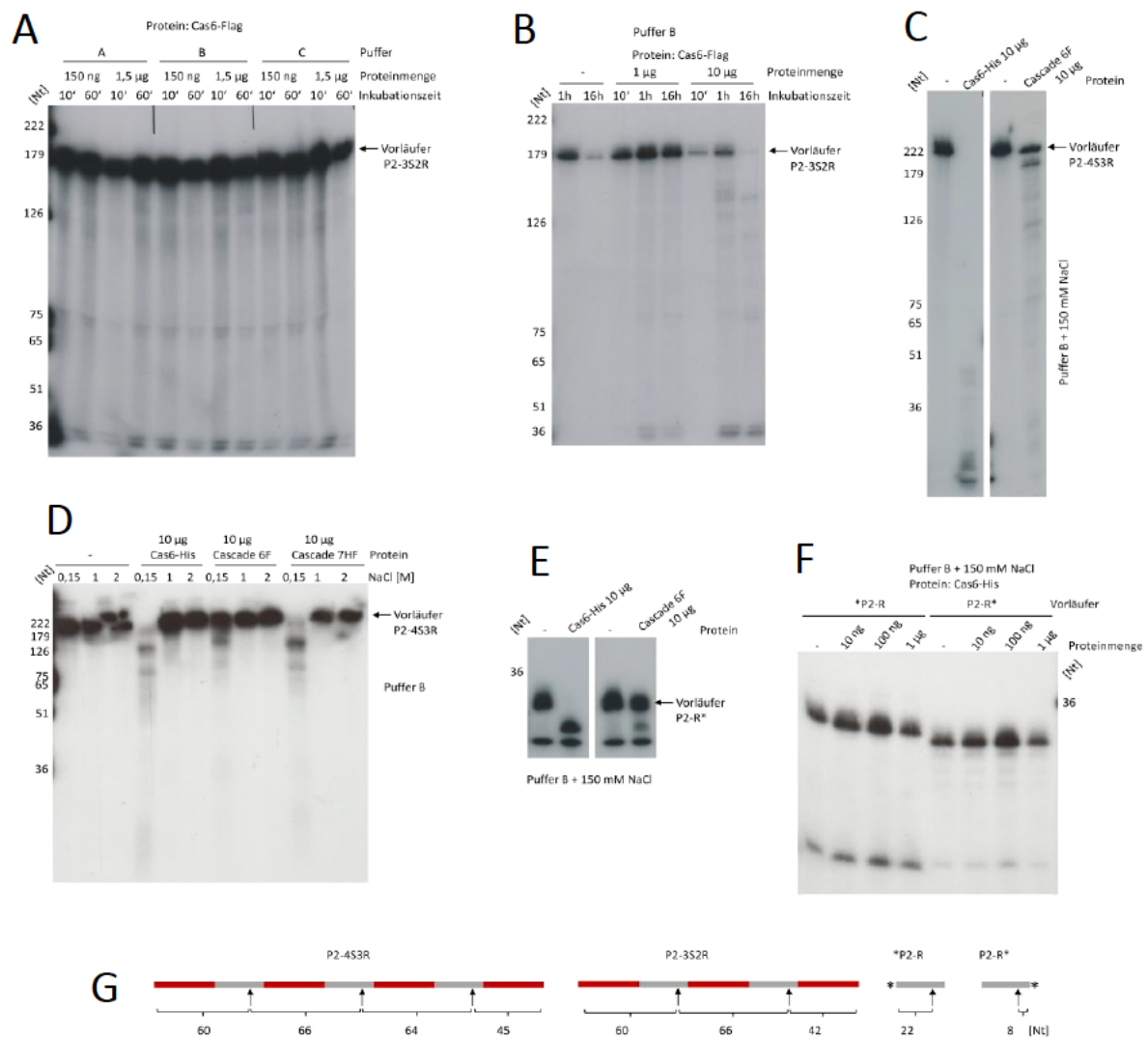


Abbildung 4.22: Untersuchung der Prozessierung von radioaktiv markierter RNA *in vitro*. Dargestellt ist jeweils die Röntgenfilm-Exposition der Harnstoff-Polyacrylamidgele. Der DNA-Größenstandard (pGEM) ist jeweils in Nukleotiden angegeben. Prozessierungsbedingungen: (A) Protein: 150 ng bzw. 1,5 µg HvoCas6-Flag, Vorläufer: P2-3S2R, Puffer: ivp-Puffer A (20 mM Tris pH 8, 100 nM ZnCl₂, 5 mM MgCl₂, 1 mM KCl), ivp-Puffer B (50 mM MES pH 5,5, 5 mM MgCl₂, 60 mM KCl), ivp-Puffer C (50 mM MES pH 6,5, 20 mM MgCl₂), Inkubationszeit 10 min/60 min. (B) Protein: kein Protein bzw. 1 und 10 µg HvoCas6-Flag, Vorläufer: P2-3S2R, Puffer: ivp-Puffer B, Inkubationszeit 10 min, 1 Stunde und 16 Stunden. (C) Protein: kein Protein bzw. 10 µg HvoCas6-His und Cascade-Ko-Aufreinigung Cas6-Flag, Vorläufer: P2-4S3R, Puffer: ivp-Puffer B + 250 mM NaCl, Inkubationszeit: 3,5 Stunden. (D) Protein: kein Protein bzw. 10 µg HvoCas6-His und Cascade-Ko-Aufreinigungen Cas6-Flag und Cas7-Flag, Puffer: ivp-Puffer B mit Zusatz von NaCl (Endkonzentrationen 150 mM, 1M, 2M), Inkubationszeit: 2,5 Stunden. (E) Protein: kein Protein bzw. 10 µg HvoCas6-His und Cascade-Ko-Aufreinigung Cas6-Flag, Vorläufer: 3'-markierte Repeat-RNA P2, Puffer: ivp-Puffer B + 250 mM NaCl, Inkubationszeit: 3,5 Stunden. (F) Protein: kein Protein bzw. 10, 100 ng und 100 µg HvoCas6-His. Vorläufer: P2-Repeat mit 5'- und 3'-Markierung (*P2-R bzw. P2-R*), Puffer: ivp-Puffer B + 150 mM NaCl, Inkubationszeit: 2 Stunden. (G) schematische Darstellung der Vorläufer. P2-4S3R: Spacer 1 bis Spacer 4 des Locus P2 (durchgehend radioaktiv markiert), P2-3S2R: Spacer 1 bis Spacer 3 des Locus P2 (durchgehend radioaktiv markiert), *P2-R: Repeat des Locus P2 mit 5'-Markierung, P2-R*: Repeat des Locus P2 mit 3'-Markierung. Die Pfeile markieren die putativen Prozessierungsstellen. Unterhalb sind die Größen der entstehenden Fragmente in Nukleotiden angegeben.

Wie in Abbildung 4.22 (A-D) zu erkennen ist, konnte bei den Vorläufern P2-3S2R und P2-4S3R keine spezifische Prozessierung beobachtet werden. Durch den Schnitt innerhalb des Repeats zwischen den 22. und 23. Nukleotid wäre eine Bande bei ca. 70 Nukleotiden zu erwarten, wie sie auch bei den Detektionen der reifen crRNA bei Northern Blots auftritt. Dies ist bei keiner der getesteten Bedingungen der Fall. Bei der Zugabe von 150 mM NaCl kann ein Abbau des Vorläufers beobachtet werden, wobei sich eine relativ starke Bande bei ca. 180 Nukleotiden zeigt und einige schwächere auf geringeren Höhen. Unter Hochsalzbedingungen (1-2 M NaCl) ist dieser Effekt nicht mehr vorhanden (D). Bei den Prozessierungstests mit Repeat-RNA als Vorläufer kann eine kleinere Bande detektiert werden (E). Beim Vergleich von 5'- und 3'-markierter RNA ist jedoch zu sehen, dass diese Bande bei beiden Vorläufern auf der gleichen Höhe auftritt (F). Es müssten jedoch aufgrund der jeweiligen Endmarkierung Produkte verschiedener Größe detektiert werden. Es ist daher anzunehmen, dass es sich um unspezifischen Abbau handelt.

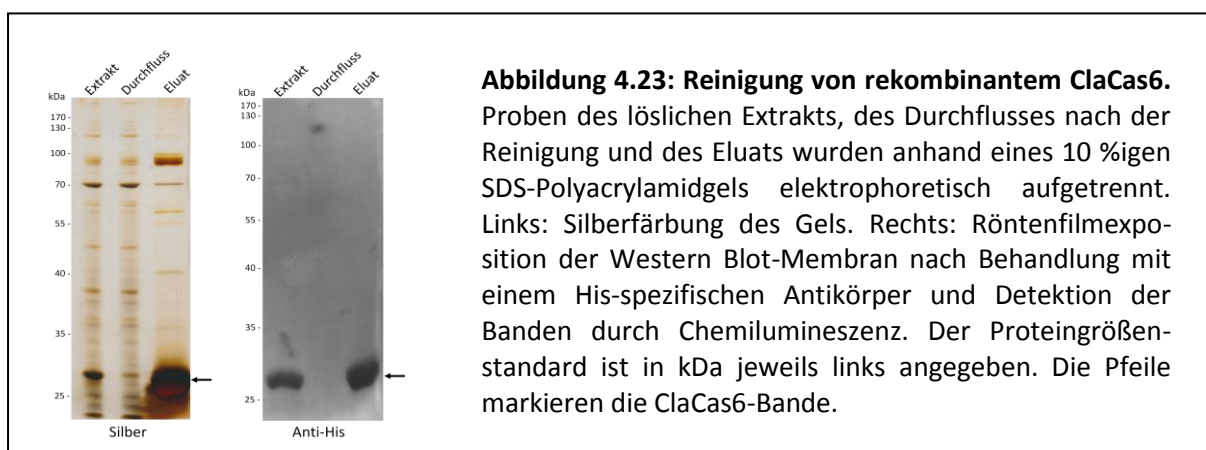
4.5. Untersuchung von Cas6 aus *C. lactoaceticus* (ClaCas6)

Neben den Untersuchungen von Cas6 aus *H. volcanii* wurde außerdem ein Cas6-Protein aus einem anderen Organismus, *C. lactoaceticus*, analysiert. In Zusammenarbeit mit anderen Forschergruppen soll die Interaktion zwischen Cas6 und der Repeat-Sequenz genauer charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden Organismen ausgewählt, welche jeweils einer der von Lange *et al.* identifizierten Repeat-Superklassen angehören (LANGE ET AL., 2013). Durch massenspektrometrische Analyse sollen Aminosäuren des Cas6-Proteins und Basen der Repeat-Sequenz identifiziert werden, zwischen welchen eine Interaktion stattfindet, um im Folgenden Vergleiche der Bindung zwischen den verschiedenen Repeat-Familien und der zugehörigen Cas6-Proteine vorzunehmen.

In *C. lactoaceticus* kommen mehrere CRISPR-Loci und *cas*-Gen-Operons vor. Die Sequenzen der Repeats unterscheiden sich je nach Locus und auch innerhalb der Loci. Die im Rahmen dieser Arbeit analysierte Repeat-Sequenz entspricht den in den Loci 8 und 9 vorherrschenden und gehört zur Superklasse A, Sequenzfamilie 1 bzw. Strukturfamilie 10 (LANGE ET AL., 2013). Dabei ist eine putative Schleifen-Sekundärstruktur mit vier Basenpaarungen möglich (Abbildung 1.8). Das analysierte *cas6*-Gen Calla_2409 kommt in einem Operon mit diversen *csm*-Genen vor und gehört daher zu einem Typ III-A-System (Abbildung 1.8). Um die Protein-RNA-Interaktion zwischen Cas6 und der Repeat-RNA *in vitro* zu analysieren, wurde das Cas6-Protein aus *C. lactoaceticus* zunächst rekombinant in *E. coli* überproduziert und gereinigt. Im Folgenden wurde *in vitro* untersucht, ob eine Bindung zwischen Protein und RNA zu beobachten ist und ob eine Prozessierung stattfindet.

4.5.1. Herstellung von rekombinantem Protein

Für die Überproduktion von ClaCas6 in *E. coli* wurde das entsprechende Gen in den Überexpressionsvektor pET28a kloniert, um ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen 6xHis-Tag zu erhalten. Um die Ausbeute an rekombinantem Protein zu erhöhen, wurde dabei die Gensequenz an die Expression in *E. coli* angepasst (siehe Anhang 8.7.). Die Details zur Klonierung des Konstrukts pET28a-*callacas6* sind dem Kapitel 3.2.9. zu entnehmen. Der Vektor wurde in den *E. coli* Stamm BL21AI eingebracht und das Fusionsprotein überproduziert. Für die Untersuchungen des ClaCas6-Proteins *in vitro* ist es essentiell, dass das gereinigte Protein korrekt gefaltet ist, also in der löslichen Fraktion des Zellextrakts zu finden ist. Daher wurde ein löslicher Zellextrakt hergestellt und das His-Fusionsprotein mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose gereinigt. Zur Kontrolle der Reinigung wurden Aliquots des Extrakts, des Durchflusses nach der Reinigung und des Eluats anhand einer SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden einerseits silbergefärbt und andererseits durch Western Blotting auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Diese wurde mit einem His-spezifischen Antikörper behandelt und so die His-Fusionsproteine detektiert. Wie in Abbildung 4.23 ersichtlich wird, wurde bei der Detektion des Western Blots durch den His-Antikörper sowohl im Extrakt als auch in der Elutionsfraktion eine Bande bei ca. 28 kDa erkannt. Das überproduzierte ClaCas6-Fusionsprotein konnte also nicht nur im löslichen Extrakt nachgewiesen werden, sondern auch erfolgreich aufgereinigt werden. Wie an der Silberfärbung erkannt werden kann, ist im Eluat hauptsächlich das gereinigte Protein vorhanden. Einige weitere, schwächere Banden wurden nicht durch den Antikörper detektiert. Dabei handelt es sich daher wahrscheinlich um *E. coli*-Proteine, welche durch unspezifische Bindung an die Säulenmatrix mitgereinigt wurden. Da im Durchfluss keine Signale erhalten wurden, ist davon auszugehen, dass die im Extrakt vorliegenden Fusionsproteine annähernd vollständig aufgereinigt wurden. Um die Identität des gereinigten Proteins zu bestätigen, wurde die Bande bei ca. 28 kDa einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Dabei konnte der höchste Peptid-Wert für das gewünschte Protein erhalten und damit bestätigt werden, dass es sich bei dem gereinigten Protein um ClaCas6 handelt (siehe Anhang 8.5.).



4.5.2. Untersuchung der Protein-RNA-Interaktion

Um zu überprüfen, ob ClaCas6 *in vitro* an Repeat-RNA bindet, wurden zunächst EMSAs (*electrophoretic mobility shift assays*) mit rekombinantem Protein und radioaktiv markierter Repeat-RNA durchgeführt. Dabei werden Protein und RNA in einem entsprechenden Puffer inkubiert und danach der Ansatz anhand eines nativen Polyacrylamidgels aufgetrennt. Bilden sich stabile Komplexe aus Protein und RNA, so laufen diese während der Elektrophorese langsamer. Das Gel wird einem röntgensensitiven Film exponiert, um die radioaktiv markierte RNA zu detektieren. So können die höhermolekularen Ribonukleoproteinkomplexe von der ungebundenen RNA unterschieden werden. Als RNA-Interaktionspartner wurde die Repeat-RNA „CallaD“ verwendet, welche an Position 22 ein Desoxynukleotid enthält. Von anderen Organismen ist bekannt, dass die reife crRNA am 5'-Ende 8 Nukleotide des Repeats aufweist. Im Falle des Repeats aus *C. lactoaceticus* findet der endonukleolytische Schnitt also wahrscheinlich zwischen dem 22. und 23. Nukleotid statt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der Modifikation des 22. Nukleotids keine Spaltung stattfinden kann. Um die optimalen Bedingungen für die Ausbildung von Ribonukleoproteinkomplexen zu finden, wurden mehrere Proteinmengen und Inkubationstemperaturen getestet. Da im Folgenden die Komplexe massenspektrometrisch hinsichtlich der Bindungsstellen untersucht werden sollten, wurden außerdem Ansätze ohne Glycerin und DTT durchgeführt, da diese Chemikalien die Analyse stören würden. Zuletzt wurde ermittelt, ob die gebildeten Komplexe auch bei hohen Ionenstärken stabil sind.

Wie in Abbildung 4.24 zu sehen ist, wurden Komplexe aus ClaCas6 und der markierten RNA gebildet. Dabei konnten bei der verwendeten Menge RNA bei 300 ng oder mehr Protein Komplexe erhalten werden. Die Bindung scheint unabhängig von der Inkubationstemperatur zu sein, da bei allen getesteten Temperaturen gleichermaßen Banden ausgeprägt sind. Desweiteren konnte die Komplexbildung sowohl ohne die proteinstabilisierenden Chemikalien DTT und Glycerin, als auch bei hoher Ionenstärke von 300 mM Kaliumchlorid stattfinden. Zuletzt ist zu beobachten, dass bei einer Vergrößerung der Protein- und RNA-Menge um das Zehnfache auch eine erhöhte Menge Komplexe gebildet wurde.

Im Folgenden wurde eine Quervernetzung der Ribonukleoproteinkomplexe mit Hilfe einer UV-Behandlung durchgeführt. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht von 254 nm Wellenlänge kommt es zur kovalenten Verknüpfung von räumlich nahe liegenden Molekülen der interagierenden Proteine bzw. Ribonukleinsäuren. Die daraus resultierenden, stabilen Komplexe können unter denaturierenden Bedingungen durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese analysiert oder massenspektrometrischen Untersuchungen unterzogen werden. Für die Quervernetzung wurde 5 µg rekombinantes, gereinigtes ClaCas6-Protein und 100 cpm markierte Repeat-RNA in Puffer ohne Glycerin und DTT bei 37 °C zur Bindung inkubiert, anschließend unterschiedlich lange mit UV-Licht behandelt und die Proben anhand eines SDS-Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt. Zudem wurden Kontrollreaktionen ohne Protein, ohne RNA und ohne UV-Behandlung durchgeführt. Die Proteinbanden wurden durch

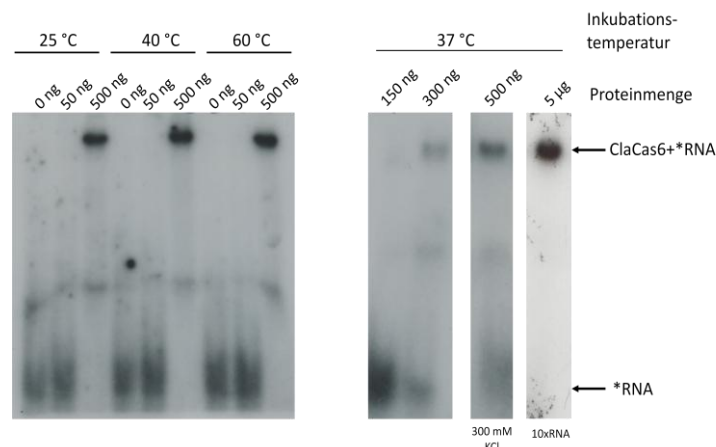


Abbildung 4.24: EMSA-Analysen von ClaCas6 mit markierter Repeat-RNA. Nach Inkubation der Ansätze (Angabe der Temperatur oberhalb) wurden diese anhand eines nativen, 10 %igen Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel über Nacht einem röntgensensitiven Film exponiert. Die eingesetzte Menge Protein ist oberhalb angegeben. Bei den Ansätzen links (Spuren 1-9) wurde Glycerin- und DTT-haltiger Puffer eingesetzt, bei den Ansätzen rechts (Spuren 10-13) Puffer ohne Glycerin und DTT. Dem Ansatz in Spur 12 wurde KCl (Endkonzentration 300 mM) zugesetzt. Die Expositionszeit bei Spur 13 betrug lediglich eine Stunde, bei allen anderen Spuren 16 Stunden. Die RNA stellte radioaktiv markierte Repeat-RNA „CallaD“ dar, wobei pro Ansatz 10 cpm eingesetzt wurden, mit Ausnahme des 13. Ansatzes, bei welchem die zehnfache Menge von 100 cpm eingesetzt wurde. Durch Pfeile sind die ungebundene RNA (*RNA) und die Protein-RNA-Komplexe (ClaCas6+*RNA) markiert.

Färbung mit Coomassie und die markierte RNA durch Exposition eines röntgensensitiven Films detektiert. Wie in Abbildung 4.25 anhand der Film-Exposition ersichtlich wird, konnte bei ca. 70 kDa eine Bande detektiert werden, welche beim Kontrollansatz ohne Protein bzw. ohne UV-Bestrahlung nicht sichtbar ist. Dabei handelt es sich um quervernetzte Protein-RNA-Komplexe. Durch Vergleich mit der ungebundenen RNA zeigt sich, dass der Großteil dieser jedoch nicht vernetzt wurde. Auch durch Modifikation der UV-Behandlung (Erhöhung der Dauer, Mischen der Proben während der Bestrahlung, geringere Entfernung zur Lichtquelle) konnte die Effektivität der Vernetzung nicht erhöht werden. Bei der Färbung der Proteinbanden mit Coomassie konnte die Komplex-Bande, wahrscheinlich aufgrund der geringen Menge, nicht detektiert werden.

4.5.3. Untersuchung der Prozessierung von ClaCas6 *in vitro*

Um zu ermitteln, ob ClaCas6 Repeat-RNA spalten kann, wurden mit dem rekombinant gereinigten Protein *in vitro* Prozessierungen durchgeführt. Dabei wurden hinsichtlich des verwendeten Puffers dieselben Bedingungen gewählt, unter welchen eine erfolgreiche Bindung beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 4.5.2.). Als Vorläufer wurde radioaktiv markierte Repeat-RNA verwendet. Dabei wurde nicht nur „CallaD“, welches durch ein

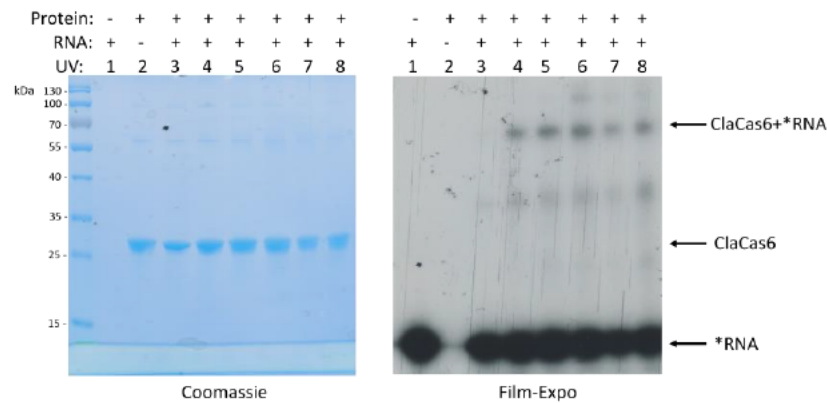


Abbildung 4.25: Quervernetzung von ClaCas6-Repeat-Komplexen. Nach der Bindung von Protein und RNA wurden die Proben im offenen Reaktionsgefäß mit UV-Licht bestrahlt (1: 10 min, 2: 10 min, 3: keine UV-Behandlung, 4: 5 min, 5: 10 min, 6: 10 min (Proben näher an der Lichtquelle), 7: 2x 5 min (zwischendurch Mischen), 8: 4x 5 min (zwischendurch Mischen)). Die Ansätze wurden anhand eines SDS-Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt, das Gel mit Coomassie gefärbt (links) und für 16 Stunden einem röntsensitiven Film exponiert (rechts). Der Proteingrößenstandard ist in kDa angegeben. Durch Pfeile sind die ungebundene, radioaktiv markierte RNA „CallaD“ (*RNA), das ungebundene Protein ClaCas6 und die Protein-RNA-Komplexe markiert (ClaCas6+*RNA).

Desoxynukleotid an der 22. Position nicht gespalten werden kann (siehe Kapitel 4.5.2.), sondern auch „Calla“-Repeat-RNA ohne diese Modifikation verwendet. Wie in Abbildung 4.26 ersichtlich wird, konnte keine spezifische Spaltung der Repeats beobachtet werden. Zwar kommt es bei großen Proteinmengen zu einem Abbau des Vorläufers, jedoch zeigt sich dieser in gleichem Maße bei dem unspaltbaren „CallaD“-Repeat. Es ist daher anzunehmen, dass es sich um unspezifische Degradation durch in der Proteinpräparation vorliegende RNasen handelt.

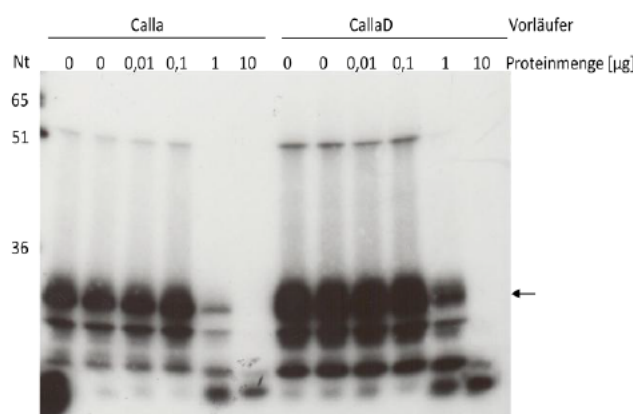


Abbildung 4.26: Untersuchung der Prozessierung von ClaCas6 *in vitro*. Dargestellt ist die Röntgenfilm-Exposition des 12 %igen Harnstoff-Polyacrylamidgels. Der DNA-Größenstandard ist links in Nukleotiden angegeben. Oberhalb ist die Proteinmenge (0 bis 10 µg) und der radioaktiv markierte Vorläufer (Repeat-RNA „Calla“ bzw. „CallaD“, jeweils 5'-markiert) angegeben. Verwendeter Puffer: ivp-Puffer Cla (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂), Inkubationszeit 1,5 h. Der Pfeil markiert den Vorläufer bei ca. 30 Nukleotiden.

5. DISKUSSION

5.1. Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen Cas-Proteine

Um in späteren Experimenten die Möglichkeit zu haben, Cas-Proteine spezifisch nachzuweisen, sollten polyklonale Antikörper gegen Cas5, Cas6 und Cas7 aus *H. volcanii* hergestellt werden. Dazu wurden die jeweiligen Proteine rekombinant in *E. coli* überproduziert, aus Zellextrakten isoliert und zur Immunisierung von Mäusen verwendet. Die aus dem Blut der Tiere gewonnenen, antikörperhaltigen Seren wurden mit verschiedenen Proteinproben auf ihre Spezifität untersucht.

Zur Gewinnung von Antigenmaterial wurden die rekombinant in *E. coli* überproduzierten Proteine aus Einschlusskörperchen gewonnen. Diese stellen unlösliche Aggregate von nicht korrekt gefalteten Proteinen im Zytoplasma dar und enthalten meist einen großen Teil des rekombinanten Proteins. Da der Hauptteil der zellulären Proteine in der löslichen Fraktion des Zellextrakts zu finden ist, erleichtert die Gewinnung aus Einschlusskörperchen die Reinigung des Antigens. Im Falle aller drei rekombinanten Proteine konnte in den aus Einschlusskörperchen hergestellten Harnstoffextrakten eine dominante Bande in der gewünschten Höhe festgestellt werden (Abbildung 4.1). Die jeweiligen Proteine konnten also erfolgreich überproduziert werden und lagen in ausreichender Menge in der unlöslichen Fraktion des Zellextrakts vor. Aufgrund der Dominanz der entsprechenden Banden im Vergleich zu anderen in den Harnstoffextrakten vorliegenden Proteinen verschiedener Größe konnten diese weitgehend exklusiv aus den gefärbten Western Blot-Membranen ausgeschnitten werden. Es ist also anzunehmen, dass in den zur Immunisierung verwendeten Antigenlösungen nur in geringem Maße andere Proteine zu finden waren.

Zum Testen der antigenhaltigen Seren wurden Detektionen von Western Blots mit verschiedenen Proben durchgeführt. Dabei wurde nach der Behandlung mit dem jeweiligen Serum eine weitere Behandlung mit einem gegen murine Immunglobuline spezifischen Antikörper durchgeführt, welcher eine gekoppelte Peroxidase aufweist. Dadurch wird die Detektion von Banden durch Chemilumineszenz ermöglicht. Für alle drei Seren konnten dabei Banden erhalten werden (Abbildung 4.2). Unter denselben Bedingungen wurden die jeweiligen Prä-Immun-Seren getestet. Diese wurden aus Blut gewonnen, welches den Mäusen vor der Verabreichung der Antigenlösungen entnommen wurde. Dabei konnten keinerlei Signale erhalten werden. Es wurden also im Zuge der Immunreaktion Antikörper gegen die Antigene gebildet. Desweiteren erwiesen sich die angewendeten Detektionsbedingungen als geeignet.

Anhand der Test-Detektionen, aber auch beim Einsatz der Antikörper bei den Reinigungen von Cas-Proteinen aus *H. volcanii* (Abbildung 4.2 bzw. Abbildung 4.10) konnten spezifische Signale für die jeweiligen Cas-Proteine erhalten werden. Allerdings ergaben sich teilweise zusätzliche Signale. Im Falle von Banden von geringerer Höhe kann es sich dabei um Abbau-produkte des Proteins handeln, bei Signalen in größerer Höhe um Dimere oder Komplexe,

welche stabil genug sind, um den denaturierenden Bedingungen der SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese standzuhalten. In diesen Fällen läge keine Einschränkung der Spezifität des Antikörpers vor. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit der Kreuzreaktion mit anderen Proteinen. Im Falle der Eluate der Ko-Aufreinigung von putativen Komplex-Untereinheiten (Abbildung 4.10) wurden beispielsweise Banden detektiert, welche anhand des FLAG-spezifischen Antikörpers und der massenspektrometrischen Analyse eindeutig als andere Cas-Proteine identifiziert werden konnten. Dieser Umstand hat selbstverständlich schwerwiegende Folgen für die Interpretation der Ergebnisse der Detektionen. So kann der Nachweis des jeweiligen Proteins anhand des Antikörpers nur als Hinweis gesehen werden, welcher einer Validierung durch andere Methoden wie beispielsweise der massenspektrometrischen Analyse bedarf. Um eine höhere Spezifität der Antikörper zu erreichen könnte der Versuch unternommen werden, diese affinitätschromatographisch aufzureinigen. Dabei könnte beispielsweise eine Säule mit immobilisiertem Protein A verwendet werden, welches Immunglobuline bindet. Eine effektivere Reinigung könnte durch Bromcyan-aktivierte Sepharose erreicht werden, an welche Proteine über deren Aminogruppen gekoppelt werden können. In diesem Fall könnte das jeweilige Cas-Protein verwendet werden, um eine spezifische Reinigung der entsprechenden Antikörper zu erreichen. Andererseits könnte der Grund für die Beobachtung, dass die Antikörper jeweils andere Cas-Proteine erkennen, auch darin begründet sein, dass die untersuchten Proteine Cas5, Cas6 und Cas7 alle zur Gruppe der sogenannten RAMP-Proteine (*repeat associated mysterious proteins*) gehören. Diese weisen verschiedene strukturelle Gemeinsamkeiten wie RNA-bindende Motive und Glycinreiche Schleifen auf (MAKAROVA ET AL., 2011c). Es wäre also denkbar, dass Teile dieser Strukturen auch bei den denaturierenden Bedingungen der Antigen-Gewinnung und Detektion erhalten bleiben und es daher zu Kreuzreaktionen kommt. In diesem Fall wäre es zu empfehlen, als Antigen nur Teile der jeweiligen Proteine einzusetzen, welche möglichst einzigartig für jenes Protein sind. Dadurch könnte eine höhere Spezifität erreicht werden und Kreuzreaktionen mit anderen Cas-Proteinen vermieden werden.

Zuletzt kann festgestellt werden, dass es kaum bzw. nicht möglich ist, anhand der angewendeten Bedingungen die jeweiligen Cas-Proteine mit Hilfe der spezifischen Antikörper in Wildtyp-Extrakten von *H. volcanii* nachzuweisen. Lediglich im Fall von Cas7 konnte eine sehr schwache Bande erhalten werden, während durch die Antikörper gegen Cas5 und Cas6 keine Signale detektiert werden konnten. Der Anteil der Cas-Proteine am Gesamt-Protein in der Zelle ist offensichtlich zu gering bzw. die Affinität der Antikörper nicht ausreichend.

5.2. Überprüfung der Knockout-Stämme

Zur Untersuchung der Funktion verschiedener Cas-Proteine wurden diverse *cas*-Gene aus dem Genom von *H. volcanii* mit Hilfe der Pop-in/Pop-out-Methode (ALLERS&NGO, 2003) deletiert (Kapitel 4.2.1.3. und 4.2.2.1.). Um zu bestätigen, dass alle Kopien der jeweiligen Gene aus dem polyploiden Genom entfernt wurden, wurden die Stämme anhand von

Sondenhybridisierungen von Southern Blots überprüft. Dies war für alle Knockout-Stämme erfolgreich. Es konnten jeweils diejenigen Banden detektiert werden, welche sich aus dem Fehlen der entsprechenden Gene ergeben.

Im Falle des *cas5*-Knockout-Stamms (Kapitel 4.2.2.1.) konnte durch Hybridisierung mit einer Sonde, welche stromaufwärts des *cas5*-Gens bindet, ein Fragment detektiert werden, welches sich aus dem Entfernen des *cas5*-Gens ergibt (Abbildung 4.8). Desweiteren konnte bei der Verwendung einer *cas5*-spezifischen Sonde gezeigt werden, dass die sich für den Wildtyp ergebenden Fragmente im Knockout-Stamm nicht detektiert werden können. Bei beiden Sonden-Hybridisierungen ergaben sich keine weiteren, unspezifischen Banden.

Im Falle der Knockout-Stämme zur Untersuchung der crRNA-Prozessierungsmaschinerie, bei denen jeweils mehrere *cas*-Gene deletiert wurden (Kapitel 4.2.1.4.), wurden für die Detektion mehrere Sonden gleichzeitig verwendet. Dabei ergaben sich für alle Stämme diejenigen Banden, welche aus der neuen genomischen Situation durch Entfernen der jeweiligen Gene resultieren (Abbildung 4.5). Allerdings zeigten sich auch diverse weitere, schwache Banden. Diese entsprechen jedoch keinem möglichen Fragment, welches in den Knockout-Stämmen oder aber im Wildtyp durch den Verdau mit dem verwendeten Restriktionsenzym entstehen könnte. Es ist also wahrscheinlich, dass diese Banden unspezifisch sind und einerseits durch fehlerhaftes oder unvollständiges Schneiden des Enzyms während des Verdau der genomischen DNA oder andererseits durch unspezifisches Binden der Sonden verursacht wurden. Es ist jedoch festzuhalten, dass sich dabei in keinem der Stämme Banden bei denjenigen Höhen zeigten, welche sich bei Anwesenheit der jeweiligen Gene, also einer nicht erfolgreichen bzw. vollständigen Deletion, ergeben würden. Es kann daher festgestellt werden, dass die Herstellung aller Knockout-Stämme erfolgreich war.

5.3. Untersuchung der crRNA-Prozessierungsmaschinerie

Anhand von Analysen der RNA aus *H. volcanii* konnte gezeigt werden, dass die CRISPR-Loci transkribiert werden und eine Prozessierung der Prä-crRNA in reife crRNA stattfindet (FISCHER *ET AL.*, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit sollte ermittelt werden, welche Cas-Proteine an der Aufrechterhaltung einer stabilen Population an crRNA beteiligt sind. Dazu wurden verschiedene Kombinationen von *cas*-Genen mit Hilfe eines Plasmids in einen *H. volcanii*-Stamm eingebracht, welcher eine Deletion des gesamten *cas*-Operons aufweist (FISCHER *ET AL.*, 2012), und untersucht, inwiefern dadurch die Prozessierung und Stabilisierung der reifen crRNA wiederhergestellt werden kann. Durch Analyse der RNA anhand von Northern Blots konnte ermittelt werden, dass der *cas*-Deletionsstamm H26Δ*cas*(28) nicht zur Produktion und/oder Stabilisierung reifer crRNA fähig ist (Abbildung 4.3). Für eine stabile crRNA-Population sind also eindeutig Cas-Proteine vonnöten, wobei eine Beteiligung anderer Faktoren nicht auszuschließen ist. Die Komplementation dieses Stamms durch verschiedene

cas-Gene ergab, dass für die Wiederherstellung einer Wildtyp-ähnlichen Menge reifer crRNA die *cas*-Gene *cas6*, *cas7* und *cas5* vorhanden sein müssen. Die zusätzliche Anwesenheit des *cas8*-Gens ist nicht erforderlich und verursacht keine Veränderung des crRNA-Levels. Bei der Komplementation mit den *cas*-Genen *cas6*, *cas8* und *cas5* konnte eine reduzierte Menge crRNA festgestellt werden (Abbildung 4.3). Diese Ergebnisse konnten durch die Herstellung und Untersuchung von verschiedenen Knockout-Stämmen bestätigt werden. Die Analyse der crRNA-Level in diesen Stämmen ergab eine Wildtyp-ähnliche Menge crRNA in den Stämmen „6875“ und „675“ und ein reduziertes crRNA-Level im Stamm „685“ (Abbildung 4.6). Diese Mindestanforderung von Cas-Proteinen wird auch durch die Analyse der Knockout-Stämme $\Delta cas5$ (Abbildung 4.8), $\Delta cas6$, $\Delta cas7$ und $\Delta cas8$ (STOLL, 2013) bestätigt. So findet sich in den Stämmen $\Delta cas5$ und $\Delta cas6$ keine reife crRNA mehr, im $\Delta cas7$ -Stamm eine reduzierte Menge, während das Entfernen des *cas8*-Gens keinen Einfluss auf das crRNA-Level hat.

Anhand dieser Ergebnisse kann zwar festgehalten werden, dass für eine stabile crRNA-Population die Cas-Proteine Cas5, Cas6 und Cas7 essentiell sind, jedoch ist daraus nicht abzuleiten, welche Rolle die jeweiligen Proteine dabei spielen. So kann das Fehlen reifer crRNA bei Abwesenheit einzelner Proteine einerseits darauf zurückgeführt werden, dass keine Prozessierung stattfindet, andererseits ist auch ein Abbau der crRNA denkbar. Durch die Feststellung der crRNA-Menge *in vivo* kann dazwischen nicht unterschieden werden. Es kann jedoch festgestellt werden, dass nur in denjenigen Knockout- bzw. Komplementationsstämmen crRNA nachgewiesen werden kann, welche die *cas*-Gene *cas5* und *cas6* aufweisen. Es ist daher anzunehmen, dass diese Cas-Proteine direkt oder indirekt, beispielsweise durch Stabilisierung des endonukleolytisch aktiven Proteins, an der Prozessierungsreaktion selbst beteiligt sind. Cas7, bei dessen Abwesenheit noch zu einem gewissen Teil crRNA zu finden ist (Stamm „685“), ist womöglich eher für die Stabilisierung der reifen crRNA und deren Schutz vor Abbau vonnöten. Die Tatsache, dass der Stamm „675“ wildtyp-ähnliche Mengen crRNA aufweist, während diese im Stamm „685“ reduziert ist, spricht dafür, dass Cas8 ebenfalls im gewissen Maße für den Schutz der reifen crRNA sorgen kann.

Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Erkenntnissen, welche über die Prozessierung in *E. coli* für den CRISPR/Cas-Typ I-E gewonnen wurden (BROUNS *ET AL.*, 2008). Auch hier ergaben Untersuchungen von Knockout-Stämmen anhand von Northern Blots, dass in den Stämmen $\Delta cas5$ und $\Delta cas6$ keine reife crRNA mehr detektiert werden kann, während im Stamm $\Delta cas7$ die Menge reduziert ist. Durch Komplementationen eines Stamms, welcher keine *cas*-Gene aufweist, mit verschiedenen *cas*-Genen auf einem Plasmid konnte festgestellt werden, dass wildtyp-ähnliche crRNA-Mengen nur wiederhergestellt werden können, indem die *cas*-Gene *cas5*, *cas6*, *cas7* und eingebracht werden, während *cas8* nicht nötig ist. Allerdings ist in *E. coli* zusätzlich das Cas-Protein CasB (Cse2) vonnöten. Dieses ist in Form eines Dimers Teil des in *E. coli* vorliegenden Cascade-Komplex und stellt eine Verbindung zwischen Cas6 und Cas8 her (WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011b). Im Typ I-B System von *H. volcanii* liegt kein vergleichbares Äquivalent zu diesem Protein vor. Bei den Komplementationsexperimenten in *E. coli* konnte außerdem ermittelt werden, dass durch

Einbringen von jeweils vier der fünf Cascade-Untereinheiten Cas5, Cas6, Cas7, Cas8 und CasB nur beim Fehlen von Cas6 keine reife crRNA mehr detektierbar ist (BROUNS *ET AL.*, 2008). Bei Abwesenheit von Cas5 ist, im Gegensatz zu *H. volcanii* (Stamm „687“) noch ein reduziertes Level von crRNA feststellbar. Womöglich wird in *E. coli* die Funktion von Cas5 durch CasB ersetzt, was in *H. volcanii* nicht möglich ist. In *E. coli* besteht also der Hinweis, dass Cas6 die prozessierende Endonuklease ist, was in späteren Experimenten bestätigt werden konnte (BROUNS *ET AL.*, 2008). Diese Annahme kann durch die gewonnenen Erkenntnisse für *H. volcanii* nicht bestätigt werden. Die Parallelen zum I-E System von *E. coli* legen allerdings die Vermutung nahe, dass auch in *H. volcanii* ein Cascade-ähnlicher Komplex vorliegt.

Um zu ermitteln, welche Proteine für eine erfolgreiche Interferenzreaktion vonnöten sind, wurden diejenigen Stämme, bei welchen wildtyp-ähnliche crRNA-Mengen festgestellt wurden (Stämme „6875“ und „675“) Interferenztests unterzogen. Dabei konnte festgestellt werden, dass diese Stämme nicht zum Abbau des Angreiferplasmids fähig sind. Durch Einbringen des *cas3*-Gens auf einem Plasmid konnte im Falle des Stamms „6875“ eine erfolgreiche Interferenzreaktion beobachtet werden, während der Stamm „675“ auch durch Zugabe von Cas3 nicht zur Interferenz fähig war (Tabelle 4.2). Es kann also festgestellt werden, dass sowohl Cas8 als auch Cas3 essentiell für eine erfolgreiche Interferenzreaktion sind. Diese Ergebnisse sind ebenfalls vergleichbar mit den Erkenntnissen, die für das Typ I-E System gewonnen wurden. In *E. coli* konnte anhand von Phagen-Infektions-Versuchen festgestellt werden, dass für eine erfolgreiche Abwehr des Phagen der Cascade-Komplex und Cas3 vonnöten sind (BROUNS *ET AL.*, 2008). In *T. thermophilus* konnte durch *in vitro*-Experimente gezeigt werden, dass Cas3 für die Degradation der Ziel-DNA verantwortlich ist (SIKUNAS *ET AL.*, 2013). Für Cas8 hingegen konnte gezeigt werden, dass es im Zuge der Interferenzreaktion wichtig ist. So wurde in *T. thermophilus* beobachtet, dass Cas8 durch die Bindung des PAM-Motivs und des 5'-Endes der crRNA für die Identifikation der abzubauenen Fremd-DNA nötig ist (SASHITAL *ET AL.*, 2013). Zudem konnte in *E. coli* ermittelt werden, dass Cas8 zusätzlich für eine sequenzunspezifische Bindung des Cascade-Komplexes an doppelsträngige DNA verantwortlich ist. Der Grund hierfür wird darin vermutet, dass der Cascade-Komplex über Cas8 DNA nach passenden Ziel-Sequenzen „absucht“ (JORE *ET AL.*, 2011).

In anderen bisher untersuchten Typ I CRISPR/Cas-Systemen sind mehrere Cas-Proteine, welche für die Prozessierung und Stabilisierung der crRNA und die Interferenz-Reaktion essentiell sind, in Form des sogenannten Cascade-Komplexes organisiert. Um zu untersuchen, ob in *H. volcanii* ebenfalls ein vergleichbarer Komplex existiert, wurde der Versuch unternommen, die putativ interagierenden Untereinheiten ko-aufzureinigen. Dazu wurden diejenigen Cas-Proteine, welche mit den Untereinheiten anderer Typ I - Komplexe vergleichbar sind (Cas5, Cas6, Cas7, Cas8), auf einem Plasmid in *H. volcanii* eingebracht und überproduziert. Jeweils eines der Cas-Proteine wurde mit einem Affinitäts-Tag versehen und aus löslichen Zellextrakten gereinigt. Durch Untersuchung der Elutionsfraktionen mittels Antikörperdetektionen und Massenspektrometrie konnten jeweils diverse mitgereinigte Cas-

Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 4.9, 4.10 und 4.11). Durch ein Kontroll-experiment, bei welchem keines der Proteine über einen Affinitäts-Tag verfügte, konnte gezeigt werden, dass keine unspezifische Bindung der überproduzierten Proteine an die Säulenmatrix vorlag (Abbildung 4.9 B). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die mitgereinigten Proteine direkt oder indirekt über andere Protein- oder Nukleinsäure-komponenten in Kontakt mit dem jeweiligen Fusionsprotein stehen. Bei der Reinigung des Cas6-Fusionsproteins konnten Cas5 und Cas7 in der Elutionsfraktion eindeutig nachgewiesen werden. Ebenso waren in der Elutionsfraktion der Reinigung des Cas7-Fusionsproteins Cas5 und Cas6 zu finden, sowie Cas6 und Cas7 im Falle des Cas5-Fusionsproteins. Hier ist jedoch zu erwähnen, dass das mitgereinigte Cas6, obwohl durch die massenspektrometrische Analyse eindeutig identifiziert, nicht dieselbe Größe aufweist wie in den anderen Reinigungen. Trotzdem kann anhand dieser Ergebnisse festgestellt werden, dass die Cas-Proteine Cas5, Cas6 und Cas7 interagieren. Bei der Reinigung des Cas8-Fusionsproteins konnten zwar Cas5, Cas6 und Cas7 in der Elutionsfraktion nachgewiesen werden, allerdings war die Ko-Aufreinigung vergleichsweise wenig effektiv. So ist in der Elution hauptsächlich das Cas8-Fusionsprotein zu finden, während die mitgereinigten Komponenten einen eher geringen Anteil darstellen. Bei den Reinigungen der anderen Fusionsproteine hingegen nehmen die mitgereinigten Proteine einen vergleichsweise größeren Anteil ein. Daraus kann geschlossen werden, dass die Interaktion von Cas5, Cas6 und Cas7 stabil ist, während Cas8 eher schwach assoziiert zu sein scheint. Dies wird auch dadurch untermauert, dass bei den Reinigungen der Cas5-, Cas6- und Cas7-Fusionproteine keine dominante Bande erhalten werden konnte, welche der Größe von Cas8 entspricht. Einige eher schwache Banden, welche möglicherweise Cas8 entsprechen könnten, wurden nicht untersucht.

Es ist zusammenfassend anhand der Ergebnisse der Ko-Aufreinigungsexperimente also festzuhalten, dass auch in *H. volcanii* eine Cascade-ähnlicher Komplex zu finden ist, welcher die Komponenten Cas5, Cas6, Cas7 und Cas8 aufweist. Zwischen Cas5, Cas6 und Cas7 liegt eine stabile Interaktion vor, während Cas8 eher schwach assoziiert ist. Dies konnte auch bei vergleichbaren Untersuchungen in anderen Organismen mit Typ I CRISPR/Cas-Systemen festgestellt werden. So konnten bei Ko-Aufreinigungen des Cascade-Komplexes in *E. coli* (Typ I-E) jeweils die Untereinheiten Cas5, Cas6 und Cas7 mitgereinigt werden, wobei auch Cas8 eindeutig in den Elutionsfraktionen zu finden war. Allerdings konnte bei der Reinigung des Cas8-Fusionsproteins keine der anderen Komponenten nachgewiesen werden, was ebenfalls ein Hinweis darauf ist, dass Cas8 eher schwach assoziiert ist (BROUNS ET AL., 2008). In späteren Untersuchungen mittels Gelfiltration konnte festgestellt werden, dass die Bildung eines stabilen Subkomplex aus den Untereinheiten Cas5, Cas6 und Cas7 möglich ist, also Cas8 für die Ausbildung des Komplexes nicht nötig ist. Dasselbe gilt für die sogenannte „kleine Untereinheit“ CasB, welche in *H. volcanii* jedoch nicht vorkommt (JORE ET AL., 2011). In *B. halodurans* (Typ I-C) wurde ebenfalls ein Komplex anhand von Reinigung von Cas5-Fusionsprotein nachgewiesen, welcher die Komponenten Cas5, Cas7 und Cas8 aufweist. Cas6 ist in diesem Fall nicht zu finden, da in diesem Subtyp kein Cas6-Protein vorkommt. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen der gereinigten Komplexe wurde neben dem

vollständigen Komplex ebenfalls ein Subkomplex ohne die Cas8-Untereinheit festgestellt (NAM *ET AL.*, 2011). In *S. solfataricus*, welches unter anderem ein Typ I-A CRISPR/Cas-System enthält, konnte hingegen bei der Reinigung von Cas7-Fusionsproteinen lediglich Cas5 als stabiler Interaktionspartner identifiziert werden, während Cas8, aber auch Cas6 und die kleine Untereinheit Csa5 nur schwach assoziiert sind (LINTNER *ET AL.*, 2011). Zuletzt wurde ein Subtyp I-F Komplex in *P. aeruginosa* nachgewiesen, welcher die Untereinheiten Cas5, Cas6, Cas7 und Cas8 enthält. Dabei wurden alle vier Komponenten in unabhängigen Reinigungen mit Affinitäts-Tags versehen und es konnten jeweils die anderen Proteine mitgereinigt werden. Im Gegensatz zu den Beobachtungen in *E. coli* (BROUNS *ET AL.*, 2008, JORE *ET AL.*, 2011) und *H. volcanii* (diese Arbeit) konnten auch im Falle des Cas8-Fusionsproteins die anderen Komponenten in der Elutionsfraktion nachgewiesen werden. Bei Untersuchungen des gereinigten Komplexes anhand von nativer Massenspektrometrie konnten allerdings ebenfalls Subkomplexe nachgewiesen werden, bei welchen jedoch neben Cas8 auch Cas5 fehlt (WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011a).

Hinsichtlich der Komponenten ist der in *H. volcanii* existierende Komplex also vergleichbar mit anderen Typ I Cascade-Komplexen. Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist es jedoch nicht möglich, Aussagen über die Stöchiometrie zu treffen. Bei näherer Betrachtung der Elutionsfraktionen verschiedenen Reinigungen ist festzustellen, dass das jeweils mit dem Affinitäts-Tag versehene Protein in allen vier Fällen überrepräsentiert ist (Abbildung 4.9). Daraus ist zu folgern, dass sich in den Elutionen auch zu einem gewissen, unbekannt großen Anteil unkomplexierte Fusionsproteine befinden. Jedoch auch der jeweilige Anteil der mitgereinigten Cas-Proteine scheint bei mehrmaligem Wiederholen der Reinigung leicht zu variieren (nicht gezeigt). Es ist also nicht möglich, anhand der Stärken der Proteinbanden im gefärbten SDS-Polyacrylamidgel verlässliche Rückschlüsse auf die Mengenverhältnisse der Untereinheiten des Komplexes zu ziehen. Um dahingehend eine bessere Einschätzung vornehmen zu können, wurde der Versuch unternommen, die Komplexe anhand einer Gelfiltration von den unkomplexierten Fusionsproteinen zu trennen. Dies war jedoch unter den angewendeten Bedingungen nicht erfolgreich. Mit der verwendeten Säule konnte keine ausreichende Trennung erreicht werden, um einzelne Ausschläge der Absorptionskurve klar zu separieren und hinsichtlich der Größe im Vergleich zum Proteinstandard einzuschätzen. Für eine effektivere Trennung wäre also eine Optimierung der Bedingungen vonnöten, beispielsweise die Anwendung einer anderen Säule und/oder eine Reduzierung des Probenvolumens. Die Färbung der anhand von SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Fraktionen der Gelfiltration zeigte keine Veränderung der Mengenverhältnisse der im ursprünglichen Eluat vorliegenden Proteine. Desweiteren lag der Großteil in höhermolekularen Komplexen von über 670 kDa vor (Abbildung 4.13). Dies könnte darin begründet sein, dass in den Elutionsfraktionen Nukleinsäuren enthalten sind. Die in den Cascade-Komplexen vorliegenden Proteine enthalten laut Strukturvorhersagen Nukleinsäure-bindende Domänen. So weisen Cas5, Cas6, Cas7 und Cas8 RNA-bindende Domänen auf, während Cas8 außerdem DNA-bindende Motive besitzt (MAKAROVA *ET AL.*, 2011c). Für Cas8 wurde außerdem gezeigt, dass es eine unspezifische Bindung des Cascade-Komplexes an

doppelsträngige DNA, womöglich im Zuge der Suche nach geeigneten Ziel-Sequenzen, vermittelt (JORE *ET AL.*, 2011, SASHITAL *ET AL.*, 2013). Es wäre also denkbar, dass die in den Eluaten enthaltenen Proteine über RNA- oder DNA-Moleküle verbunden sind. Dies könnte neben den Cas-Untereinheiten auch weitere Proteine mit nukleinsäurebindenden Eigenschaften betreffen, welche dadurch bei der Isolation des Komplexes unspezifisch mitgereinigt werden. Um dies zu überprüfen sollte der Versuch unternommen werden, die in den Eluaten enthaltenen Nukleinsäuren zu entfernen, beispielsweise durch Behandlung mit geeigneten Nukleasen oder auch anhand von Ionenaustauschchromatographie.

Im Zuge der Interferenzreaktion des CRISPR/Cas-Abwehrsystems dient die crRNA der Erkennung einer abzubauenen Ziel-Nukleinsäure anhand der Protospacer-Sequenz. Zu diesem Zweck ist die crRNA als Teil des Komplexes an die Proteinuntereinheiten gebunden. So konnte aus gereinigten Komplexen aus *E. coli*, *S. thermophilus*, *P. aeruginosa* und *S. solfataricus* reife crRNA isoliert werden (JORE *ET AL.*, 2011; SIKUNAS *ET AL.*, 2013; WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011a; LINTNER *ET AL.*, 2011). Strukturuntersuchungen des *E. coli*-Cascade-Komplexes zeigten, dass diese in einer Furche gebunden ist, welche aus sechs helikal angeordneten Cas7-Untereinheiten gebildet wird (Abbildung 1.5). Desweiteren konnte für diverse Cas6-Proteine von CRISPR/Cas-Typ I gezeigt werden, dass dieses auch nach erfolgter Prozessierung an das 3'-Ende der crRNA gebunden bleibt (WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011a; WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011b; SASHITAL *ET AL.*, 2011; STERNBERG *ET AL.*, 2012). Um zu ermitteln, ob die aus *H. volcanii* isolierten Komplexe ebenfalls crRNA enthalten, wurde aus den gereinigten Komplexen RNA isoliert und anhand von Sondenhybridisierung eines Northern Blots untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich in den Elutionsfraktionen reife crRNA befindet (Abbildung 4.12). Der crRNA-Gehalt scheint sich jedoch je nach Fusionsprotein zu unterscheiden. So ist bei der Reinigung des Cas6-Fusionsproteins deutlich mehr crRNA detektierbar als bei den Cas5- bzw. Cas7-Reinigungen, wohingegen im Cas7-Eluat eine Bande verhältnismäßig mehr in Erscheinung tritt, welche möglicherweise die Prä-crRNA darstellt. Im Cas5-Eluat scheint insgesamt am wenigsten crRNA und putative Prä-crRNA vorhanden zu sein. Diese Beobachtungen sind allerdings allein auf der augenscheinlichen Intensität der Banden begründet und bedürfen einer Verifikation durch Quantifizierung. Zudem sollte die Bande, welche möglicherweise die Prä-crRNA darstellt, durch Sequenzierung eindeutig identifiziert werden. Trotzdem können diese vorläufigen Ergebnisse als Hinweise auf die Funktion der einzelnen Cas-Proteine in *H. volcanii* betrachtet werden. Die Unterschiede im crRNA-Gehalt könnten in den jeweiligen in den Eluaten vorliegenden Proteinen begründet sein. Wie bereits erwähnt, sind die Fusionsproteine in den Elutionsfraktionen überrepräsentiert. Je nach Eigenschaft und Funktion der verschiedenen Untereinheiten führen diese unkomplexierten Proteine möglicherweise zu unterschiedlichem crRNA-Gehalt. Für Cas6 wurde in Typ I CRISPR/Cas-Systemen gezeigt, dass das 3'-Ende der crRNA nach der Prozessierung gebunden bleibt (WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011a; WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011b; SASHITAL *ET AL.*, 2011; STERNBERG *ET AL.*, 2012). Außerdem konnte bewiesen werden, dass die Ausbildung des Komplexes für die Prozessierung selbst nicht vonnöten ist und Cas6 alleine den endonukleolytischen Schnitt durchführen kann (BROUNS *ET*

AL., 2008; SASHITAL ET AL., 2011; LINTNER ET AL., 2011; NAM ET AL., 2011; HAURWITZ ET AL., 2010). Die vergleichsweise größere Menge reifer crRNA in der Cas6-Elution ist ein Hinweis darauf, dass dies bei *H. volcanii* ebenfalls der Fall sein könnte. So wäre es denkbar, dass durch das vermehrt vorhandene Cas6 mehr reife crRNA gebildet wird, welche durch die Bindung des 3'-Endes an das Fusionsprotein mitgereinigt wird. Im Falle der Cas7-Elution ist der verhältnismäßig größere Anteil an putativer Prä-crRNA ebenfalls ein Hinweis auf die Funktion, die für Cas7 in anderen Organismen gezeigt wurde. So vermitteln in anderen Typ I Systemen mehrere Cas7-Untereinheiten in einer helikalen Anordnung, welche als „Rückgrat“ des Cascade-Komplexes bezeichnet werden, die Bindung der crRNA, welche dadurch vor Abbau geschützt wird (WIEDENHEFT ET AL., 2011b; LINTNER ET AL., 2011). Sollte dies in *H. volcanii* auch der Fall sein, wäre es denkbar, dass das unkomplexierte Cas7-Fusionsprotein an die Prä-crRNA bindet und diese in der Elutionsfraktion anreichert. Der Umstand, dass in der Cas5-Elution scheinbar vergleichsweise wenig crRNA und Prä-crRNA vorhanden ist, könnte ein Hinweis darauf sein, dass das unkomplexierte Cas5-Fusionsprotein nicht an der Bindung der crRNA beteiligt ist. Dies deckt sich ebenfalls mit den Erkenntnissen zu diesem Protein in anderen Systemen. So wurde für Cas5 im *E. coli*-Cascade-Komplex gezeigt, dass es durch Kontakt zu Cas8 und Cas7 eher strukturelle und stabilisierende Funktionen erfüllt und nicht direkt an der Bindung der crRNA beteiligt ist (WIEDENHEFT ET AL., 2011b).

5.4. Untersuchung von Cas6 aus *H. volcanii*

In anderen CRISPR/Cas-Systemen wurde gezeigt, dass die Proteine der Cas6-Familie die Endonuklease darstellen, welche für die Prozessierung der crRNA verantwortlich ist (BROUNS ET AL., 2008; SASHITAL ET AL., 2011; LINTNER ET AL., 2011; HAURWITZ ET AL., 2010). Durch die Analysen verschiedener Knockout- und Komplementationsstämme konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch in *H. volcanii* Cas6 für die Aufrechterhaltung eines stabilen crRNA-Levels in der Zelle vonnöten ist. Um das Protein genauer zu charakterisieren und für die Aktivität essentielle Aminosäurereste innerhalb der Proteinsequenz zu identifizieren, wurden verschiedene Mutationen in das *cas6*-Gen eingeführt und deren Auswirkung auf die crRNA-Menge *in vivo* untersucht (Kapitel 4.3.1.). Dazu wurden jeweils die Basentriplets für diese Aminosäuren in Kodons verändert, welche für Alanin kodieren. Bei der Analyse ergab sich für vier der 21 untersuchten Mutanten eine drastische Veränderung des crRNA-Levels (Abbildung 4.16). So ist dieses im Falle der Mutation des Histidins an Position 41 (H41A) auf 37 % im Vergleich zum nicht mutierten Cas6 reduziert. Noch stärkere Effekte sind bei den Glycinen der Positionen 256 (G256A) und 258 (G258A) feststellbar, hier beträgt die crRNA-Menge lediglich 12 % bzw. 0 %. Im Gegensatz dazu ist bei der Mutation des Serins an Position 224 (S224A) eine deutliche Erhöhung des crRNA-Levels auf 164 % zu verzeichnen. Bei einigen weiteren Mutanten sind schwächer ausgeprägte Veränderungen zu beobachten. So zeigen die Mutationen H21A, H45A, Y51A und L172A schwache Reduktionen auf 70 bis 80 % und die Mutation S115A eine Erhöhung auf 129 %.

Die anhand der Mutationsanalyse von HvoCas6 ermittelten Ergebnisse sind gut vereinbar mit den Erkenntnissen, welche für andere Cas6-Proteine erlangt wurden. Cas6-Proteine weisen mindestens eine, meist zwei RNA-bindende Domänen auf, welche einem bestimmten Aufbau aus α -Helices und β -Faltblattstrukturen zeigen ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$). Dies wurde durch Vergleiche vorhergesagter Sekundärstrukturen von Mitgliedern der Cas6-Familie ermittelt und bestätigte sich durch die Lösung von Kristallstrukturen diverser Cas6-Proteine (MAKAROVA *ET AL.*, 2011c; SASHITAL *ET AL.*, 2011; SHAO&LI, 2013; REEKS *ET AL.*, 2013a; CARTE *ET AL.*, 2008). Die bioinformatische Analyse der Proteinsequenz von HvoCas6 zeigt ebenfalls diese charakteristische Abfolge von vorhergesagten Sekundärstrukturen (Anhang 8.8.). Ebenfalls anhand von Sekundärstruktur-Vorhersagen wurde festgestellt, dass ein Histidin innerhalb der ersten α -Helix der N-terminalen Domäne der Cas6-Proteine stark konserviert ist (MAKAROVA *ET AL.*, 2011c). Bei mehreren Cas6 konnten Histidine in diesem Bereich als Teil des aktiven Zentrums identifiziert werden (BROUNS *ET AL.*, 2008; SASHITAL *ET AL.*, 2011; HAURWITZ *ET AL.*, 2012; RICHTER *ET AL.*, 2012b; CARTE *ET AL.*, 2010). Das im Zuge der Mutationsanalyse untersuchte Histidin an Position 41 befindet sich ebenfalls innerhalb der ersten α -Helix. Es ist also wahrscheinlich, dass dieses in HvoCas6 Teil des aktiven Zentrums ist und katalytische Aktivität besitzt. Da jedoch in geringem Maße noch immer crRNA gebildet wird, ist es denkbar, dass weitere Reste an der Katalyse beteiligt sind. Auch bei anderen Cas6-Proteinen weist das aktive Zentrum weitere Reste auf, wie beispielsweise ein Tyrosin und ein Lysin bei Cas6 aus *P. furiosus* und *T. thermophilus* (CARTE *ET AL.*, 2010; SASHITAL *ET AL.*, 2011). Ein Kandidat wäre im Falle von HvoCas6 das Tyrosin an Position 51, bei dessen Mutation sich eine Reduktion der crRNA-Menge auf 71 % zeigte. Für Cas6 aus *M. maripaludis*, welches ein Subtyp I-B CRISPR/Cas-System besitzt, wurde ebenfalls ein Tyrosin in vergleichbarer Lage im N-terminalen Bereich identifiziert (Abbildung 4.14). Hier wurde außerdem ermittelt, dass zwei in unmittelbarer Nähe zueinander liegende Histidine katalytische Aktivität besitzen und nur die Mutation beider Reste zu vollständigem Verlust der Prozessierungsaktivität führt (RICHTER *ET AL.*, 2012b). Dies könnte möglicherweise auch in *H. volcanii* der Fall sein, wobei hier zwei Histidine (H21 und H45) entsprechende Kandidaten darstellen könnten, da für beide reduzierte crRNA-Mengen festgestellt wurden. Um dies näher zu untersuchen wäre es zu empfehlen, die Effekte von gleichzeitiger Mutation dieser Aminosäuren zu testen.

Die Analyse von Sequenzen und vorhergesagten Sekundärstrukturen ergab, dass die meisten Cas6-Proteine ein charakteristisches Glycin-reiches Motiv im C-terminalen Bereich aufweisen (MAKAROVA *ET AL.*, 2011c). Die bisherigen strukturellen Analysen von verschiedenen Cas6-Proteinen zeigten, dass dieses eine Schleife bildet, welche in direkter Nähe zum aktiven Zentrum positioniert ist (REEKS *ET AL.*, 2013b; WANG *ET AL.*, 2011; SHAO&LI, 2013). In der Kristallstruktur von Cas6 aus *S. solfataricus* konnte eine direkte Interaktion der Glycin-reichen Schleife mit der crRNA beobachtet werden (SHAO&LI, 2013). In Cas6 aus *P. furiosus* kann aus den Lagen der Bindestelle des 5'-Endes des Repeats und des aktiven Zentrums geschlossen werden, dass die Glycin-reiche Schleife für die korrekte Positionierung der crRNA verantwortlich sein könnte. Eine gleichzeitige Mutation aller vier Glycine zu Alanin führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust des Proteins *in vitro* (WANG *ET AL.*, 2011). Im

Vergleich dazu konnte für HvoCas6 ebenfalls ermittelt werden, dass Mutationen im Glycin-Motiv *in vivo* zu nahezu vollständigem Aktivitätsverlust führen, wobei hier anhand der getrennten Betrachtung der vier Glycine festgestellt werden kann, dass lediglich zwei der Mutanten diesen Effekt zeigen (Abbildung 4.16). Es ist also denkbar, dass auch in HvoCas6 diese Aminosäuren die für die Spaltung benötigte Positionierung der crRNA vermitteln. Da die als Surrogat verwendete Aminosäure Alanin einen Rest von größerer räumlicher Ausdehnung aufweist als die mutierten Glycine, könnte darin der Grund für die gestörte Bindung liegen. Die Überprüfung der Löslichkeit der mutierten Proteine ergab, dass diese hauptsächlich in der löslichen Fraktion des Zellextrakts zu finden waren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Proteine trotz Mutation weitgehend korrekt gefaltet sind (Abbildung 4.17). Es ist also denkbar, dass der Aktivitätsverlust nicht auf einer allgemeinen Fehlbildung der Proteine durch die Mutation, sondern auf einem lokalen Effekt beruht. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die untersuchten Aminosäuren nicht direkt an der Bindung oder Spaltung beteiligt sind, sondern die Mutationen lediglich die gesamte Integrität des Proteins stören und dadurch der Aktivitätsverlust verursacht wird.

Eine weitere strukturelle Gemeinsamkeit aller bisher untersuchten Cas6-Proteine ist eine konservierte Schleife, welche zwischen den zwei mittleren β -Faltblättern der C-terminalen RNA-bindenden Domäne lokalisiert ist (REEKS *ET AL.*, 2013b). In *T. thermophilus*, *P. aruginosa* und *S. solfataricus* konnte gezeigt werden, dass diese Schleife mit der haarnadel-ähnlichen Sekundärstruktur des Repeats interagiert und diese stabilisiert (SASHITAL *ET AL.*, 2011; HAURWITZ *ET AL.*, 2012; SHAO&LI, 2013). Durch Mutationsanalysen von Repeats konnte in *S. solfataricus* beobachtet werden, dass die Störung dieser Interaktion eine erhöhte Aktivität des Proteins nach sich zieht, wohingegen die Bindungsaffinität vom Protein zur crRNA verloren geht (SASHITAL *ET AL.*, 2011). Dies lässt den Schluss zu, dass diese Schleife dazu beiträgt, dass die crRNA auch nach der Prozessierung an Cas6 gebunden bleibt, wie für diverse Cas6-Proteine gezeigt wurde (WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011a; WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011b; SASHITAL *ET AL.*, 2011; STERNBERG *ET AL.*, 2012). Der Serin-Rest, bei dessen Mutation in HvoCas6 eine erhöhte crRNA-Menge zu beobachten ist (Abbildung 4.16), ist laut Sekundärstruktur-Vorhersage im Bereich dieser putativen Schleife lokalisiert (Anhang 8.8.). Es ist also denkbar, dass durch die Mutation die Bindung zur reifen crRNA gestört ist, was das Protein zu mehrfacher Umsetzung befähigt und daher zu einer Steigerung des crRNA-Levels führt. In diesem Fall könnte davon ausgegangen werden, dass auch in *H. volcanii* die Repeats eine Haarnadel-ähnliche Sekundärstruktur ausbilden, was laut bioinformatischen Analysen nicht ausgeschlossen werden kann (MAIER *ET AL.*, 2013).

5.5. Untersuchung der Prozessierung *in vitro*

Die bisherigen Ergebnisse der Untersuchung des CRISPR/Cas-Systems in *H. volcanii* und der Vergleich mit Erkenntnissen von anderen Organismen legen die Vermutung nahe, dass auch HvoCas6 für die Prozessierung der Prä-crRNA zu reifer crRNA verantwortlich ist, während

Cas5 und Cas7, welche *in vivo* ebenfalls für eine stabile crRNA-Population vonnöten sind, für die Bindung und den Schutz der reifen crRNA und die Integrität des Cascade-Komplexes vonnöten sind. Anhand dieser *in vivo*-Daten kann dies jedoch nicht zweifelsfrei bewiesen werden. So besteht die Möglichkeit, dass auch Cas5 oder Cas7 direkt an der Spaltung der Prä-crRNA beteiligt sind oder diese gar alleine bewerkstelligen. Um HvoCas6 als Endonuklease zu bestätigen wurde daher der Versuch unternommen, eine Prozessierungsreaktion *in vitro* zu erreichen. Für Cas6-Proteine aus anderen Organismen wurde gezeigt, dass gereinigte Proteine entsprechende Vorläufer-RNA *in vitro* spalten können. Dabei wurden sowohl längere Transkripte mit mehreren Repeat-Spacer-Einheiten als auch einzelne Repeats oder nur Teile davon eingesetzt (BROUNS *ET AL.*, 2008; CARTE *ET AL.*, 2008; HAURWITZ *ET AL.*, 2010; SASHITAL *ET AL.*, 2011; LINTNER *ET AL.*, 2011). Es ist zu bemerken, dass auch in Typ I CRISPR/Cas-Systemen, bei denen Cas6 Teil des Cascade-Komplexes ist, Cas6 alleine *in vitro* Vorläufer spalten kann. Dies beweist nicht nur, dass Cas6 die alleinige Endonuklease darstellt, sondern auch, dass die Bildung des Cascade-Komplexes für die Prozessierung der crRNA nicht vonnöten ist (BROUNS *ET AL.*, 2008; HAURWITZ *ET AL.*, 2010; SASHITAL *ET AL.*, 2011; LINTNER *ET AL.*, 2011). Da dies in *H. volcanii* nicht notwendigerweise der Fall sein muss, wurden nicht nur Cas6 alleine, sondern auch Ko-aufgereinigte Komplexe für die *in vitro*-Experimente eingesetzt. Desweiteren wurden als Vorläufer sowohl längere Transkripte mit mehreren Repeat-Spacer-Einheiten als auch Repeat-RNA eingesetzt. Leider konnte unter den getesteten Bedingungen keine spezifische Spaltung der Vorläufer beobachtet werden (Abbildung 4.22). Bei größeren Proteinmengen und langen Inkubationszeiten konnte lediglich eine unspezifische, komplette Degradierung des Vorläufers beobachtet werden, was wahrscheinlich auf Verunreinigungen der gereinigten Proteine durch RNasen zurückzuführen ist (Abbildung 4.22 B). Ein gewisser Hinweis auf eine spezifische Spaltung des Vorläufers konnte unter bestimmten Bedingungen (siehe Abbildung 4.22 C und D) erhalten werden. Dabei ergaben sich sowohl für Cas6 alleine als auch für die Cascade-Ko-Aufreinigungen schwache Banden bei ca. 180 Nukleotiden und ca. 120 Nukleotiden, was möglicherweise Zwischenprodukten von drei bzw. zwei Repeat-Spacer-Einheiten entsprechen könnte. Bei Verwendung von Repeats als Vorläufer unter denselben Bedingungen konnte jedoch keine spezifische Spaltung beobachtet werden.

Der Umstand, dass keine erfolgreiche *in vitro* Prozessierung erreicht werden konnte, könnte selbstverständlich darin liegen, dass viele mögliche Parameter hinsichtlich Inkubationstemperatur, Proteinmenge, Vorläufer und Pufferzusammensetzung- bzw. pH-Wert nicht getestet wurden. Allerdings könnte der Grund auch in den verwendeten Proteinpräparationen liegen. So wurden die Proteine für die Reinigung in *H. volcanii* selbst überproduziert. Wie bereits erwähnt wurde, bleibt Cas6 in Typ I CRISPR/Cas-Systemen nach der Prozessierung an das 3'-Ende der reifen crRNA gebunden (WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011a; WIEDENHEFT *ET AL.*, 2011b; SASHITAL *ET AL.*, 2011; STERNBERG *ET AL.*, 2012). Da für die Überproduktion verwendeten *H. volcanii*-Stämme intakte CRISPR-Loci aufweisen, ist es also denkbar, dass die gereinigten Proteine bereits reife crRNA gebunden haben und daher nicht befähigt sind, eine weitere Spaltung durchzuführen. In der Tat wurde bei der Untersuchung des RNA-

Gehalts der Ko-aufgereinigten Komplexe ermittelt, dass diese reife crRNA enthalten (Abbildung 4.12). Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen ist die Verwendung heterolog exprimierter Proteine. So wurden auch die *in vitro* Experimente in anderen Organismen mit rekombinanten Proteinen durchgeführt (CARTE *ET AL.*, 2008; HAURWITZ *ET AL.*, 2010; SHAO&LI, 2013). Bei dem Versuch, HvoCas6 aus *E. coli* zu reinigen konnten jedoch keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden (Abbildung 4.18). Eine aussichtsreichere Alternative wäre die Reinigung von HvoCas6 aus einem Stamm, bei welchem die CRISPR-Loci deletiert wurden. Es könnte allerdings auch der Versuch unternommen werden, die gereinigten Proteine durch Behandlung mit geeigneten Nukleasen von den gebundenen crRNAs zu befreien.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass kein endgültiger Beweis erbracht werden konnte, welches Protein in *H. volcanii* genau für die Spaltung der Repeats verantwortlich ist.

5.6. Untersuchung von Cas6 aus *C. lactoaceticus*

Phylogenetische Untersuchungen der Cas-Proteine und der zugehörigen CRISPR-Cluster bzw. Repeats legen die Vermutung nahe, dass sich diese im Laufe der Evolution parallel entwickelt haben (HAFT *ET AL.*, 2005; KUNIN *ET AL.*, 2007; MAKAROVA *ET AL.*, 2011b). Auch wenn die allgemeine Struktur von Cas6-Proteinen vergleichbar ist, unterscheiden sich die Details der Prozessierung der crRNA hinsichtlich Bindung und aktivem Zentrum (siehe Kapitel 5.4.). Es ist anzunehmen, dass dies in den verschiedenen Sequenzen und Strukturen der Repeats begründet ist. Um die Interaktion diverser Cas6 mit der jeweiligen crRNA genauer zu charakterisieren und zu vergleichen, wurden in Zusammenarbeit mit anderen Forschergruppen Cas6-Proteine und zugehörige Repeats untersucht, die jeweils einer der von Lange *et al.* identifizierten Repeat-Superklassen angehören (LANGE *ET AL.*, 2013). Ziel war dabei die Analyse der Protein-RNA-Interaktion mit Hilfe biochemischer und massenspektrometrischer Methoden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Cas6-Protein aus *C. lactoaceticus* untersucht. Dies wurde zu diesem Zweck rekombinant aus *E. coli* gereinigt und *in vitro* die Bindung zu einer Repeat-RNA untersucht.

Die Überproduktion des rekombinanten ClaCas6-Proteins in *E. coli* und die affinitätschromatographische Reinigung aus der löslichen Fraktion von Zellextrakten war erfolgreich. So lag im Eluat fast ausschließlich das gewünschte Protein vor, welches sowohl anhand einer Antikörper-Detektion eines Western Blots als auch anhand von massenspektrometrischer Analyse eindeutig als ClaCas6 identifiziert werden konnte (Abbildung 4.23 bzw. Anhang 8.5.). Um das Bindeverhalten des rekombinanten Proteins mit einer Repeat-RNA zu untersuchen, wurden EMSAs (*electrophoretic mobility shift assays*) durchgeführt. Dabei konnte eine Interaktion zwischen den Reaktionspartnern festgestellt werden (Abbildung 4.24). Diese zeigte sich als Temperatur-unabhängig und auch bei hoher Ionenstärke als stabil. Für die spätere massenspektrometrische Analyse zur Ermittlung der an der Bindung beteiligten

Aminosäurereste des Proteins und Repeat-Nukleotide ist eine Quervernetzung der Interaktionspartner vonnöten. Um dies zu erreichen, wurden die Reaktionsansätze mit UV-Licht bestrahlt, wodurch eine kovalente Verbindung zwischen Molekülen in räumlicher Nähe entsteht. Die UV-Quervernetzung war dabei, wenn auch relativ wenig effektiv, grundsätzlich erfolgreich. Zusätzlich zu den Bindungsstudien wurde unter vergleichbaren Bedingungen *in vitro* die Fähigkeit von ClaCas6 zur Prozessierung des Repeats getestet. Dabei konnte jedoch keine dahingehende Aktivität beobachtet werden (Abbildung 4.26). Anhand von biochemischen Methoden konnte also eine Interaktion von ClaCas6 mit der verwendeten Repeat-RNA, jedoch keine Prozessierungsaktivität nachgewiesen werden. Die massenspektrometrische Analyse zur Ermittlung der beteiligten Aminosäuren und Nukleotide, welche freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Urlaub des Max-Planck-Instituts in Göttingen durchgeführt wurden, war bis zum Ende dieser Arbeit nicht erfolgreich.

Das für die Untersuchung verwendete ClaCas6 findet sich im Genom von *C. lactoaceticus* in einem Operon mit diversen Csm-Proteinen und gehört damit wahrscheinlich zum CRISPR/Cas-Subtyp III-A. Die bioinformatische Vorhersage der Struktur mit Hilfe des Phyre-Servers ergab eine hohe Übereinstimmung mit der Struktur von Cas6 aus *P. furiosus* (Anhang 8.8.), folglich also einen putativen Aufbau aus zwei RNA-bindenden Domänen, wie es für Cas6-Proteine typisch ist (siehe Kapitel 5.4.). Die untersuchte Repeat-RNA entspricht der in den Loci 8 und 9 vorherrschenden Repeat-Sequenz und ist putativ zur Ausbildung einer Schleifen-Sekundärstruktur mit vier Basenpaarungen befähigt, wohingegen dies bei den Repeats der anderen Loci nicht der Fall ist (Abbildung 1.8). Strukturelle Untersuchungen verschiedener Cas6-Proteine ergaben, dass in manchen Fällen die Sekundärstruktur des Repeats für eine spezifische Interaktion wichtig ist, wohingegen beispielsweise für Cas6 aus *P. furiosus* gezeigt wurde, dass dieses putativ unstrukturierte Repeats bindet (HAURWITZ *ET AL.*, 2010; SASHITAL *ET AL.*, 2011; SHAO&LI, 2013; WANG *ET AL.*, 2011). Dabei gehören die bisher untersuchten Cas6, welche strukturierte Repeats binden, ausschließlich dem CRISPR/Cas-Typ I an, wohingegen Cas6 aus *P. furiosus* dem Subtyp III-B angehört. Ein Cas6 des Subtyps III-A wurde bis jetzt nicht näher charakterisiert. Bei der Interpretation der für ClaCas6 erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich Bindung und Prozessierung muss bedacht werden, dass im Genom von *C. lactoaceticus* sowohl Cas-Operons verschiedener Subtypen und diverse Cas6-Proteine also auch unterschiedliche Repeats vorkommen (Abbildung 1.8). Es ist also durchaus denkbar, dass nicht alle Cas6-Proteine die crRNAs aller Loci prozessieren können. Trotzdem wäre es möglich, dass auch ohne erfolgreiche Prozessierung eine Bindung zwischen Cas6 und dem Repeat stattfindet. So wurde beispielweise für Cas6 aus *P. furiosus* gezeigt, dass die Bindung des 5'-Endes des Repeats und die Spaltung im 3'-Bereich an räumlich entfernten Bereichen des Proteins stattfinden (WANG *ET AL.*, 2011). In *Pyrococcus horikoshii* hingegen wurde ermittelt, dass ein katalytisch inaktives Cas6 trotzdem an Repeats bindet (WANG *ET AL.*, 2012). Es ist also denkbar, dass ClaCas6 eine stabile Interaktion zum Repeat ausbilden kann, wohingegen die genaue Positionierung des 3'-Bereichs für die Prozessierung, oder die Spaltung selbst, nicht stattfinden kann. Möglicherweise ist dieses Protein lediglich zur Prozessierung unstrukturierter Repeats fähig oder die Positionierung der crRNA für die

Spaltung erfordert ein bestimmtes Nukleotid, welches im verwendeten Repeat nicht vorkommt. Desweiteren ist zu erwähnen, dass ClaCas6 als einziges der vier in *C. lactoaceticus* vorkommenden Cas6-Proteine kein Glycin-reiches Motiv aufweist. Dieses Motiv im C-terminalen Bereich ist in Cas6-Proteinen hoch konserviert und ist wahrscheinlich an der korrekten Positionierung der crRNA für die Spaltung beteiligt (siehe Kapitel 5.4.). In *P. furiosus* (WANG ET AL., 2011) und *H. volcanii* (diese Arbeit) resultierten Mutationen innerhalb dieses Motivs im Verlust der Prozessierungsaktivität. So könnte das Fehlen dieses Glycin-reichen Bereichs ein Hinweis darauf sein, dass ClaCas6 katalytisch inaktiv ist.

Um diese Möglichkeiten näher zu untersuchen wäre es interessant, die Interaktion und Prozessierungsaktivität mit den anderen in *C. lactoaceticus* vorkommenden Cas6-Proteinen und Repeats zu testen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das CRISPR/Cas-System stellt ein anpassungsfähiges, vererbbares Immunsystem zur Abwehr von Viren und anderen invasiven genetischen Elementen in Prokaryoten dar. Ein essentieller Teil der Funktion dieses Systems ist die Bildung kleiner RNA-Moleküle, sogenannter crRNAs, durch welche die Spezifität beim Abbau von fremden Nukleinsäuren vermittelt wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese crRNA-prozessierenden Vorgänge des CRISPR/Cas-Systems anhand des archaealen Modellorganismus *Haloferax volcanii* genauer charakterisiert. Dazu wurden zunächst durch Immunisierung von Mäusen polyklonale Antikörper gegen Proteine des CRISPR/Cas-Systems, Cas5, Cas6, und Cas7, hergestellt, um diese im Zuge von Experimenten nachweisen zu können. Desweiteren wurde *in vivo* und *in vitro* untersucht, welche Cas-Proteine an der Prozessierung und Stabilisierung der crRNA beteiligt sind und inwiefern diese in einem Komplex vorliegen. Durch Mutationsanalysen des Cas6-Proteins wurden diverse Aminosäurereste identifiziert, welche für die Funktion des Proteins essentiell sind. Zuletzt wurde das Cas6-Protein aus dem Bakterium *Caldicellulosiruptor lactoaceticus* hinsichtlich der Prozessierung und Bindung der crRNA *in vitro* analysiert. Hierbei ergab sich eine Interaktion des Proteins mit der Repeat-RNA, jedoch keine Spaltung.

Das CRISPR/Cas-System von *H. volcanii* gehört zum Subtyp I-B, welcher bisher nicht genauer untersucht wurde. Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse über das CRISPR/Cas-System in *H. volcanii* gut in das Bild einfügen, welches sich anhand der Untersuchungen anderer Typ I Systeme abzeichnet (REEKS ET AL., 2013b). Dies beinhaltet einen Cascade-Komplex, welcher einen allgemeinen Aufbau aufweist, der in allen bisher untersuchten Subtypen vergleichbar ist. Ein aus sechs Cas7-Untereinheiten aufgebautes „Rückgrat“ ist für die Bindung der crRNA verantwortlich und sorgt dadurch für deren Schutz vor Abbau. Cas8 befindet sich an einem Ende dieses Rückgrats und vermittelt durch Interaktion mit dem 5'-Ende der crRNA und der PAM-Sequenz die Erkennung von passenden Ziel-Sequenzen im Zuge der Interferenz. Oft ist diese Untereinheit nur schwach assoziiert. Cas5 erfüllt durch Interaktion mit Cas7 und Cas8 strukturelle Aufgaben innerhalb des Komplexes. Cas6 ist am anderen Ende des Cas7-Rückgrats gebunden und bindet das 3'-Ende der crRNA. Die Prozessierung der Prä-crRNA wird von Cas6 bewerkstelligt. Diese Reaktion findet unabhängig von der Komplex-Bildung statt und ist teilweise sogar Voraussetzung für diese. Obwohl sich die exakten Modalitäten der Bindung und Spaltung der crRNA unterscheiden, teilen alle Proteine der Cas6-Familie ähnliche strukturelle und funktionelle Aspekte wie beispielsweise den Aufbau aus RNA-bindenden Domänen. Für die Interferenzreaktion ist die Rekrutierung von Cas3 zur Degradierung der Ziel-DNA vonnöten, welche möglicherweise durch Konformationsänderung des Komplexes bei Bindung an das Ziel ausgelöst wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand von Ko-Aufreinigungen nachgewiesen werden, dass auch in *H. volcanii* ein Cascade-ähnlicher Komplex vorliegt, welcher die Cas-Proteine Cas5, Cas6, Cas7 und Cas8 aufweist, wobei letzteres eher schwach assoziiert ist. Die Stöchiometrie

des Komplexes konnte dabei nicht ermittelt werden. Anhand der Untersuchungen verschiedener Komplementations- und Knockoutstämme konnte bestätigt werden, dass Cas5, Cas6 und Cas7 für die Prozessierung und/oder Stabilisierung einer wildtyp-ähnlichen crRNA-Menge benötigt werden, wobei auch Cas6, Cas5 und Cas8 ein reduziertes crRNA-Level aufrechterhalten können. Diese Ergebnisse sind mit den putativen Funktionen der Proteine vereinbar, dass Cas6 die Bildung der reifen crRNA bewerkstelligt, während Cas7 diese, jedoch nur im Kontext des Komplexes, stabilisiert. Dadurch ist bei Abwesenheit von Cas5, welches scheinbar essentiell für die Integrität des Komplexes ist, keine crRNA mehr detektierbar. Die gleichzeitige Anwesenheit von Cas5 und Cas8 scheint dabei die Stabilisierung durch Cas7 in reduziertem Maße ersetzen zu können. Die Untersuchungen der aus Ko-aufgereinigten Komplexen isolierten RNA sprechen ebenfalls für die oben genannten Funktionen der Cas-Proteine. Eine erhöhte Menge von reifer crRNA in der Cas6-Ko-Aufreinigung, welche zusätzlich unkomplexiertes Cas6 enthält, spricht dafür, dass Cas6 die crRNA prozessiert und dann an diese gebunden bleibt. Die Cas7-Ko-Aufreinigung, welche unkomplexiertes Cas7 enthält, scheint hingegen vergleichsweise größere Mengen an Prä-crRNA zu enthalten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Cas7 die crRNA bindet, jedoch nicht selbst prozessieren kann. Die Cas5-Ko-Aufreinigung hingegen enthält scheinbar vergleichsweise geringe Mengen sowohl von crRNA also auch von Prä-crRNA, was dafür spricht, dass dieses Protein keine direkte RNA-Interaktion ausführt.

Auch wenn der direkte Beweis für HvoCas6 als alleinige crRNA-prozessierende Endonuklease durch *in vitro* Experimente nicht erbracht werden konnte, ergaben die bioinformatischen Untersuchung und die Mutationsanalyse viele sowohl strukturelle also auch funktionelle Gemeinsamkeiten mit anderen Typ I Cas6-Proteinen. So zeigte die Vorhersage der Sekundär- und Tertiärstruktur einen Aufbau aus zwei RNA-bindenden Domänen, während die Mutationsanalyse reduzierte crRNA-Level für Aminosäurereste ergab, welche vergleichbar mit bei anderen Cas6-Proteinen für die Bindung und Katalyse essentiellen Aminosäuren sind. Es ist also durchaus wahrscheinlich, dass auch HvoCas6 die crRNA-prozessierende Endonuklease darstellt. Desweiteren konnte im Zuge der Mutationsanalyse eine Aminosäure identifiziert werden, deren Austausch zu einer Aktivitätssteigerung des Proteins führt. Diese Aminosäure ist möglicherweise an der Bindung der crRNA beteiligt, weswegen Cas6 nach der Prozessierung nicht mehr an die crRNA gebunden bleibt und zu weiteren Reaktionen zur Verfügung steht. Dies stellt eine weitere Gemeinsamkeit mit anderen Cas6-Proteinen dar.

Zuletzt konnte bestätigt werden, dass auch in *H. volcanii* Cas8 für im Zuge des Abbaus der Ziel-DNA wichtig ist, da ohne dieses Cas-Protein auch in Anwesenheit von Cas3 keine Interferenz möglich ist. Andererseits konnte in Anwesenheit von Cas5, Cas6, Cas7 und Cas8 alleine keine Interferenz beobachtet werden. Dies zeigt, dass auch in *H. volcanii* diese Proteine keine degradierende Funktion haben und eine Rekrutierung von Cas3 vonnöten ist.

7. SUMMARY

The CRISPR/Cas-system represents an adaptive, heritable immune system found in prokaryotes to defend themselves against viruses and other invasive genetic elements. An essential part of this system is the biogenesis of small RNA molecules, so called crRNAs, which mediate the specificity during the degradation of foreign nucleic acids. This thesis deals with the characterization of these crRNA processing events in the archaeal model organism *Haloferax volcanii*. To be able to detect proteins of the CRISPR/Cas-system, polyclonal antibodies against the proteins Cas5, Cas6 and Cas7 were obtained by the immunization of mice. Moreover, it was investigated by *in vivo* and *in vitro* studies, which Cas-proteins are required for the processing and stabilization of the crRNA and whether these proteins interact with each other in a complex. By mutational analysis of the Cas6 protein several amino acid residues were identified which are essential for the function of the protein. At last, the processing- and crRNA-binding activity of Cas6 from the bacterium *Caldicellulosiruptor lactoaceticus* was analyzed *in vitro*. Here it was shown that this protein interacts with repeat-RNA, but does not cleave it.

The CRISPR/Cas-system of *H. volcanii* belongs to the subtype I-B, which has not been investigated until now. In summary, the findings of this work regarding the CRISPR/Cas-system of *H. volcanii* are in line with the known facts about other type I systems (REEKS *ET AL.*, 2013b). These involve a Cascade-complex, which shows a similar constitution in all subtypes analyzed up to now. A “backbone” of six Cas7 subunits binds the crRNA and protects it from degradation. Cas8 is found at one end of this backbone and mediates the identification of matching targets during interference stage by interaction with the 5'-end of the crRNA and the PAM motif. This subunit is often only weakly associated. Cas5 interacts with Cas7 and Cas8 and fulfills structural functions within the complex. Cas6 is bound at the other end of the Cas7-backbone and interacts with the 3'-end of the crRNA. The processing of the precursor crRNA is carried out by Cas6. This reaction is independent of the formation of the complex and is sometimes even required. Although the exact modalities of binding and cleavage of the crRNA differs within the members of the Cas6 protein family, they all share similar structural and functional aspects like the presence of RNA-binding domains, for example. For the degradation of target nucleic acids during the interference stage Cas3 is recruited, possibly by a conformational change of the complex upon target binding.

In this work it could be shown by co-purification experiments that a cascade-like complex exists also in *H. volcanii*, which consists of the Cas-proteins Cas5, Cas6, Cas7 and Cas8, with the latter being only weakly associated. The stoichiometry of the complex could not be unravelled. By the analysis of different complementation- and knockout-strains it could be proven that Cas5, Cas6 and Cas7 are essential for the processing and/or stabilization of wildtype amounts of crRNA, while Cas6, Cas5 and Cas8 are able to maintain a reduced crRNA-level. These results go well together with the putative function of the proteins, with Cas6 being responsible for the processing while Cas7 is in charge of stabilizing the mature

crRNA, but only in the context of the complex. Because of that there is no crRNA detectable in the absence of Cas5, which seems to be essential for the integrity of the complex. The presence of Cas5 and Cas8 together appears to be able to replace the stabilizing function of Cas7 in a reduced manner. The analyses of the RNA isolated from co-purified complexes are also in line with the above mentioned protein functions. An increased amount of mature crRNA in the Cas6 co-purification, which also contains unbound Cas6, is a hint that Cas6 is doing the processing and then stays bound to the mature crRNA. In contrast, the Cas7 co-purification including also unbound Cas7 seems to contain more precursor crRNA. This is possibly due to the binding of Cas7 to the precursor crRNA without the ability to cleave it. At last, the Cas5 co-purification, which apparently shows comparatively small amounts of crRNA and precursor crRNA, indicates that Cas5 does not directly interact with the crRNA.

Even though it could not be proven directly by *in vitro* experiments that HvoCas6 represents the crRNA-processing endonuclease, the bioinformatical and mutational analysis showed many structural and functional similarities with other type I Cas6-proteins. The secondary and tertiary structure prediction revealed an organization of RNA-binding domains, while the investigation of mutants yielded in the identification of residues with reduced crRNA-levels which are comparable with amino acids important for binding and cleavage in other Cas6 proteins. So it seems likely that HvoCas6 also acts like the crRNA-processing endonuclease. Moreover, the mutation of a distinct amino acid resulted in an increased activity. This residue is probably involved in the binding of the crRNA. After cleavage, the Cas6 mutant can not stay bound to the crRNA and is hence able for multiple turnovers, resulting in increased crRNA-levels. This demonstrates another similarity with other Cas6 proteins.

At last it could be proven, that in *H. volcanii* also Cas8 is essential for the interference stage, because without this protein no degradation of target nucleic acids takes place, even in the presence of Cas3. On the other side, the presence of Cas5, Cas6, Cas7 and Cas8 alone is not sufficient for interference. This shows that these proteins do not include target-degrading activity and the recruitment of Cas3 is needed.

8. ANHANG

8.1. Literaturverzeichnis

ALLERS, T., NGO, H., 2003: Genetic analysis of homologous recombination in Archaea: *Haloferax volcanii* as a model organism. *Biochemical Society Transactions*, Volume 31, part 3, [706-709].

ALLERS, T., NGO, H., MEVARECH, M., LLOYD, R.G., 2004: Development of additional selectable markers for the halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* based on the *leuB* and *trpA* genes. *Applied And Environmental Microbiology*, Volume 70, No. 2, [943-953].

ALLERS T., MEVARECH, M., 2005: Archaeal genetics – the third way. *Nature Publishing Group*, Volume 6, [58-73].

ALLERS, T., BARAK, S., LIDDELL, S., WARDELL, K., MEVARECH, M., 2010: Improved Strains and Plasmid Vectors for Conditional Overexpression of His-Tagged Proteins in *Haloferax volcanii*. *Applied Environmental Microbiology*, Volume 76, No. 6, [1759-1769].

AGARI, Y., SAKAMOTO, K., TAMAKOSHI, M., OSHIMA, T., KURAMITSU, S., SHINKAI, A., 2010: Transcription Profile of *Thermus thermophilus* CRISPR Systems after Phage Infection. *Journal of Molecular Biology*, Volume 395, Issue 2, [270-281].

ANDERSSON, A.F., BANFIELD, J.F., 2008: Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science*, Volume 320, [1047-1050].

BABU, M., BELOGLAZOVA, N., FLICK, R., GRAHAM, C., SKARINA, T., NOCEK, B., GAGRINOVA, A., POGOUTSE O., BROWN, G., BINKOWSKI, A., PHANSE, S., JOACHIMIAK, A., KOONIN, E.V., SAVCHENKO, A., EMILI, A., GREENBLATT, J., EDWARDS, A.M., YAKUNIN, A.F., 2011: A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Molecular Microbiology*, Volume 79, [484-502].

BARRANGOU, R., FREMAUX, C., DEVEAU, H. RICHARDS, M., BOYAVAL, P., MOINEAU, S., ROMERO, D.A., HORVATH, P., 2007: CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, Volume 315, [1709-1712].

BARRANGOU, R., HORVATH, P., 2013: CRISPR: New Horizons in Phage Resistance and Strain Identification. *Annual Reviews of Food Science and Technology*, Volume 3, [143-162].

BARRANGOU, R., 2013: CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, Volume 4, Issue 3, [267-278].

BELOGLAZOVA, N., BROWN, G., ZIMMERMAN, M.D., PROUDFOOT, M., MAKAROVA, K.S., KUDRITSKA, M., KOCHINYAN, S., WANG, S., CHRUSZCZ, M., MINOR, W., KOONIN, W.V., EDWARDS, A.M., SAVCHENKO, A., YAKUNIN, A.F., 2008: A Novel Family of Sequence-specific Endoribonucleases Associated with the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. *JBC*, Volume 283, No. 29, [20361-20371].

- BELOGLAZOVA, N., PETIT, P., FLICK, R., BROWN, G., SAVCHENKO, A., YAKUNIN, A.F., 2011: Structure of the Cas3 HD nuclease MJ0384, an effector enzyme of the CRISPR interference. *EMBO*, Volume 30, [4616-4627].
- BERTIN, A., DE FRUTOS, M., LETELLIER, L., 2011: Bacteriophage-host-interactions leading to genome internalization. *Current Opinion in Microbiology*, Volume 14, [492-496].
- BIKARD, D., HATOUM-ASLAN, A., MUCIDA, D., MARRAFFINI, L.A., 2012: CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during *in vivo* bacterial infection. *Cell Host & Microbe*, Volume 12, [177-186].
- BIKARD, D., JIANG, W., SAMAI, P., HOCHSCHILD, A., ZHANG, F., MARRAFFINI, L.A., 2013: Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Research*, [1-9].
- BITAN-BANIN, G., ORTENBERG, R., MEVARECH, M., 2003: Development of a Gene Knockout System for the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii* by Use of the *pyrE* Gene. *Journal of Bacteriology*, Volume 185, No. 3, [772-778].
- BOLOTIN, A., QUINQUIS, B., SOROKIN, A., EHRLICH, S.D., 2005: Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, Volume 151, [2551-2561].
- BREITBART, M., ROHWER, F., 2005: Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *TRENDS in Microbiology*, Volume 13, No. 6, [278-284].
- BRENDEL, J., STOLL, B., LANGE, S.L., SHARMA, K., LENZ, C., STACHLER, A.E., MAIER, L.K., RICHTER, H., NICKEL, L., SCHMITZ, R.A., RANDAU, L., ALLERS, T., URLAUB, H., BACKOFEN, R., MARCHFELDER, A., 2014: Cas6 is necessary but not sufficient for a stable crRNA population in *Haloferax volcanii*. (Submitted)
- BREUERT S., ALLERS, T., SPOHN, G., SOPPA, J., 2006: Regulated Polyploidy in Halophilic Archaea. *PloS ONE*, Issue 1, [1-10].
- BRÜSSOW, H., HENDRIX, R.W., 2002: Phage Genomics: Small Is Beautiful. *Cell*, Vol. 108, [13-16].
- BROUNS, S.J.J., JORE, M.J., LUNDGREN, M., WESTRA, E.E., SLIJKHUIS, R.J.H., SNIJDERS, A.P.L., DICKMAN, M.J., MAKAROVA, K.S., KOONIN, E.V., VAN DER OOST, J., 2008: Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science*, Volume 321, [960-964].
- CADY, K.C., BONDY-DENOMY, J., HEUSSLER, G.E., DAVIDSON, A.R., O'TOOLE, G.A., 2012: The CRISPR/Cas Adaptive Immune System of *Pseudomonas aeruginosa* Mediates Resistance to Naturally Occurring and Engineered Phages. *Journal of Bacteriology*, Volume 194, No. 21 [5728-5738].
- CARTE, J., PFISTER, N.T., COMPTON, M.M., TERNS, R.M., TERNS, M.P., 2010: Binding and cleavage of CRISPR RNA by Cas6. *RNA*, Volume 16, [2181-2188].
- CHEN, C.S., KOROBKOVA, E., CHEN, H., ZHU, J., JIAN, X., TAO, S.C., HE, C., ZHU, H., 2008: A proteome chip approach reveals new damage recognition activities in *Escherichia coli*. *Nature Methods*, Volume 5, [69-74].

- CLINE, S.W., LAM, W.L., CHARLEBOIS, R.L., SCHALKWYK, L.C., DOOLITTLE, W.F., 1989: Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, Volume 35, [148–152].
- DATSENKO, K.A., POUGACH, K., TIKHONOV, A., WANNER, B.L., SEVERINOV, K., SEMENOVA, E., 2012: Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nature Communications*, 3:945.
- DELTICHEVA, E., CHYLINSKI, K., SHARMA, C.M., GONZALES, K., CHAO, Y., PIRZADA, Z.A., ECKERT, M.R., VOGEL, J., CHARPENTIER, E., 2011: CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, Volume 471, [602–607].
- DENG, L., KENCHAPPA, C.S., PENG, X., SHE, Q., GARRET, R.A., 2011: Modulation of CRISPR locus transcription by the repeat-binding protein Cbp1 in *Sulfolobus*. *Nucleic Acid Research*, Volume 40, [2470–2480].
- DEVEAU, H., BARRANGOU, R., GARNEAU, J., LABONTÉ, J., FREMAUX, C., BOYAVAL, P., ROMERO, D.A., HORVATH, P., MOINEAU, S., 2008: Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology*, Volume 155, [1390–1400].
- DICARLO, J.E., NORVILLE, J.E., MALI, P., RIOS, X., AACH, J., CHURCH, G.M., 2013: Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, Volume 41, Issue 7, [4336–4343].
- DIEROLF, J., 2010: Charakterisierung des CRISPR/Cas-Systems in *Haloferax volcanii*. Diplomarbeit an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Ulm, Abteilung Molekulare Botanik.
- DILLON, S.C., CAMERON, A.D., HOKAMP, K., LUCCHINI, S., HINTON, J.C., DORMAN, C.J., 2010: Genome-wide analysis of the H-NS and Sfh regulatory networks in *Salmonella Typhimurium* identifies plasmid-encoded silencing mechanism. *Molecular Microbiology*, Volume 76, [1250–1274].
- DYALL-SMITH, 2008: The halo handbook – Protocols for haloarchaeal genetics. Version 7.0.
- ERDMANN, S., GARRET, R.A., 2012: Selective and hyperactive uptake of foreign DNA by adaptive immune systems of an archaeon via two distinct mechanisms. *Molecular Microbiology*, Volume 85, [1044–1056].
- FISCHER, S., BENZ, J., SPÄTH, B., MAIER, L-K., STRAUB, J., GRANZOW, M., RAABE, M., URLAUB, H., HOFFMANN, J., BRUTSCHY, B., ALLERS, T., SOPPA, J., MARCHFELDER, A., 2010: The Archaeal Lsm Protein Binds to Small RNAs. *Journal of biological chemistry*, Volume 258, No. 45, [34429–34438].
- FISCHER, S., MAIER, L-K., STOLL, B., BRENDEN, J., FISCHER, E., PFEIFFER, F., DYALL-SMITH, M., MARCHFELDER, A., 2012: An Archaeal Immune System Can Detect Multiple Protospacer Adjacent Motifs (PAMs) to Target Invader DNA. *Journal of biological chemistry*, Volume 287, No. 40, [33351–33365].
- FROST, L.S., LEPLAE, R., SUMMERS, A.O., TOUSSAINT, A., 2005: Mobile Genetic Elements: The Agents of Open Source Evolution. *Nature Reviews Microbiology*, Volume 3, [722–732].

- GARNEAU, J.E., DUPUIS, M-E, VILLION, M., ROMERO, D.A., BARRANGOU, R., BOYAVAL, P., FREMEAUX, C., HORVATH, P., MAGADAN, A.H., MOINEAU, S., 2010: The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, Volume 468, [67-71].
- GARVEY, P., HILL, C., FITZGERALD, G.F., 1996: The Lactococcal Plasmid pNP40 Encodes a Third Bacteriophage Resistance Mechanism, One Which Affects Phage Penetration. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 62, No. 2, [676-679].
- GESNER, E.M., SCHELLENBERG, M.J., GARSIDE, E.L., GEORGE, M.M., MACMILLAN, A.M., 2011: Recognition and maturation of effector RNAs in a CRISPR interference pathway. *Nature Structural and Molecular Biology*, Volume 18, [688-692].
- GRATZ, S.J., CUMMINGS, A.M., NGUYEN, J.N., HAMM, D.C., DONOHUE, L.K., HARRISON, M.M., WILDONGER, J., O'CONNOR-GILES, K.M., 2013: Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, [doi: 10.1534/genetics.113.152710].
- GROENEN, P.M., BUNSCHOTEN, A.E., VAN SOOLINGEN, D., VAN EMBDEN, J.D., 1993: Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by novel typing method. *Molecular Microbiology*, Volume 10, [1057-1065].
- GRISSA, I., VERGNAUD, G., POURCEL, C., 2007(a): The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinform.*, Volume 8, No. 172.
- GRISSA, I., VERGNAUD, G., POURCEL, C., 2007(b): CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acid Research*, Volume 35, [W52-W57].
- HAFT, D.H., SELENGUT, J., MONGODIN, E.F., NELSON, K.E., 2005: A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS Computational Biology*, Volume 1, Issue 6.
- HALE, C., KLEPPE, K., TERNS, R.M., TERNS, M.P., 2008: Prokaryotic silencing (psi)RNAs in *Pyrococcus furiosus*. *RNA*, Volume 14, [2572-2579].
- HALE, C.R., ZHAO, P., OLSON, S., DUFF, M.O., GRAVELEY, A.R., WELLS, L., TERNS, R.M., TERNS, M.P., 2009: RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. *Cell*, Volume 139, Issue 5, [945-956].
- HALE, C.R., MAJUMDAR, S., ELMORE, J., PFISTER, N., COMPTON, M., OLSON, S., RESCH, A.M., GLOVER, C.V.C. III, GRAVELEY, B.R., TERNS, R.M., TERNS, M.P., 2012: Essential features and rational design of CRISPR RNAs that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. *Molecular Cell*, Volume 45, [292-302].
- HAN, D., LEHMANN, K., KRAUSS, G., 2009: SSO1450 – A CAS1 protein from *Sulfolobus solfataricus* P2 with high affinity for RNA and DNA. *FEBS Letters*, Volume 583, [1928-1932].
- HARTMANN, A.L., NORRAIS, C., BADGER, J.H., DELMAS, S., HALDENBY, S., MADUPU, R., ROBINSON, J., KHOURI, H., REN, Q., LOWE, T.M., MAUPIN-FURLOW, J., POHLSCHRODER, M., DANIEL, C., PFEIFFER, F.,

- ALLERS, T., EISEN, J.A., 2010: The Complete Genome Sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a Model Archaeon. *PLoS ONE*, Volume 5, Issue 3, [1-20].
- HATFUL, G.F., 2008: Bacteriophage genomics. *Current Opinions in Microbiology*, Volume 11, [447-453].
- HATOUM-ASLAN, A., MANIV, I., MARRAFFINI, L.A., 2011: Mature clustered, regularly interspaced short palindromic repeats RNA (crRNA) length is measured by a ruler mechanism anchored at the precursor processing site. *PNAS USA*, Volume 108, [21218-21222].
- HATOUM-ASLAN, A., SAMAI, P., MANIV, I., JIANG, W., MARRAFFINI, L.A., 2013: A Ruler Protein in a Complex for Antiviral Defense Determines the Length of Small Interfering CRISPR RNAs. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 288, No. 39, [27888-27897].
- HAURWITZ, R.E., JINEK, M., WIEDENHEFT, B., ZHOU, K., DOUDNA, J.A., 2010: Sequence- und Structure-Specific RNA Processing by a CRISPR Endonuclease. *Science*, Volume 329, [1355-1358].
- HAURWITZ, R.E., STERNBERG, S.H., DOUDNA, J.A., 2012: Csy4 relies on an unusual catalytic dyad to position and cleave CRISPR RNA. *EMBO*, Volume 31, [2824-2832].
- HEIDELBERG, J.F., NELSON, W.C., SCHOENFELD, T., BHAYA, D., 2009: Germ warfare in a microbial mat community: CRISPRs provide insights into the co-evolution of host and viral genomes. *PLoS One*, Volume 4, Issue 1, [e4169].
- HOE, N., NAKASHIMA, K., GRIGSBY, D., PAN, X., DOU, S.J., NAIDICH, S., GARCIA, M., KAHN, E., BERGMIRE-SWEAT, D., MUSSER, J.M., 1999: Rapid Molecular Genetic Subtyping of Serotype M1 Group A *Streptococcus* Strains. *Emerging Infectious Diseases*, Volume 5, [254-263].
- HÖLZLE, A., FISCHER, S., HEYER, R., SCHÜTZ, S., ZACHARIAS, M., WALTHER, P., ALLERS, T., MARCHFELDER, A., 2008: Maturation of the 5S rRNA 5' end is catalyzed in vitro by the endonuclease tRNase Z in the archaeon *H. volcanii*. *RNA*, Volume 14, [928-937].
- HOLMES, M., PFEIFER, F., DYALL-SMITH, M., 1994: Improved shuttle vectors for *Haloferax volcanii* including a dual-resistance plasmid. *Gene*, Volume 146, [117-121].
- HORVATH, P., ROMERO, D.A., COÛTÉ-MONVOISIN, A-C., RICHARDS, M., DEVEAU, H., MOINEAU, S., BOYAVAL, P., FREMAUX, C., BARRANGOU, R., 2008: Diversity, Activity, and Evolution of CRISPR Loci in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, Volume 190, No. 4, [1401-1412].
- HORVATH, P., COÛTÉ-MONVOISIN, A., ROMERO, D.A., BOYAVAL, P., FREMAUX, C., BARRANGOU, R., 2009: Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 131, Issue 1, [62-70].
- HOWARD, J.A., DELMAS, S., IVANČIĆ-BAĆE, I., BOLT, E.L., 2011: Helicase dissociation and annealing of RNA-DNA hybrids by *Escherichia coli* Cas3 protein. *The Biochemical Journal*, Volume 439, Issue 1, [85-95].
- HWANG, W.Y., FU, Y., REYON, D., MAEDER, M.L., TSAI, S.Q., SANDER, J.S., PETERSON, R.T., YEH, J-R.J., JOUNG, J.K., 2013: Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, Volume 31, [227-229].

- ISHINO, Y., SHINAGAWA, H., MAKINO, K., AMEMURA, M., NAKATA, A., 1987: A Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, Volume 169, No. 12, [5429-5433].
- JANSEN, R., VAN EMBDEN, J.D.A., GAASTRA, W., SCHOOLS, L.M., 2002: Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, Volume 43, No. 6, [1565–1575].
- JIANG, W., BIKARD, D., COX, D., ZHANG, F., MARRAFFINI, L.A., 2013: RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, Volume 31, [233-239].
- JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J.A., CHARPENTIER, E., 2012: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, Volume 337, [816-821].
- JORE, M.M., LUNDGREN, M., VAN DUIJN, E., BULTEMA, J.B., WESTRA, E.R., WAGHMARE, S.P., WIEDENHEFT, B., PUL, Ü., WURM, R., WAGNER, R., BEIJER, M.R., BARNEDREGT, A., ZHOU, K., SNIJDERS, A.P.L., DICKMAN, M.J., DOUDNA, J.A., BOEKEMA, E.J., HECK, A.J.R., VAN DER OOST, J., BROUNS, S.J.J., 2011: Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nature Structural and Molecular Biology*, Volume 18, [529-536].
- KELLEY, L.A., STERNBERG, M.J., 2009: Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols*, Volume 4, No. 3, [363-371].
- KOENIG, T., MENZE, B., KIRCHNER, M., MONIGATTI, F., PARKER, K.C., PATTERSON, T., STEEN, J.J., HAMPRECHT, F.A., STEEN, H., 2008: Robust Prediction of the MASCOT Score for an Improved Quality Assessment in Mass Spectrometric Proteomics. *Journal of proteome research*, Volume 7, No. 9, [3708-3717].
- KOONIN, E.V., WOLF, Y.I., 2009: Is evolution Darwinian or/and Lamarckian? *Biology Direct*, Volume 4, No. 42.
- KUNIN, V., SOREK, R., HUGENTHOLTZ, P., 2007: Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biology*, Volume 8, Issue 4, Article R61.
- LABRIE, S.J., SAMSON, J.E., MOINEAU, S., 2010: Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, Volume 8, [317-327].
- LANGE, S.J., ALKHNABASHI, O.S., ROSE, D., WILL, S., BACKOFEN, R., 2013: CRISPRmap: an automated classification of repeat conservation in prokaryotic adaptive immune systems. *Nucleic Acids Research*, Volume 41, No. 17, [8034-8044].
- LARGE, A., STAMME, C., LANGE, C., DUAN, Z., ALLERS, T., SOPPA, J., LUND, P.A., 2007: Characterization of a tightly controlled promoter of the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* and its use in the analysis of the essential *cct1* gene. *Molecular Microbiology*, Volume 66, No. 5, [1092-1106].
- LILLESTØL, R.K., REDDER, P., GARRETT, R.A., BRÜGGER, K., 2006: A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea*, Volume 2, [59-72].

- LILLESTØL, R.K., SHAH, S.A., BRUGGER, K., REDDER, P., PHAN, H., CHRISTIANSEN, K., GARRET, R.A., 2009: CRISPR families of the crenarchaeal genus *Sulfolobus*: bidirectional transcription and dynamic properties. *Molecular Microbiology*, Volume 72, [259-272].
- LINTNER, N.G., KEROU, M., BRUMFIELD, S.K., GRAHAM, S., LIU, H., NAISMITH, J.H., SDANO, M., PENG, N., SHE, Q., COPIÉ, V., YOUNG, M.J., WHITE, M.F., LAWRENCE, C.M., 2011: Structural and Functional Characterization of an Archaeal Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)-associated Complex for Antiviral Defense (CASCADE). *Journal of Biological Chemistry*, Volume 286, [21643-21656].
- LIU, F., BARRANGOU, R., GERNER-SCHMIDT, P., RIBOT, E.M., KNABEL, S.J., DUDLEY, E.G., Novel virulence gene and clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) multilocus sequence scheme for subtyping of the major serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Applied Environmental Microbiology*, Volume 77, Issue 6, [1946-1956].
- LOPEZ-SANCHEZ, M.J., SAUVAGE, E., DA CUNHA, V., CLERMONT, D., RATSIMA HARINIAINA, E., GONZALEZ-ZORN, B., POYART, C., ROSINSKI-CHUPIN, I., GLASER, P., 2012: The highly dynamic CRISPR1 system of *Streptococcus agalactiae* controls the diversity of its mobilome. *Molecular Microbiology*, Volume 85, [1057-1071].
- MAKAROVA, K.S., GRISHIN, N.V., SHABALINA, S.A., WOLF, Y.I., KOONIN, E.V., 2006: A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, Volume 1, Issue 7.
- MAKAROVA, K.S., WOLF, Y.I., SNIR, S., KOONIN, E.V., 2011(a): Defense Islands in Bacterial and Archaeal Genomes and Prediction of Novel Defense Systems. *Journal of Bacteriology*, Volume 193, No. 21, [6039-6056].
- MAKAROVA, K.S., HAFT, D.H., BARRANGOU, R., BROUNS, S.J.J., CHARPENTIER, E., HORVATH, P., MOINEAU, S., MOJICA, F.J.M., WOLF, Y.I., YAKUNIN, A.F., VAN DER OOST, J., KOONIN, E.V., 2011(b): Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, Volume 9, [467-477].
- MAKAROVA, K.S., ARAVIND, L., WOLF, Y.I., KOONIN, E.V., 2011(c): Unification of Cas protein families and simple a scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biology Direct*, Volume 6, No. 38.
- MAKAROVA, K.S., WOLF, Y.I., KOONIN, E.V., 2013: Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Research*, Volume 41, No. 8, [4360-4377].
- MALI, P., YANG, L., ESVELT, E.M., AACH, J., GUELL, M., DICARLO, J.E., NORVILLE, J.E., CHURCH, G.M., 2013: RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, Volume 339, [823-826].
- MARCHLER-BAUER, A., LU, S., ANDERSON, J.B., CHITSAZ, F., DERBYSHIRE, M.K., DEWEESE-SCOTT, C., FONG, J.H., GEER, L.Y., GEER, R.C., GONZALES, N.R., GWADZ, M., HURWITZ, D.I., JACKSON, J.D., KE, Z., LANCZYCKI, C.J., LU, F., MARCHLER, G.H., MULLAKANDOV, M., OMELCHENKO, M.V., ROBERTSON, C.L., SONG, J.S., THANKI, N., YAMASHITA, R.A., ZHANG, D., ZHANG, N., ZHENG, C., BRYANT, S.H., 2011: CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Research*, Volume 39, Database issue, [D355-D229].

MARRAFFINI, L.A., SONTHEIMER, E.J., 2008: CRISPR Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by Targeting DNA. *Science*, Volume 322, [1843-1845].

MARRAFFINI, L.A., SONTHEIMER, E.J., 2010(a): CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, Volume 11, [181-190].

MARRAFFINI, L.A., SONTHEIMER, E.J., 2010(b): Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, Volume 463, [568-571].

MASEPOHL, B., GORLITZ, K., BOHME, H., 1996: Long tandemly repeated repetitive (LTRR) sequences in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 1307, Issue 1, [26-30].

MC GRATH, S., FITZGERALD, G.F., VAN SINDEREN, D., 2002: Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Molecular Microbiology*, Volume 43, No. 2, [509-520].

MEDINA-APARICIO, L., REBOLLAR-FLORES, J.E., GALLEGO-HERNÁNDEZ, A.L., VÁZQUEZ, A., OLVERA, L., GUTIÉRREZ-RÍOS, R.M., CALVA, E., HERNÁNDEZ-LUCAS, I., 2011: The CRISPR/Cas Immune System Is an Operon Regulated by LeuO, H-NS, and Leucine-Responsive Regulatory Protein in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Journal of Bacteriology*, Volume 193, No. 10, [2396-2407].

MAIER, L.-K., LANGE, S.J., STOLL, B., HAAS, K.A., FISCHER, S., FISCHER, E., DUCHARD-FERNER, E., WÖHNERT, J., BACKOFEN, R., MARCHFELDER, A., 2013: Essential requirements for the detection and degradation of invaders by the *Haloferax volcanii* CRISPR/Cas system I-B. *RNA Biology*, Volume 10, Issue 5, [865-874].

MEVARECH, M., WERCZBERGER, R., 1985: Genetic Transfer in *Halobacterium volcanii*. *Journal of Bacteriology*, Volume 162, No. 1, [17-20].

MOJICA, F.J.M., FERRER, C., JUEZ, G., RODRIGUEZ-VALERA, F., 1995: Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Molecular Microbiology*, Volume 17, [85-93].

MOJICA, F.J.M., DÍEZ-VILLASEÑOR, C., GARCÍA-MARTÍNEZ, J., SORIA, E., 2005: Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution*, Volume 60, [174-182].

MOJICA, F.J.M., DÍEZ-VILLASEÑOR, C., GARCÍA-MARTÍNEZ, J., ALMENDROS, C., 2009: Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, Volume 155, [733-740].

MOKROUSOV, I., LIMESCHENKO, E., VYAZOVAYA, A., NARVSKAYA, O., 2007: *Corynebacterium diphtheriae* spoligotyping based on combined use of two CRISPR loci. *Biotechnology Journal*, Volume 2, [901-906].

MULLAKHANBHAI, M.F., LARSON, H., 1975: *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea Halobacterium with a Moderate Salt Requirement. *Archives of Microbiology*, Volume 104, [207-214].

- NAM, K.H., DING, F., HAITJEMA, C., HUANG, Q., DELISA, M.P., KE, A., 2012 (a): Double-stranded endonuclease activity in *B. halodurans* Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-associated Cas2 protein. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 287, No.43, [35943-35952].
- NAM, K.H., HAITJEMA, C., LIU, X., DING, F., WANG, H., DELISA, M.P., KE, A., 2012 (b): Cas5d protein processes pre-crRNA and assembles into a cascade-like interference complex in subtype IC/Dvulg CRISPR-Cas system. *Structure*, Volume 20, [1574-1584].
- NAVARRE, W.W., PORWOLLIK, S., WANG, Y., MCCLELLAND, M., ROSEN, H., LIBBY, S.J., FANG, F.C., 2006: Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science*, Volume 313, [236-238].
- NORAIS, C., HAWKINS, M., HARTMANN, A.L., EISEN, J.A., MYLLYKALLIO, H., ALLERS, T., 2007: Genetic and Physical Mapping of DNA Replication Origins in *Haloferax volcanii*. *PLoS Genetics*, Volume 3, Issue 5, e77, [0729-0743].
- NOZAWA, T., FURUKAWA, N., AIKAWA, C., WATANABE, T., HAOBAM, B., KUROKAWA, K., MARUYAMA, F., NAKAGAWA, I., 2011: CRISPR inhibition of prophage acquisition in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One*, Volume 6, Issue 5, [e19543].
- OREN, A., 1999: Bioenergetic Aspects of Halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Volume 63, No. 2, [334-348].
- OREN, A., VENTOSA, A., 1999: Benjamin Elazari Volcani (1915 – 1999): Sixty-three years of studies of the microbiology of the Dead Sea. *International Microbiology*, Volume 2, [195-198].
- OREN, A., 2006: The order Halobacteriales. *The Prokaryotes, Third Edition*, Chapter 8, [113-164], Springer New York.
- PALMER, K.L., GILMORE, M.S., 2010: Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *MBio*, Volume 1, No. 4, [e00277-e00310].
- PEREZ-RODRIGUEZ, R., HAITJEMA, C., HUANG, Q., NAM, K.H., BERNARDIS, S., KE, A., DELISA, M.P., 2011: Envelope stress is a trigger of CRISPR RNA-mediated DNA silencing in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, Volume 79, [584-599].
- PFEIFFER, F., BROICHER, A., GILLICH, T., KLEE, K., MEJIA, J., RAMPP, M., OESTERHELD, D., 2008: Genome information management and integrated data analysis with HaloLex. *Archives of Microbiology*, Volume 190, No. 3, [281-299].
- PLAGENS, A., TJADEN, B., HAGEMANN, A., RANDAU, L., HENSEL, R., 2012: Characterization of the CRISPR/Cas subtype I-A system of the hyperthermophilic crenarchaeon *Thermoproteus tenax*. *Journal of Bacteriology*, Volume 194, [2491-2500].
- POURCEL, C., SALVIGNOL, G., VERGNAUD, G., 2005: CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, Volume 151, [653-663].

- PUL, Ü., WURM, R., ARSLAN, Z., GEIßEN, R., HOFMANN, N., WAGNER, R., 2010: Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Molecular Microbiology*, Volume 75, No. 6, [1495-1512].
- QI, L.S., LARSON, M.H., GILBERT, L.A., DOUDNA, J.A., WEISSMAN, J.S., ARKIN, A.P., LIM, W.A., 2013: Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*, Volume 152, [1173-1183].
- REEKS, J., SOKOLOWSKI, R.D., GRAHAM, S., LIU, H., NAISMITH, J.H., WHITE, M.F., 2013(a): Structure of a dimeric crenarchaeal Cas6 enzyme with an atypical active site for CRISPR RNA processing. *Biochemical Journal*, Volume 452, [223-230].
- REEKS, J., NAISMITH, J.H., WHITE, M.F., 2013(b): CRISPR interference: a structural perspective. *Biochemical Journal*, Volume 453, [155-166].
- RICHTER, C., GRISTWOOD, T., CLULOW, J.S., FINERAN, P.C., 2012 (a): *In vivo* protein interactions and complex formation in the *Pectobacterium atrosepticum* subtype I-F CRISPR/Cas system. *PLoS one*, Volume 7, Issue 12.
- RICHTER, H., ZOEPHEL, J., SCHERMULY, J., MATICZKA, D., BACKOFEN, R., RANDAU, L., 2012 (b): Characterization of CRISPR RNA processing in *Clostridium thermocellum* and *Methanococcus maripaludis*. *Nucleic Acids Research*, Volume 40, No. 19, [9887-9896].
- RICHTER, C., CHANG, J.T., FINERAN, P.C., 2012 (c): Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR Associated (Cas) Systems. *Viruses*, Volume 4, [2291-2311].
- ROUILLON, C., ZHOU, M., ZHANG, J., POLITIS, A., BEILSTEN-EDMANDS, V., CANNONE, G., GRAHAM, S., ROBINSON, C.V., SPAGNOLO, L., WHITE, M.F., 2013: Structure of the CRISPR Interference Complex CSM Reveals Key Similarities with Cascade. *Molecular Cell*, Volume 52, [124-134].
- ROUSSEAU, C., GONNET, M., LE ROMANCER, M., NICOLAS, J., 2009: CRISPI: a CRISPR interactive database. *Bioinformatics*, Volume 25 [3317-3318].
- SAMBROOK, RUSSELL, 2001: Molecular Cloning - A LABORATORY MANUAL. Third Edition, Cold Spring Harbor, New York.
- SAPRANAUSKAS, R., GASIUNAS, G., FREMAUX, C., BARRANGOU, R., HORVATH, P., SIKSNYS, V., 2011: The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, Volume 39, No. 21, [9275-9282].
- SASHITAL, D.G., WIEDENHEFT, B., DOUDNA, J.A., 2012: Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system. *Molecular Cell*, Volume 45, Issue 5, [606-615].
- SASHITAL, D.G., JINEK, M., DOUDNA, J.A., 2011: An RNA-induced conformational change required for CRISPR RNA cleavage by the endoribonuclease Cse3. *Nature Structural and Molecular Biology*, Volume 18, No. 6, [680-688].
- SCHNEIDER, C.A., RASBAND, W.S., ELICEIRI, K.W., 2012: NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, Volume 9, [671-675].

- SEMENOVA, E., JORE, M.M., DATSENKO, K.A., SEMENOVA, A., WESTRA, E.R., WANNER, B., VAN DER OOST, J., BROUNS, S.J., SEVERINOV, K., 2011: Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *PNAS USA*, Volume 108, [10098-10103].
- SHAH, S.A., GARRET, R.A., 2011: CRISPR/Cas and Cmr modules, mobility and evolution of adaptive immune systems. *Research in Microbiology*, Volume 162, Issue 1, [27-38].
- SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., MANN, M., 1996: Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, Volume 68, No. 5, [850-858].
- SIKUNAS, T., GASIUNAS, G., FREMAUX, C., BARRANGOU, R., HORVATH, P., SIKSNYS, V., 2011: Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO*, Volume 30, [1335-1342].
- SPILMAN, M., COCOZAKI, A., HALE, C., SHAO, Y., RAMIA, N., TERNS, R., TERNS, M., LI, H., STAGG, S., 2013: Structure of an RNA Silencing Complex of the CRISPR-Cas Immune System. *Molecular Cell*, Volume 52, [146-152].
- STAALS, R.H.J., AGARI, Y., MAKI-YONEKURA, S., ZHU, Y., TAYLOR, D.W., VAN DUIJN, E., BARENDREGT, A., VLOT, M., KOEHORST, J.J., SAKAMOTO, K., MASUDA, A., DOHMAE, N., SCHAAP, P.J., DOUDNA, J.A., HECK, A.J.R., YONEKURA, K., VAN DER OOST, J., SHINKAI, A., 2013: Structure and Activity of the RNA-Targeting III-B CRISPR-Cas Complex of *Thermus Thermophilus*. *Molecular Cell*, Volume 52, [135-145].
- STERNBERG, S.H., HAURWITZ, R.E., DOUDNA, J.A., 2012: Mechanism of substate selection by a highly specific endoribonuclease. *RNA*, Volume 18, [661-672].
- STOLL, B., 2013: Analyse des prokaryotischen Immunsystems CRISPR/Cas Typ I-B im archaealen Modellorganismus *Haloferax volcanii*. Doktorarbeit an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Ulm, Abteilung Molekulare Botanik.
- STROUD, A., LIDDELL, S., ALLERS, T., 2012: Genetic and biochemical identification of a novel single-stranded DNA-binding complex in *Haloferax volcanii*. *Frontiers in microbiology*, Volume 3, Article 224, doi: 10.3389/fmicb.2012.00244.
- SWARTS, D.C., MOSTERD, C., VAN PASSEL, M.W.J., BROUNS, S.J.J., 2012: CRISPR Interference Directs Strand Specific Spacer Acquisition. *PLoS one*, Volume 7, Issue 4.
- TANG, J., AKERBOOM, J., VAZIRI, A., LOOGER, L.L., SHANK, C.V., 2010: Near-isotropic 3D nanoscopy with photon limited chromophores. *PNAS USA*, Volume 107, [10068-10073].
- THOMAS, C.M., NIELSEN, K.M., 2005: Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, Volume 3, [711-721].
- TYSON, G.W., BANFIELD, J.F., 2008: Rapidly evolving CRISPRs implicated in acquired resistance of microorganisms to viruses. *Environmental Microbiology*, Volume 10, No. 1, [200-207].
- VAN EMBDEN, J.D.A., VAN GORKOM, T., KREMER, K., JANSEN, R., VAN DER ZEIJST, B.A.M., SCHOOLS, L.M., 2000: Genetic Variation and Evolutionary Origin of the Direct Repeat Locus of

Mycobacterium tuberculosis Complex Bacteria. *Journal of Bacteriology*, Volume 182, No. 9, [2393-2401].

WANG, R., PREAMPLUME, G., TERNS, M.P., TERNS, R.M., LI, H., 2011: Interaction of the Cas6 Riboendonuclease with CRISPR RNAs: Recognition and Cleavage. *Structure*, Volume 19, [257-264].

WANG, H., YANG, H., SHIVALILA, C.S., DAWLATY, M.M., CHENG, A.W., ZHANG, F., JAENISCH, R., 2013: One-step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell*, Volume 153, Issue 4, [910-918].

WANG, R., ZHENG, H., PREAMPLUME, G., SHAO, Y., LI, H., 2012: The impact of CRISPR repeat sequence on structures of a Cas6 protein-RNA complex. *Protein Science*, Volume 21, [405-417].

WESTRA, E.R., PUL, Ü., HEIDRICH, N., JORE, M.M., LUNDGREN, M. STRATMANN, T., WURM, R., RAINE, A., MESCHER, M., VAN HEEREVELD, L., MASTOP, M., WAGNER, E.G., SCHNETZ, K., VAN DER OOST, J., WAGNER, R., BROUNS, S.J., 2010: H-NS mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Molecular Microbiology*, Volume 77, [1380-1393].

WESTRA, E.R., VAN ERP, P.B.G., KÜNNE, T., WONG, S.P., STAALS, R.H.J., SEEGER, C.L.C., BOLLEN, S., JORE, M.M., SEMENOVA, E., SEVERINOV, K., DE VOS, W.M., DAME, R.T., DE VRIES, R., BROUNS, S.J.J., VAN DER OOST, J., 2012(a): CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by Cascade and Cas3. *Molecular Cell*, Volume 46, Issue 5, [595-605].

WESTRA, E.R., SWARTS, D.C., STAALS, R.H.J., JORE, M.M., BROUNS, S.J.J., VAN DER OOST, J., 2012(b): The CRISPRs, They Are A-Changin': How Prokaryotes Generate Adaptive Immunity. *Annual Review of Genetics*, Volume 46, [311-339].

WIEDENHEFT, B., ZHOU, K., JINEK, M., COYLE, S.M., MA, W., DOUDNA, J.A., 2009: Structural Basis for DNase Activity of a Conserved Protein Implicated in CRISPR-Mediated Genome Defense. *Cell Structure*, Volume 17, [904-912].

WIEDENHEFT, B., VAN DUIN, E., BULTEMA, J.B., WAGHMARE, S.P., ZHOU, K., BARENDREGT, A., WESTPHAL, W., HECK, A.J.R., BOEKEMA, E.J., DICKMAN, M.J., DOUDNA, J.A., 2011 (a): RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. *PNAS*, Volume 108, No. 25, [10092-10097].

WIEDENHEFT, B., LANDER, G.C., ZHOU, K., JORE, M.M., BROUNS, S.J., VAN DER OOST, J., DOUDNA, J.A., NOGALES, E., 2011 (b): Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system. *Nature*, Volume 477, [486-489].

WIEDENHEFT, B., STERNBERG, S.H., DOUDNA, J.A., 2012: RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, Volume 482, [331-338].

WITTMANN, M., 2013: Herstellung eines Reportersystems zur Untersuchung der crRNA Prozessierung in *Haloferax volcanii*. Bachelorarbeit an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Ulm, Abteilung Molekulare Botanik.

YOSEF, I., GOREN, M.G., QIMRON, U., 2012: Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, Volume 40, No. 12, [5569-5576].

YOUNG, J.C., DILL, B.D., PAN, C., HETTICH, R.L., BANFIELD, J.F., SHAH, M., FREMAUX, C., HORVATH, P., BARRANGOU, R., VERBERKMOES, N.C., 2012: Phage-induced expression of CRISPR-associated proteins revealed by shotgun proteomics in *Streptococcus thermophilus*. *PLoS One*, Volume 7, Issue 5, [e38077].

ZHANG, J., ROUILLON, C., KEROU, M., REEKS, J., BRUGGER, K., GRAHAM, S., REIMANN, J., CANNONE, G., LIU, H., ALBERS, S.-V., NAISMITH, J.H., SPAGNOLO, L., WHITE, M.F., 2012: Structure and mechanism of the CMR complex for CRISPR-mediated antiviral immunity. *Molecular Cell*, Volume 3, [303-313].

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Komponenten des CRISPR/Cas-Systems.....	13
Abbildung 1.2: CRISPR/Cas Subtypen und deren Verwandtschaft nach Makarova <i>et al.</i>	15
Abbildung 1.3: Die drei Phasen der CRISPR/Cas-Abwehr	16
Abbildung 1.4: Hypothetischer Mechanismus der Adaptation.....	19
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von Cascade-Komplexen in CRISPR/Cas Typ I.....	21
Abbildung 1.6: Modell des Interferenz-Mechanismus bei CRISPR/Cas Typ I.....	23
Abbildung 1.7: Das CRISPR/Cas-System von <i>Haloferax volcanii</i>	29
Abbildung 1.8: Das CRISPR/Cas- System von <i>Caldicellulosiruptor lactoaceticus</i>	32
Abbildung 3.1: Aufbau eines Kapillarblots	71
Abbildung 4.1: Gewinnung von Antigen-Material von Cas5, Cas6 und Cas7 für die Immunisierung von Mäusen.....	85
Abbildung 4.2: Test der antikörperhaltigen Seren	87
Abbildung 4.3: Analyse der crRNA-Population der Komplementationsstämme	90
Abbildung 4.4: Herstellung der Knockout-Stämme	92
Abbildung 4.5: Southern Blot-Analyse der Knockout-Stämme.....	93
Abbildung 4.6: Analyse der crRNA-Population der Knockout-Stämme	95
Abbildung 4.7: Prinzip des Plasmid-basierten Interferenztests.....	96
Abbildung 4.8: Analyse des cas5-Knockout-Stamms	98
Abbildung 4.9: Reinigung der Komponenten des Cascade-Komplexes	101
Abbildung 4.10: Antikörper-Detektionen der Elutionsfraktionen der Cas-Fusionsprotein-Reinigungen.....	102

Abbildung 4.11: Massenspektrometrische Analyse einzelner Proteinbanden	104
Abbildung 4.12: Untersuchung der aus Komplexen isolierten RNA	105
Abbildung 4.13: Gelfiltration von Ko-Aufreinigungs-Eluaten.....	107
Abbildung 4.14: Bioinformatische Analyse von Cas6 aus <i>H. volcanii</i>	109
Abbildung 4.15: Schematische Darstellung der Konstrukte pTA927-cas6mut-FlagN zur Mutationsanalyse von HvoCas6	111
Abbildung 4.16: Analyse des crRNA-Levels in den HvoCas6-Mutanten	112
Abbildung 4.17: Überprüfung der Löslichkeit der HvoCas6-Mutanten H41A, G256A und G258A	114
Abbildung 4.18: Reinigung von rekombinantem HvoCas6-Protein aus <i>E. coli</i>	116
Abbildung 4.19: Reinigung von rekombinantem HvoCas6-Protein aus <i>H. volcanii</i>	117
Abbildung 4.20: Gelfiltration eines Cas6-Eluats	118
Abbildung 4.21: Gelfiltration von Cas6-Eluaten	119
Abbildung 4.22: Untersuchung der Prozessierung von radioaktiv markierter RNA <i>in vitro</i> ...	121
Abbildung 4.23: Reinigung von rekombinantem ClaCas6	123
Abbildung 4.24: EMSA-Analysen von ClaCas6 mit markierter Repeat-RNA	125
Abbildung 4.25: Quervernetzung von ClaCas6-Repeat-Komplexen	126
Abbildung 4.26: Untersuchung der Prozessierung von ClaCas6 <i>in vitro</i>	126

8.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Stämme von <i>E. coli</i> und <i>H. volcanii</i>	34
Tabelle 2.2: Verwendete Vektoren.	36
Tabelle 3.1: Klonierungsdetails zur Herstellung der Komplementationskonstrukte pTA927-casX.....	60
Tabelle 3.2: Klonierungsschema für die Herstellung der integrativen Plasmide	61
Tabelle 3.3: Verwendete Oligonukleotide zur Unterscheidung von Wildtyp- und Knockout-Klonen.....	69
Tabelle 3.4: Herstellung der Sonden zu Analyse der Knockout-Stämme	71
Tabelle 4.1: Aufstellung der generierten Knockout-Stämme	91
Tabelle 4.2: Überprüfung der Interferenzreaktion der Stämme „6875“ und „675“ mit und ohne Expression von <i>cas3</i>	96
Tabelle 4.3: Überprüfung der Interferenzreaktion der HvoCas6-Mutanten	113

Tabelle 8.1: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen einzelner Banden der Komplex-Ko-Aufreinigungen	162
Tabelle 8.2: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von rekombinantem ClaCas6	168
Tabelle 8.3: Detaillierte Ergebnisse der Interferenztests.....	176

8.4. Verwendete Abkürzungen

° C	Grad Celsius
A	Adenin
AA	Acrylamid
ad	lat.: bis zu
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B-AA	Bis-Acrylamid
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ca	<i>casamino acids</i>
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CRISPR	<i>clustured regularly interspaced palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR-Ribonukleinsäure
CTP	Cytidintriphosphat
<i>dam</i>	DNA-Adenin-Methylase
<i>dcm</i>	DNA-Cytosin-Methylase
denatur.	denaturiert
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (lateinisch: und andere)
5-FOA	5-Fluororotsäure
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
G	Guanin
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser
h	Stunde
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (englisch: Meerrettich-Peroxidase)

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
krpm	Umdrehungen pro Minute x 1000
L	Liter
M	molar, Mol pro Liter
μ Ci	Mikrocurie
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	millimolar, Millimol pro Liter
μ M	mikromolar, Mikromol pro Liter
mRNA	<i>messenger</i> RNA (englisch: Boten-Ribonukleinsäure)
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nM	nanomolar, Nanomol pro Liter
Nt	Nukleotide
OD ₆₅₀ /OD ₆₀₀	optische Dichte bei 650 bzw. 600 Nanometer
PAA	Polyacrylamid
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RAMP	<i>repeat associated mysterious protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (englisch: Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-Aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Trp	Tryprophan
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i> (englisch: Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (englisch: Masse pro Volumen)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
YPC	<i>yeast-peptone-casamino acids</i>

8.5. Massenspektrometrische Analysen

Tabelle 8.1: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen einzelner Banden der Komplex-Ko-Aufreinigungen. Die aus SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnittenen Banden (siehe Kapitel 4.2.3.2. bzw. Abbildung 4.11) wurden mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptide anhand von LC-MS/MS (*liquid chromatography tandem mass spectrometry*) mit Hilfe eines Orbitrap XL Massenspektrometers (ThermoFisherScientific) analysiert. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der MASCOT Software mit der Proteindatenbank von *H. volcanii* (www.halolex.mpg.de, PFEIFFER ET AL., 2008) verglichen und so die Anzahl von einzigartigen Peptiden ermittelt. In Spalte 1 sind die identifizierten Proteine angegeben, in Spalte 2 das jeweilige theoretische Molekulargewicht in kDa und in den Spalten 3 bis 11 die für die Banden #1 bis #9 ermittelte Anzahl einzigartiger Peptide. Die höchsten Peptid-Werte für jede Bande sind in Rot hervorgehoben. Die Analysen wurden freundlicherweise von Herrn Kundan Sharma (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, Bioanalytical Mass Spectrometry Group, Arbeitsgruppe Prof. H. Urlaub) durchgeführt.

Identifizierte Proteine [Haloferax volcanii DS2]	Molekular- Gewicht	Anzahl einzigartiger Peptide								
		#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
hypothetical protein C498_09706 (=Cas8b)	76 kDa	12	4	32	10	13	0	2	8	0
CRISPR-associated protein, Csh2 family (=Cas7)	38 kDa	49	19	30	5	8	10	7	26	9
CRISPR-associated protein Cas6	31 kDa	13	20	2	4	25	13	38	12	22
CRISPR-associated protein Cas5, Hmari subtype	29 kDa	7	36	5	10	14	23	12	12	11
RadA [Haloferax volcanii]	37 kDa	22	9	16	4	1	1	0	20	2
beta-lactamase domain protein	50 kDa	10	4	9	0	1	0	2	15	0
iron transport protein A	66 kDa	8	3	5	0	3	0	0	3	0
multicopper oxidase (MCO)	42 kDa	10	5	6	0	1	1	3	2	1
ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate zinc)	40 kDa	18	4	2	0	0	2	0	8	0
uncharacterized protein HVO_2770	36 kDa	0	9	0	2	4	6	8	0	0
ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate sulfate/tungstate)	36 kDa	4	7	1	2	2	8	7	3	7
oxoglutarate—ferredoxin oxidoreductase beta subunit	31 kDa	0	9	0	6	14	5	0	0	0
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type II	38 kDa	3	0	15	2	0	0	0	8	1
AAA-type ATPase (MoxR subfamily)	37 kDa	9	0	9	0	0	0	0	13	0
aminotransferase class V	41 kDa	10	0	9	0	0	0	0	9	0
iron transport protein C	70 kDa	4	1	0	0	0	0	0	1	0
cro/C1 family transcription regulator	36 kDa	8	0	10	0	0	0	0	7	0
ATP-binding protein Mrp	37 kDa	12	0	6	0	0	0	0	4	0
glucose-fructose oxidoreductase	36 kDa	1	5	0	0	1	0	0	1	5
uncharacterized protein HVO_1240	37 kDa	12	1	2	0	0	0	0	6	0
glutamate-1-semialdehyde 2,1-	48 kDa	3	1	2	1	0	0	0	2	0

aminomutase										
ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate sugar)	39 kDa	6	3	2	1	0	2	1	3	1
putative oxidoreductase (short-chain dehydrogenase family)	26 kDa	0	2	0	1	8	3	6	0	0
ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate glutamine)	32 kDa	4	4	0	0	1	3	2	3	3
ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate dipeptides/oligopeptides)	63 kDa	5	4	0	0	0	0	0	5	0
mRNA 3-end processing factor homolog	72 kDa	9	1	0	0	0	0	0	0	0
DNA-directed RNA polymerase subunit A'	109 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein	31 kDa	0	1	0	1	5	0	4	1	0
thiosulfate sulfurtransferase	32 kDa	0	0	0	1	5	1	1	0	0
hypothetical protein HVO_A0406	42 kDa	4	3	1	1	0	0	0	0	0
ABC-type transport system ATP-binding protein (probable substrate phosphate)	31 kDa	7	0	1	0	0	0	0	4	3
cyanide insensitive terminal oxidase chain cioA	52 kDa	2	2	0	0	0	2	0	0	1
SecY [Haloferax volcanii]	52 kDa	0	5	0	0	1	2	2	0	0
pyridoxal phosphate-dependent aminotransferase (probable aspartate aminotransferase)	40 kDa	4	0	4	0	0	0	0	1	0
rimK family protein	32 kDa	0	3	0	4	4	0	0	0	0
ABC-type transport system ATP-binding protein (probable substrate zinc)	30 kDa	0	7	0	0	3	4	0	0	0
chromosome partitioning protein ParA family ATPase	30 kDa	0	6	0	0	1	4	0	0	0
UDP-glucose 4-epimerase	35 kDa	4	0	5	0	0	0	0	2	0
putative metalloprotease	42 kDa	0	6	0	0	0	4	1	0	0
NAD-dependent epimerase/dehydratase	37 kDa	8	1	0	0	0	0	0	0	0
probable inositol-1(or 4)-monophosphatase / fructose-1,6-bisphosphatase, archaeal type	29 kDa	0	0	0	0	10	0	1	0	0
N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	37 kDa	5	0	2	0	0	0	0	4	0
AAA-type ATPase (MoxR subfamily)	36 kDa	8	0	3	0	0	0	0	2	0
arNOG06768 family NADH-binding domain protein	32 kDa	0	2	0	2	0	5	0	0	0
2-oxoacid dehydrogenase E1 component beta subunit	36 kDa	3	0	1	0	0	0	0	6	0
ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate iron-III)	44 kDa	5	1	1	0	0	0	0	0	0

amidohydrolase	32 kDa	0	4	0	0	2	0	0	0	0
ABC-type transport system ATP-binding protein (probable substrate dipeptides/oligopeptides)	39 kDa	7	0	0	0	0	0	0	0	0
uncharacterized protein HVO_1764	34 kDa	0	2	0	1	2	0	0	0	2
UDP-glucose 4-epimerase	34 kDa	3	1	1	0	1	0	0	4	0
ThiJ/Pfpl family protein	24 kDa	0	0	0	0	6	0	3	0	0
archaeal glycosylation protein G	36 kDa	8	0	0	0	0	0	0	0	0
tryptophan synthetase A (trpA)	30 kDa	0	4	0	1	2	1	0	0	0
phosphoglycerate dehydrogenase	35 kDa	4	0	2	0	0	0	0	3	0
uncharacterized protein HVO_1457	33 kDa	0	4	0	0	5	0	0	0	0
seryl-tRNA synthetase	52 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ba3-type terminal oxidase subunit I	64 kDa	1	1	0	0	0	1	1	0	2
unknown protein	38 kDa	3	0	0	0	0	1	1	1	0
30S ribosomal protein S5	23 kDa	2	0	0	0	0	1	3	0	0
cytochrome bc1 complex Rieske iron-sulfur protein	30 kDa	0	1	0	0	2	1	3	0	0
uncharacterized protein HVO_1981	20 kDa	6	1	1	0	0	0	0	2	0
halocyanin	84 kDa	5	3	0	0	0	0	1	0	0
ParA domain protein	25 kDa	0	0	0	0	0	2	1	0	0
unknown protein	42 kDa	5	0	1	0	0	0	0	2	0
HTR-like protein	33 kDa	0	1	0	0	2	0	6	0	0
putative oxidoreductase (aldo-keto reductase family protein)	36 kDa	3	0	2	0	0	0	0	2	0
ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate zinc)	36 kDa	3	2	0	0	0	0	0	3	0
putative metallo-beta-lactamase family hydrolase	36 kDa	1	0	2	0	0	0	0	4	0
HD family hydrolase	30 kDa	0	0	0	0	4	0	2	0	0
YfiH family protein	27 kDa	0	3	0	2	3	2	0	0	0
rhamnosyl transferase homolog	35 kDa	0	0	0	0	4	0	2	0	0
oxidoreductase (homolog to zinc-containing alcohol dehydrogenase)	37 kDa	2	0	2	0	0	0	0	1	0
GHMP family kinase (homolog to beta-ribofuranosylaminobenzene 5'-phosphate synthase)	34 kDa	0	7	0	1	0	0	0	0	0
amidohydrolase	33 kDa	0	3	0	1	1	1	0	0	0
precorrin-3B C17-methyltransferase	32 kDa	0	2	0	0	1	1	0	0	0
putative oxidoreductase (aldo-keto reductase family protein)	39 kDa	3	0	3	0	0	0	0	2	0
magnesium transport protein CorA	37 kDa	0	4	0	0	0	2	1	0	0
ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate dipeptides/oligopeptides)	67 kDa	3	3	0	0	0	0	0	0	0
oxidoreductase (homolog to zinc-	36 kDa	3	0	0	0	0	0	0	1	0

containing alcohol dehydrogenase / threonine 3-dehydrogenase)										
asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing)	39 kDa	0	0	3	0	0	0	0	2	0
L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase	56 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pyruvate--ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	68 kDa	1	0	0	0	0	0	1	0	0
glutamate dehydrogenase	47 kDa	3	0	2	0	0	0	0	2	0
putative glycosyltransferase, type 1	39 kDa	4	0	1	0	0	0	0	1	0
putative glycosyltransferase, type 1	41 kDa	2	0	1	0	0	0	0	0	0
ABC-type transport system permease protein (probable substrate iron-III)	56 kDa	0	3	0	0	0	1	0	0	0
aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit	34 kDa	0	0	0	3	2	0	0	0	0
UDP-glucose 4-epimerase	34 kDa	6	0	2	0	0	0	0	0	0
sirohdrochlorin cobaltochelatease	32 kDa	1	0	3	0	0	0	0	0	0
carbamoyl-phosphate synthase (glutamine-hydrolyzing) large subunit	117 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate iron-III)	43 kDa	3	1	1	0	0	0	0	0	1
ABC-type transport system ATP-binding protein (probable substrate thiamine)	38 kDa	3	0	1	0	0	0	0	1	0
FtsZ family protein, type III	41 kDa	1	0	4	0	0	0	0	1	0
alpha/beta hydrolase fold protein	33 kDa	0	3	0	0	0	3	0	0	0
ABC-type transport system ATP-binding protein (probable substrate copper)	29 kDa	0	2	0	0	0	2	0	0	0
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, type I	38 kDa	2	0	0	0	0	0	0	1	0
transcription initiation factor TFB	36 kDa	0	0	0	0	0	0	5	0	1
uncharacterized protein HVO_1685	54 kDa	4	0	0	0	0	0	0	0	0
putative oxidoreductase (short-chain dehydrogenase family)	30 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0
FAD binding domain, putative	56 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate phosphate)	37 kDa	1	2	0	0	0	1	0	0	0
DNA topoisomerase VI subunit A	42 kDa	3	1	1	0	0	0	0	0	0
uncharacterized protein HVO_1567	26 kDa	0	2	0	2	1	0	0	0	0
methionyl aminopeptidase	32 kDa	2	0	0	0	0	0	0	2	0
putative thymidine phosphorylase	52 kDa	0	0	0	0	0	1	0	0	0
imidazoleglycerol-phosphate synthase subunit HisF	29 kDa	0	0	0	0	5	0	1	0	0
A-type ATP synthase subunit D	30 kDa	0	0	0	0	4	0	2	0	0
putative thiazole biosynthetic enzyme / probable ribose-1,5-bisphosphate	32 kDa	1	0	5	0	0	0	0	0	0

isomerase										
NADH dehydrogenase-like complex subunit L	72 kDa	3	1	0	0	0	0	0	0	0
50S ribosomal protein L3	37 kDa	0	3	0	1	0	0	0	0	0
unnamed protein product [Haloferax volcanii]	28 kDa	0	0	0	0	1	0	3	0	0
2-keto-3-deoxygluconate kinase	34 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	4
stomatin family protein	46 kDa	5	0	0	0	0	0	0	0	0
putative oxidoreductase (aldo-keto reductase family protein)	31 kDa	0	0	0	0	3	0	0	0	0
ornithine carbamoyltransferase	33 kDa	2	0	0	0	0	0	0	1	0
uncharacterized protein HVO_2015	38 kDa	2	0	1	0	0	0	0	0	0
replication factor C small subunit	36 kDa	0	0	0	1	0	2	0	0	0
cytochrome c oxidase subunit I [Haloferax volcanii]	64 kDa	3	0	0	0	0	0	0	1	0
ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate iron-III)	42 kDa	4	0	0	0	0	0	0	0	0
uncharacterized protein HVO_0951	38 kDa	4	0	0	0	0	0	0	0	0
ABC-type transport system ATP-binding protein (probable substrate iron-III)	32 kDa	0	0	0	0	4	0	0	0	0
transcription regulator (homolog to phosphate uptake regulator)	37 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0
ornithine cyclodeaminase	35 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	5
oxoglutarate--ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	64 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ketol-acid reductoisomerase	38 kDa	0	0	0	0	0	0	0	4	0
ABC-type transport system ATP-binding protein	36 kDa	5	0	0	0	0	0	0	0	0
putative helicase family protein	145 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0
phosphoenolpyruvate synthase	83 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	0
uncharacterized protein HVO_0845	30 kDa	0	1	0	0	0	0	0	0	2
NADH dehydrogenase-like complex subunit M	55 kDa	0	1	0	0	0	0	2	0	0
uncharacterized protein HVO_2253	42 kDa	2	0	0	0	0	0	0	1	0
pyrroline-5-carboxylate reductase	27 kDa	0	1	0	2	0	0	0	0	0
ABC-type transport system permease protein (probable substrate dipeptides/oligopeptides)	52 kDa	2	0	0	0	0	0	0	1	0
CBS/parB domain protein	29 kDa	0	0	0	0	1	0	2	0	0
uncharacterized protein HVO_2263	90 kDa	1	0	0	0	0	0	0	0	0
TrmB family transcription regulator	29 kDa	0	0	0	0	1	0	3	0	0
ABC-type transport system periplasmic substrate-binding protein (probable substrate iron-III)	45 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0
FAD-dependent oxidoreductase (homolog	51 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0

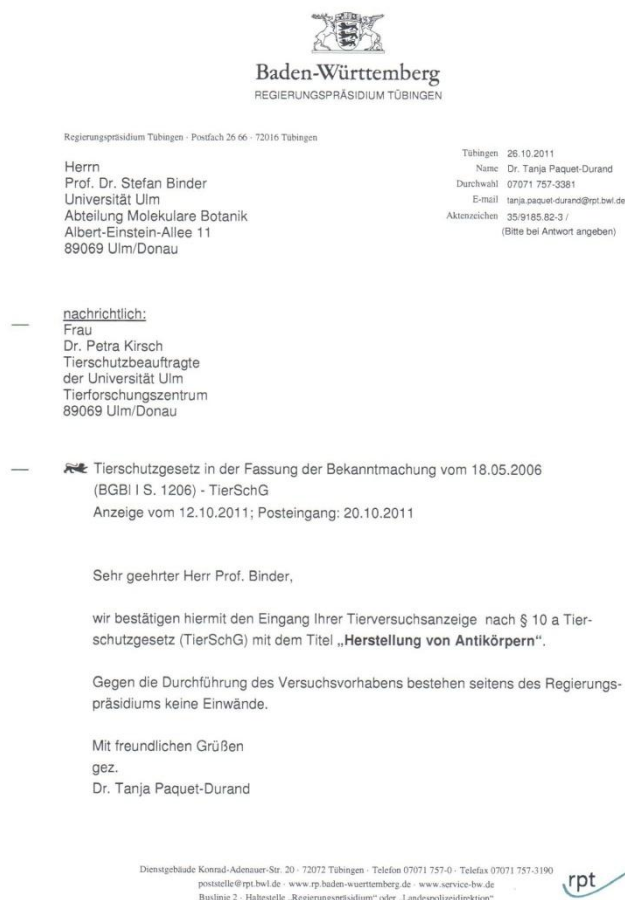
to geranylgeranyl reductase)										
uncharacterized protein HVO_2771	29 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0
cell division protein FtsZ, type II	43 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0
uncharacterized protein HVO_1424	41 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0
UDP-glucose 4-epimerase	34 kDa	1	0	3	0	0	0	0	0	0
PhnP-like protein	30 kDa	0	0	0	0	2	0	0	0	0
glutamate 5-kinase	32 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0
2-D-hydroxyacid dehydrogenase	33 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0
alanyl-tRNA synthetase homolog	27 kDa	0	0	0	0	3	0	0	0	0
transcription initiation factor TFB	37 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2
3-isopropylmalate dehydrogenase	34 kDa	2	0	0	0	0	0	0	1	0
cytochrome bc1 complex cytochrome b/c subunit	29 kDa	2	1	0	0	0	0	0	0	0
GMP synthase (glutamine-hydrolyzing) subunit B	34 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	2
centromere-like function with Spo0J involved in forespore	32 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0
signal-transducing histidine kinase-like protein	35 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0
short-chain family oxidoreductase	30 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0
alpha/beta hydrolase fold protein	34 kDa	0	3	0	0	0	0	0	0	0
UPF0761 family protein	47 kDa	3	0	0	0	0	0	0	0	0
uncharacterized protein HVO_1609	31 kDa	0	0	0	0	0	0	3	0	0
FtsZ [Haloferax volcanii]	36 kDa	0	0	3	0	0	0	0	0	0
uncharacterized protein HVO_1623	33 kDa	0	0	0	0	0	0	0	0	3
succinyl-CoA synthase, beta subunit	41 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0
xylose dehydrogenase (NADP)	35 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0
XerC/D-like integrase	39 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0
50S ribosomal protein L32e	26 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Orc1-type DNA replication protein	45 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0
putative dimethyladenosine transferase	32 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0
short-chain family oxidoreductase	28 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0
DUF373 family protein	40 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0
gluconate permease gntP	49 kDa	0	0	0	0	0	0	2	0	0
alkanal monooxygenase-like protein	36 kDa	0	0	2	0	0	0	0	0	0
phosphotransferase system component IIC	52 kDa	0	2	0	0	0	0	0	0	0
translation initiation factor aIF-2B delta subunit	31 kDa	0	0	0	0	0	2	0	0	0
acyl-CoA dehydrogenase	41 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Trk system potassium uptake protein TrkH	57 kDa	2	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 8.2: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von rekombinantem ClaCas6. Die aus einem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnittene Bande (siehe Kapitel 4.5.1. bzw. Abbildung 4.23) wurden mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptide anhand von LC-MS/MS (*liquid chromatography tandem mass spectrometry*) mit Hilfe eines Orbitrap XL Massenspektrometers (ThermoFisher Scientific) analysiert. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der MASCOT Software mit der Proteindatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verglichen und so die Anzahl von einzigartigen Peptiden ermittelt. In Spalte 1 sind die identifizierten Proteine angegeben, in eckigen Klammern jeweils der Organismus, in Spalte 2 die Accession Number, in Spalte 3 das jeweilige theoretische Molekulargewicht in kDa und in Spalte 4 die ermittelte Anzahl einzigartiger Peptide. Der höchste Peptid-Wert ist in Rot hervorgehoben. Die Analysen wurden freundlicherweise von Herrn Kundan Sharma (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, Bioanalytical Mass Spectrometry Group, Arbeitsgruppe Prof. H. Urlaub) durchgeführt.

Identifizierte Proteine [Organismus]	Accession Number	Molekular Weigh	Unique Peptides
hypothetical protein Calla_2409 [Caldicellulosiruptor lactoaceticus 6A]	gi 344997570	24 kDa	16
keratin 1 [Homo sapiens]	gi 11935049 (+1)	66 kDa	13
30S ribosomal protein S3 [Escherichia coli O157:H7 EDL933]	gi 15803841 (+6)	26 kDa	9
keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris), isoform CRA_b [Homo sapiens]	gi 119581085 (+3)	63 kDa	9
keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal [Homo sapiens]	gi 47132620	65 kDa	9
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [Escherichia coli O157:H7 EDL933]	gi 15803862 (+5)	21 kDa	8
RNA methyltransferase [Escherichia coli 'BL21-Gold(DE3)pLysS AG']	gi 253774967 (+5)	25 kDa	8
Chain D, Structure Of The 30s Subunit Of A Pre-Translocational E. Coli Ribosome Obtained By Fitting Atomic Models For Rna And Protein Components Into Cryo-Em Map Emd-1056	gi 116667413 (+10)	23 kDa	7
fatty acid metabolism regulator [Shigella flexneri 5 str. 8401]	gi 110805186 (+3)	28 kDa	5
hypothetical protein Z1744 [Escherichia coli O157:H7 EDL933]	gi 15801222 (+5)	23 kDa	5
protein L12	gi 223571	30 kDa	4
triosephosphate isomerase [Escherichia coli O157:H7 EDL933]	gi 15804508 (+1)	27 kDa	4
ribose-phosphate pyrophosphokinase [Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081]	gi 123442671 (+63)	34 kDa	4
RNA-binding protein Hfq [Enterobacter sp. 638]	gi 146310020 (+62)	11 kDa	4
NADH dehydrogenase subunit B [Escherichia coli O157:H7 str. Sakai]	gi 15832425 (+3)	25 kDa	4
hypothetical protein [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]	gi 1657507 (+2)	31 kDa	4
tetrapyrrole methylase family protein [Escherichia coli E24377A]	gi 157157560 (+9)	31 kDa	4

outer membrane protein assembly complex subunit YfiO [Escherichia coli 536]	gi 110642758 (+18)	28 kDa	4
UMP phosphatase [Escherichia coli O157:H7 EDL933]	gi 15800377 (+8)	27 kDa	4
keratin, type I cytoskeletal 9 [Homo sapiens]	gi 55956899	62 kDa	3
Chain A, Trypsin In Complex With Borate	gi 110590762 (+8)	23 kDa	3
GTP cyclohydrolase I [Cronobacter sakazakii ATCC BAA-894]	gi 156933273 (+17)	27 kDa	3
hypothetical protein Z5327 [Escherichia coli O157:H7 EDL933]	gi 15804399 (+17)	27 kDa	3
50S ribosomal protein L3 [Escherichia coli O157:H7 EDL933]	gi 15803847 (+6)	22 kDa	3
keratin, type II cytoskeletal 5 [Homo sapiens]	gi 119395754 (+2)	62 kDa	2
DNA-binding transcriptional regulator BasR [Escherichia coli O157:H7 EDL933]	gi 15804705 (+14)	25 kDa	2
lipoprotein transporter ATP-binding subunit [Escherichia coli 536]	gi 110641294 (+25)	23 kDa	2
ClpXP protease specificity-enhancing factor [Citrobacter koseri ATCC BAA-895]	gi 157148798 (+26)	18 kDa	2
L-arabinose transporter permease protein [Escherichia coli 536]	gi 110642012 (+10)	34 kDa	2
hydroxyethylthiazole kinase [Escherichia coli E24377A]	gi 157155537 (+38)	27 kDa	2
DNA polymerase III subunit epsilon [Escherichia coli ATCC 8739]	gi 170021437 (+1)	27 kDa	1
hypothetical protein Calhy_2556 [Caldicellulosiruptor hydrothermalis 108]	gi 312128741	24 kDa	1
hydrogenase 2 small subunit [Escherichia coli 536]	gi 110643237 (+12)	40 kDa	1
N-acetylmannosamine kinase [Shigella flexneri 5 str. 8401]	gi 110807082 (+14)	30 kDa	1
glutamine transporter subunit [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]	gi 16128777 (+5)	27 kDa	1
pyruvate formate lyase-activating enzyme 1 [Escherichia coli APEC O1]	gi 117623083 (+31)	30 kDa	1
Keratin 14 [Homo sapiens]	gi 12803709 (+7)	52 kDa	1
dTDP-viosamine N-acetyltransferase [Escherichia coli IAI39]	gi 218699373	21 kDa	1
cAMP-regulatory protein [Shigella flexneri 5 str. 8401]	gi 110807191 (+5)	24 kDa	1
30S ribosomal protein S2 [Shigella flexneri 5 str. 8401]	gi 110804221 (+10)	34 kDa	1
ribonuclease T [Shigella flexneri 5 str. 8401]	gi 110805628 (+16)	23 kDa	1

8.6. Genehmigung für Tierversuche



8.7. Anpassung von Gensequenzen

Die Gensequenzen von HvoCas6 und ClaCas6 wurden von der Firma GeneArt/Life Technologies für die Expression in *E. coli* optimiert. Im Folgenden sind jeweils die Original-Sequenz und die angepasste Sequenz angegeben:

HvoCas6

Gensequenz HVO_A0205 (CRISPR-associated protein Cas6):

GTGCGTATAGAATTAGCGCTCGATGCCGTTGCTGATGCGCCTACGACCGGTCTTATTTCCATAAGGCACGCG
GACGCATCTGGCGCGGCCTCGAGAACGACGACACGTTCTCGGAGACCCACGATTCGAACCACGGCGTCGGGT
TTTCGTA CTCTAATATCTTCCCTTGGGGACAGATAGAAGAGGGGCGACCGGCGATACTTCCGCATCGCGTCGCCA
CGGCGTG GGTGTTAGACACGCTCATCGCTCATTTGCGCCGCGAGCGTGCGTTGCAAATTGGGCAGATGCGGT
TCACTATCGACGACATCACCGGTCACGCCCCGGACGTGGGTGAGGCCGGATCGACCGGTGTCCTCGAGACGG
GAACCGGTGTCCACTGTGCACTTGGCCGTCAATTGGCCGAGGAGTACA ACTTAGACACGTGAAAAATCGACGC

CGGCGAATCAGAGACGGAACCTCTTCTGGCGTCCGAAGCACGGCATGGAACCGTTACAGGACGCCATCCGGCG
 GTCGCTCCAACAGACACACGAGCTGTATGGAGACGACTACTACGACGGCCCGGGGAGGTGCGACGAACCGCT
 CTTGACCGCATCGAGCCGATCAAAGACGACGTCGTCTATCCGGTTCGCTTCCAGCCGCGACCGCGGTTGAC
 CGCACCGTTCTGCTTTCGAAGTGGCGCTTCGGCTACCGCGTTCGAGACGAGACACACCGATACCACCTGAATCT
 CGCGCTCGATTGGGGATTGGACAGCGACGCGAACACGGGTTTGGCTTCTGAACCTCACCGACAAAACGCTT
 CCACGGGCGAGTGACTGA

Angepasste Gensequenz HvoCas6:

ATGGTTCGTATTGAACTGGCATTAGATGCCGTGGCAGATGCGGCTTATGACCGCAGCTACTTTCATAAAGCCA
 GAGGTGCGATCTGGCGTGGCCTTGAGAATGATGACACCTTCAGTGAAACACATGATTCAAACCACGGGGTCTG
 GATTTTCTTATTCCAATATATTCCCGTGGGGTCAGATTGAAGAGGGCGATCGCCGATATTTTAGGATCGCGTCG
 CCTCGTCGCGGTCTGTTGGACACGCTCATTGCTCATTTTGGACGTGAACGGGCATTTCGAGATAGGGCAAATGA
 GATTTACTATTGATGACATCACCGGTCACGCTCCAGATGTAGGCGAAGCCGGAAGCACAGGCGTTCTGGAAC
 GGGTACTGGGGTGCATTGTGCGTTAGGTCGCCAGCTAGCAGAAGAGTACAACCTGGATACCAGTAAGATTGA
 CGCTGGCGAATCAGAAACAGAGCTTTTTTGGCGTCCCAAACACGGAATGGAACCGTTGCAGGATGCCATACG
 GCGATCTCTGCAGCAAACGCATGAGTTATATGGCGACGATTATTACGATGGTCCTGGGGAAGTAGATGAACCA
 CTGTTTCGACCGCATTGAGCCGATCAAAGATGATGTTGTGTATCCCGTCCGTTTTCAACGGCAACTGCGGTTGA
 CAGAACCGTGCTTCTCTCAAATGGCGTTTTGTTATCGCGTAAGGGATGAAACACACCGCTACCATCTGAATC
 TGGCCTTAGATAGCGGCATTGGACAGCGTCGGGAACATGGTTTTGGGTTCTTGAATCTGACCGACAAGACGCT
 TCCTAGAGCGTCGGATTAA

ClaCas6

Gensequenz Calla_2409

ATGATGGGCTGTGATGAAAAAGTGGCAAATACTTTACATTTTCATTTTTGGGCAAGGGAGGATGGCGTGT
 TGCCATCTCTTATTACTCTAAGGTATATGAAGTTTTGAAAAGTCTTCTTGCAACCGAGCAGTTTACCATCTCTCC
 CATTAAACAAAGAACAAAAAAGAGGTTGAAGATGGCGTATGGGTGTTTGAAGATTTTAGGATATACCTTGCA
 ACACCTTTTTTAGAGCTTTTCACACAGAACATATTAAGATTTATGAACTTTAAATGGCTTGTTTGAAGGTATT
 TACTTGAAGAAAATATCATGCAGGAGTCAGCAGCCAAAAGCAAGTGAATTTTGCTCAGCGGTGTGTTTGCTC
 AAAAAGACGGTGTTTGCTTGAATATGACAGGCAGCCAGAGATTTTTCTGATGGGTTGAGAAGACAGCTTTT
 GAACATCTACTACCAGAGGTTTGGGGCATATCCAGAAGACCAGAGGTTTTCTTTGTTATAAAAGATGGCTTGA
 AAAAGCAGCATTGATTAGATCAAGAATTGAGTATTTTGGCAGGTACGAAATTTTGCTTCAAGCGAGCTTCTT
 GACATGTTCTGCCAGATGTTCTGTGTGAAGTAG

Angepasste Gensequenz ClaCas6

ATGATGGGTTGTGATGAGAAAGTGGCCAAATATTTACCTTTTCATTTTTGGGCACGTGAAGATGGTGT
 GCCGAGCAGCTATTATAGCAAAGTTTATGAAGTTCTGAAAAGCCTGCTGGCAACCGAACAGTTTACCATTAGC
 CCGATTAACCAAAAAACAAAAAAGAGGTTGAGGACGGCGTTTGGGTGTTTGAAGATTTTCGTATTATCTGG
 CAACCCCGTTTCTGGAAGTGTATACCCAGAACATTCTGAAAATCTACGAAACCCTGAATGGTCTGTTTGAAGGC
 ATCTACCTGAAAAAATCAGCTGTCGTAGCCAGCAGCCGAAAGCAAGCGGTATTCTGCTGAGCGGTGTTTTG
 CACAGAAAGATGGCGTTTGTCTGGAATATGATCGTCAGCCGGAATCTTTAGTGATGGTCTGCGTCGTGAGCT
 GCTGAATATCTATTATCAGCGTTTTGGTGCATATCCGGAAGATCAGCGCTTTTTTTTCGTGATTAAAGATGGTCT
 GAAAAACAGCATCTGATTCGTAGCCGCATTGAATATTTTGGTCGCTATGAAATTTTTCGAGCAGCGAACTGC
 TGGATATGTTTTGTGAGATGTTTTGCGTGAAATAA

8.8. Bioinformatische Vorhersage von Sekundär- und Tertiärstrukturen

Die Aminosäureabfolgen der Proteine HvoCas6 und ClaCas6 wurden mit Hilfe des Phyre²-Servers (KELLEY & STERNBERG, 2009) analysiert.

HvoCas6:

Return to main results Retrieve Phyre Job Id Fetch



Job Description	HvoCas6
Confidence	100.00%
Rank	2
% Identity	15%
PDB Info	PDB header: hydrolase Molecule: endonuclease;
Resolution	2.25 Å
Model Dimensions (Å)	X: 44.932 Y: 55.202 Z: 41.192

Date	Fri Oct 11 10:34:55 BST 2013
Aligned Residues	213
Template	c3i4hX
PDBTitle	crystal structure of cas6 in pyrococcus furiosus

[Show / Hide SS confidence](#)

[Show / Hide Conservation and Alignment quality](#)

■ Insertion relative to template
■ Deletion relative to template
■ Catalytic residue from the CSA

[Detailed help on interpreting your alignment](#)

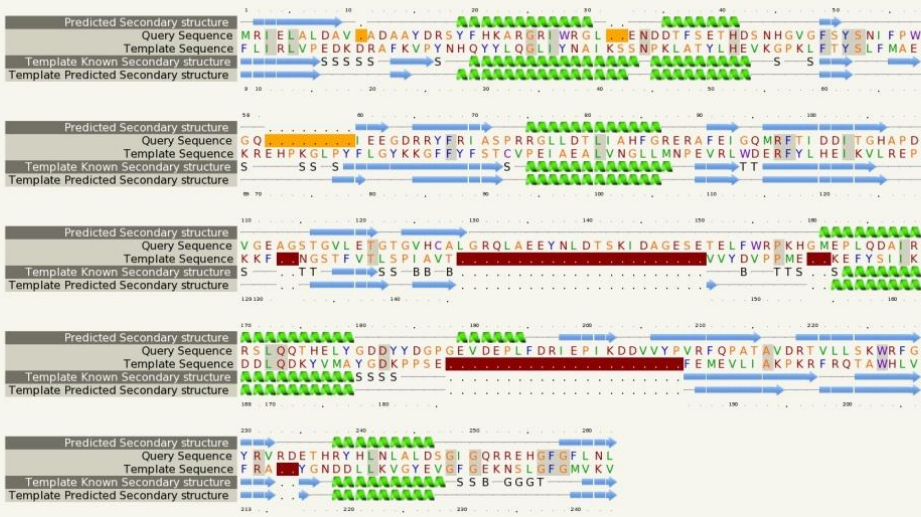
Predicted Secondary structure

Query Sequence

Template Sequence

Template Known Secondary structure

Template Predicted Secondary structure



Download: [Text version](#) [FASTA pairwise alignment](#) [3D Model in PDB format](#)



[View in Jmol](#)

[Send structure to FirstGlance for more viewing options](#)

Phyre is for **academic use only**

Please cite: Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server
Kelley LA and Sternberg MJ. *Nature Protocols* 4, 363 - 371 (2009) [pdf] [import into BibTeX]

© Structural Bioinformatics Group, Imperial College, London

Lawrence Kelley, Benjamin Jeffreys

Disclaimer

[Terms and Conditions](#)

Phyre2 is part of **Genome3D**



BBSRC

ClaCas6:

Return to main results Retrieve Phyre Job Id Fetch



Job Description	ClaCas6	Date	Wed Dec 18 09:14:44 GMT 2013
Confidence	100.00%	Aligned Residues	164
Rank	2	Template	c34hX
% Identity	11%	Chain: X: PDB	PDBTitle: crystal structure of cas6 in pyrococcus furiosus
PDB info	PDB header: hydrolase	Molecule:	endoribonuclease;
Resolution	2.25 Å		
Model Dimensions (Å)	X:62.028 Y:45.792 Z:35.427		

[Show / Hide SS confidence](#)
[Show / Hide Conservation and Alignment quality](#)

■ Insertion relative to template
■ Deletion relative to template
 Catalytic residue from the CSA

[Detailed help on interpreting your alignment](#)

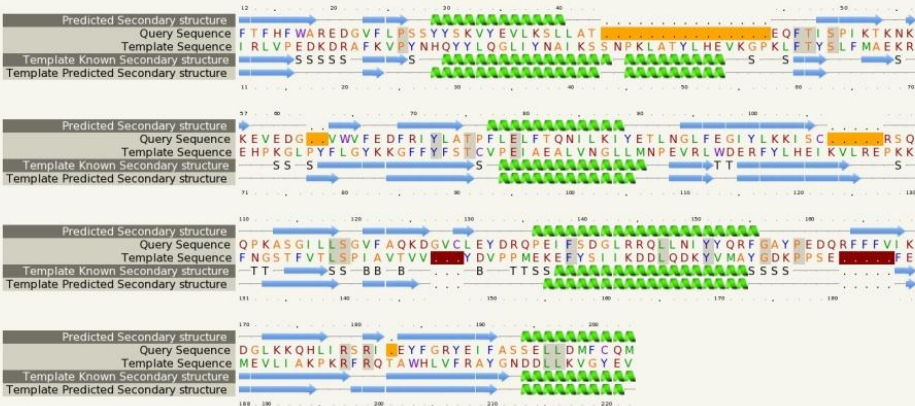
Predicted Secondary structure

Query Sequence

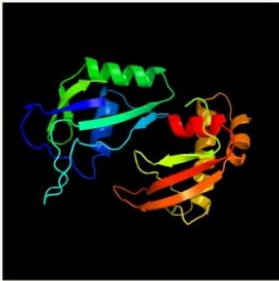
Template Sequence

Template Known Secondary structure

Template Predicted Secondary structure



Download: [Text version](#) [FASTA pairwise alignment](#) [3D Model in PDB format](#)



[View in JSmol](#)
[Send structure to FirstGlance for more viewing options](#)

Phyre is for **academic use only**

Please cite: Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server
 Kelley LA and Sternberg MJ. *Nature Protocols* 4, 363 - 371 (2009) [\[pdf\]](#) [\[import into BibTeX\]](#)

© Structural Bioinformatics Group, Imperial College, London

[Laurence Kelley](#), [Benjamin Jefferys](#)

[Disclaimer](#)

[Terms and Conditions](#)

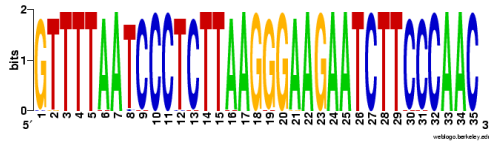
Phyre2 is part of [Genome3D](#)



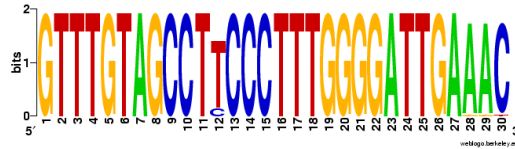
8.9. Das CRISPR/Cas-System von *C. lactoaceticus*

Konsensus-Sequenzen der Repeats der CRISPR-Loci im Genom von *C. lactoaceticus* laut der *CRISPR interactive database* (ROUSSEAU ET AL., 2009, vergleiche Abbildung 1.8):

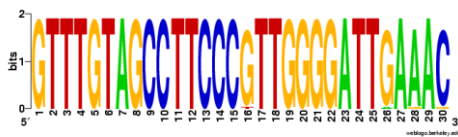
Locus 1:



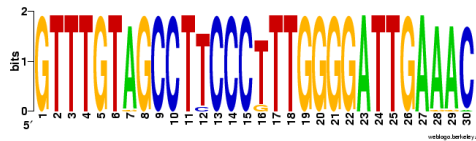
Locus 2:



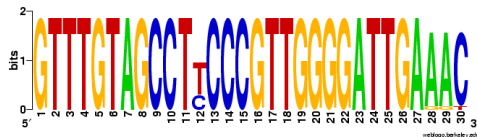
Locus 3:



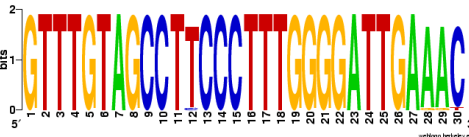
Locus 4:



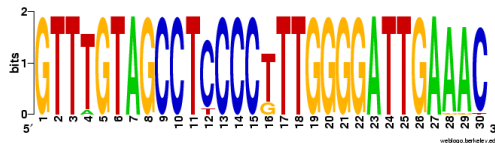
Locus 5:



Locus 6:



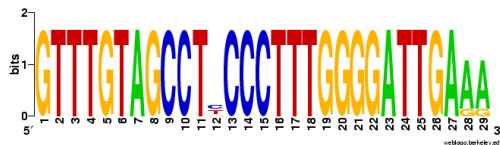
Locus 8:



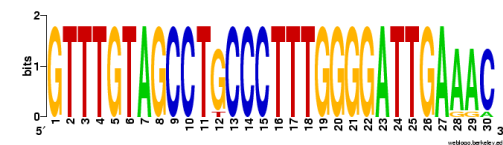
Locus 9:



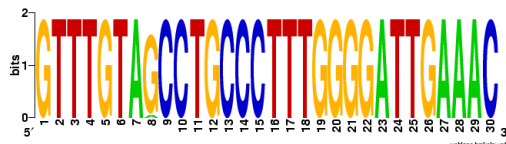
Locus 10:



Locus 11:



Locus 12:



Sequenzvergleiche der Leader der CRISPR-Loci von *C. lactoaceticus*. Gleiche Nukleotide sind in schwarz unterlegt. Die Leader der Loci 1 und 7 weichen jeweils signifikant ab wurden daher nicht in die Sequenzvergleiche integriert.

Loci 2, 3, 4, 5 und 8:

Locus2	1	---ATCAATA--CATATTTAAAC---TTTTGTATTTTCCAATTGCTGTCGACCTGCAATC
Locus3	1	---TTTGTTG--CATATATCAAT---TTTTGTATTTACCAATTGCTGTCGACCTGTAATC
Locus4	1	TTATCTGTTA--CGGCT--AAT--TCTTGCAATTTACCAATTGCTGTCGACCTGTAATC
Locus5	1	----ATATAAGCCAATTCTTTA----TTTTGTATTTACCAATTGCTGTCGACCTGTAATC
Locus8	1	-----TTA--CAGTTTTTTAGTGA---TTTTGTATTTTCCAACGCTGTCGACCTGTAATC
Locus2	53	CCCCCAAAACCCCCGGGGGTCGACAGCAAAAGGTAATTTCTGACATGTGTTGACTTTCA
Locus3	53	CCCCCAAAACCCCCGGGGGTCGACAGCAAAAGGTAATTTCTGGCATGTGTTGACTTTCA
Locus4	53	CCCCCAAAACCCCCGGGGGTCGACAGCAAAAGGTAATTTCTGACATGTGTTGACTTTCA
Locus5	53	CCCCCAAAACCCCCGGGGGTCGACAGCAAAAGGTAATTTCTGGCATGTGTTGACTTTCA
Locus8	52	CCCCCAAAACCCCCGGGGGTCGACAGCAAAAGGTAATTTCTGGCATGTGTTGACTTTCA
Locus2	113	AGAGTTTGTGGGGTATAATAGAAATAACCTATAGCAGCTTGAAAACCTAACCATTTGTTC
Locus3	113	AGAGTTTGTGGGGTATAATAGAAATAACCTACAGCAGCTTGAAAACCTAACCATTTGTTC
Locus4	113	AGAGTTTGTGGGGTATAATAGAAATAACCTACAGCAGCTTGAAAACCTAACCATTTGTTC
Locus5	113	AGAGTTTGTGGGGTATAATAGAAATAACCTATAGCAGCTTGAAAACCTAACCATTTGTTC
Locus8	112	AGAGTTTGTGGGGTATAATAGAAATAACCTATAGCAGCTTGAAAACCTAACCATTTGTTC
Locus2	173	CTTGCGGCTTTTCTCAAACCTATCTACGG--
Locus3	173	CTTGCGGCTTTTCTCAAACCTATCTACGG--
Locus4	173	CTTGCGGCTTTTCTCAAACCTATCTACGG--
Locus5	173	CTTGCGGCTTTTCTCAAACCTATCTACGG--
Locus8	172	CTTGTGGCTTTCTCAAACCTATCTACGGG

Loci 6, 9, 10, 11 und 12:

Locus6	1	--TTGGTTTGTATTTCGGTTTCATGCTTGCGGGCTGTGGGTTTGAGCTGATTTTGGGAAGC
Locus9	1	ATCTTTTATTGTATTTCGGTTTCATGTTTGTGGGATGTGGCTTTGAATGGATTCTGGCAGC
Locus10	1	AACTTTGATTGTATTTCGGTTTCATGTTTGTGGGATGTGGCTTTGAATGGATTCTGGCAGC
Locus11	1	GGATGATTGTATTTCGGTTTCATGTTTGTGGGAGTGGCTTTGAATGGATTCTGGCAGC
Locus12	1	GTTTGGTTTGTATTTCGGTTTCATGTTTGTGGGATGTGGCTTTGAATAGCTTCTGGCAGC
Locus6	59	AGATGGATAGACGGAAGGTTTGAGAAAGTTCTTTTCTTTTGATACAACTGGGTTTGTGC
Locus9	61	AGCTGGATAGACGGAAGGTTTGA--AAGGCTTCTTTTCTTTTATGCAACTGGGTTTGTGT
Locus10	61	AGCTGGATAGACGGAAGGTTTGA--AAGGCTTCTTTTCTTTTATGCAACTGGGTTTGTGT
Locus11	61	TGCTGGATAGACGGAAGGTTTGA--AAGGCTTCTTTTATTTGATGCAACTGGGTTTGTGT
Locus12	61	AGTTGGATAGACGGAAGGCTTTTA--AAGGCTTCTTCTTTTGATGCAGCTGGAATTTGTGT
Locus6	119	CGGTTTTGAGGGCATGTATTAAAATAAAAACATTGACAGTGGTGCATAAAGTTGATATAA
Locus9	120	TGATTTTGAGGGAATGTATCAAAAATAAAAACATTGACAGGGGTGCATAAAGTTGATATAA
Locus10	120	TGATTTTGAGTTGGATGTATTAAATAAAAACATTGACAGGGGTGCATAAAGTTGATATAA
Locus11	120	TGATTTCTAAGGGGTGTATCAAAAATAAAAACATTGACAGAGGTGCATAAAGTTGACATAA
Locus12	120	TGATTTTAAAGGGGTGTACTAAAATAAAAACATTGACAGGGGTGCATAAAGTTGATATAA
Locus6	179	TAAAATCAAGCTTTTTGACGGG
Locus9	180	TAAAATCAGGCTTTTTAACCG--
Locus10	180	TAAAATCAAGCTTTTTCAACCT--
Locus11	180	TAAAATCAGGCTTTTTAACCT--
Locus12	180	TAAAATCAAGCTTTTTAACCT--

8.10. Interferenzttests

Tabelle 8.3: Detaillierte Ergebnisse der Interferenzttests. Es ist jeweils die Anzahl von gebildeten Kolonien pro µg eingebrachte Plasmid-DNA angegeben. Die in Spalte 5 angegebene durchschnittliche Reduktion der Transformationsrate ergibt sich aus dem mathematischen Mittelwert aller vier Tests (je zwei Transformationen mit je zwei Angreiferplasmiden). In Spalte 6 ist die Interpretation des Ergebnisses aufgeführt („+“ = erfolgreiche Interferenzreaktion, Reduktion der Transformationsrate um mindestens das hundertfache, „-“ bzw. „[-]“ = keine bzw. eingeschränkte Interferenzreaktion).

Stamm	Kontrollplasmid pTA352	Angreiferplasmid pTA352-PAM3	Angreiferplasmid pTA352-PAM9	Durchschnittliche Reduktion der Transformationsrate	Interferenz
H119Δcas6+pTA927-cas6-MutanteXXX-FlagN					
Y15A	790 000	1000	3 000	0,003	+
	1 170 000	1000	5300		
Y19A	1 870 000	900	1 600	0,002	+
	1 640 000	7 700	4 200		
H21A	900 000	5 000	1 600	0,004	+
	610 000	1 700	3 600		
K22A	3 950 000	3 400	3 200	0,005	+
	480 000	1 500	6 500		
W28A	1 950 000	2 000	4 000	0,002	+
	2 400 000	4 600	3 400		
H41A	2 770 000	300 000	1 000 000	0,218	[-]
	600 000	150 000	91 000		
H45A	580 000	430	290	0,001	+
	750 000	900	400		
F49A	3 300 000	4 200	900	0,004	+
	304 000	1 280	2 800		
Y51A	4 000 000	15 000	11 000	0,003	+
	2 270 000	6 700	5 700		
R66A	720 000	2 200	4 300	0,004	+
	1 700 000	2 500	6 200		
S115A	2 210 000	500	2 000	0,002	+
	680 000	2 800	1 440		
T116A	2 230 000	3 400	2 500	0,001	+
	1 092 000	1 200	1 260		
L172A	1 100 000	3 800	8 400	0,004	+
	1 500 000	300	400		
S224A	520 000	800	500	0,001	+
	7 000 000	1 600	1 300		
W226A	2 200 000	1 100	1 200	0,003	+
	2 250 000	1 500	1 300		
G248A	1 700 000	1 000	1 100	0,005	+
	2 088 000	1 320	560		
G250A	1 700 000	300	600	0,004	+
	908 000	480	440		
G256A	2 470 000	2 760 000	2 900 000	1,146	-
	2 280 000	3 800 000	1 430 000		
G257A	800 000	2 500	5 000	0,003	+
	2 520 000	2 700	1 300		
G258A	100 000	110 000	100 000	1,025	-
	80 000	90 000	60 000		

H119Δcas6+ pTA927-cas6- FlagN	1 330 000	6 000	6 400	0,003	+
	1 390 000	2 400	1 900		
H119"675"	880 000	780 000	820 000	1,003	-
	2 150 000	4 200 000	520 000		
H119"6875"	1 560 000	1 470 000	1 950 000	1,067	-
	3 930 000	4 210 000	3 940 000		
Stamm	Kontrollplasmid pTA409	Angreiferplasmid pTA409-PAM3	Angreiferplasmid pTA409-PAM9	Durchschnittliche Reduktion der Transformationsrate	Interferenz
H119Δcas6	1 820 000	2 360 000	1 070 000	0,935	-
	2 340 000	2 700 000	1 640 000		
H119"675"+ pTA927-cas3- FlagC	90 000	810 000	670 000	1,211	-
	5 000	5 000	110 000		
H119"6875"+ pTA927-cas3- FlagC	600 000	500	100	0,003	+
	170 000	20	30		

9. CURRICULUM VITAE

Name: Brendel geb. Dierolf
Vorname: Jutta
Geburtsdatum: 01. 12. 1979
Geburtsort: Augsburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung, Hochschulbildung, Ausbildung, Abschlüsse und beruflicher Werdegang:

1986-1990	Grundschule Hochzoll-Süd in Augsburg
1990-1999	Rudolf-Diesel-Gymnasium in Augsburg (neusprachlicher Zweig)
06/1999	Abitur
1999-2000	Studium der Architektur an der Fachhochschule München
2000-2002	Ausbildung zur biologisch-technischen Assistentin an der Berufsfachschule für technische Assistenten der Landesgewerbeanstalt Nürnberg
07/2002	Abschluss zur staatlich geprüften biologisch-technischen Assistentin
2002-2005	Berufstätigkeit als biologisch-technische Assistentin am Adolf-Butenandt-Institut für physiologische Chemie der Ludwigs-Maximilian-Universität München, Abteilung Prof. Dr. Dr. Neupert
2005-2007	Grundstudium der Biologie (Vordiplom) an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
2007-2010	Hauptstudium der Biologie (Diplom) an der Universität Ulm
03/2010-10/2010	Diplomarbeit an der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm, Abteilung Biologie II, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Marchfelder (Thema: „Charakterisierung des CRISPR/Cas-Systems in <i>Haloferax volcanii</i>)
10/2010	Diplom der Biologie
10/2010-01/2014	Doktorarbeit an der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm, Abteilung Biologie II, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Marchfelder

10. PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen:

FISCHER, S., MAIER, L.-K., STOLL, B., BRENDEL, J., FISCHER, E., PFEIFFER, F., DYALL-SMITH, M., MARCHFELDER, A., 2012: An Archaeal Immune System Can Detect Multiple Protospacer Adjacent Motifs (PAMs) to Target Invader DNA. *JBC*, Volume 287, No. 40, [33351-33365].

MAIER, L.K., FISCHER, S., STOLL, B., BRENDEL, J., PFEIFFER, F., DYALL-SMITH, M., MARCHFELDER, A., 2012: The immune system of halophilic archaea. *Mob Gen Elements*, Vol. 2, Iss. 5, [228-232].

MAIER, L.K., STOLL, B., BRENDEL, J., FISCHER, S., PFEIFFER, F., DYALL-SMITH, M., MARCHFELDER, A., 2013: The ring of confidence: a haloarchaeal CRISPR/Cas system. *Biochemical Society Transactions*, Volume 41, part 1, [374-378].

STOLL, B., MAIER, L.K., LANGE, S.J., BRENDEL, J., FISCHER, S., BACKOFEN, R., MARCHFELDER, A., 2013: Requirements for a successful defence reaction by the CRISPR-Cas subtype I-B system. *Biochemical Society Transactions*, Volume 41, part 6, [1444-1448].

BRENDEL, J., STOLL, B., LANGE, S.L., SHARMA, K., LENZ, C., STACHLER, A.E., MAIER, L.K., RICHTER, H., NICKEL, L., SCHMITZ, R.A., RANDAU, L., ALLERS, T., URLAUB, H., BACKOFEN, R., MARCHFELDER, A., 2014: A Complex of Cas Proteins 5,6 and 7 Is Required for the Biogenesis and Stability of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-derived RNAs (crRNAs) in *Haloferax volcanii*. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 298, No. 10, [7164-77].

Vorträge:

Hirschegg Meeting 2011 (14.-17. 03. 2011): „The CRISPR/Cas system of *Haloferax volcanii*“

Archaea Meeting Wiesbaden/Naurod (21.-22. 09. 2011): „CRISPR/Cas with a grain of salt“

Molecular Life Sciences 2011, Frankfurt (25.-28. 09. 2011): “CRISPR/Cas with a grain of salt”

FOR 1680 CRISPR Meeting Würzburg (08.-10. 01. 2012): „CRISPR/Cas with a grain of salt“

Hirschegg Meeting 2012 (18.-22. 03. 2012): „The CRISPR/Cas system in *Haloferax volcanii* – investigation of the processing endonuclease“

Posterpräsentationen:

CRISPR Meeting Wageningen (20.-23. 10. 2010): „The CRISPR/Cas system in *Haloferax volcanii*“ (DIEROLF, J., STOLL, B., MARCHFELDER, A.)

62. Mosbacher Kolloquium (07.-09. 04. 2011): „The CRISPR/Cas-system in *Haloferax volcanii*“. (BRENDEL, J., STOLL, B., FISCHER, S., MAIER, L.K., MARCHFELDER, A.)

Molecular Life Sciences 2011, Frankfurt (25.-28. 09. 2011): „The CRISPR/Cas system in *Haloferax volcanii*“ (BRENDEL, J., STOLL, B., MARCHFELDER, A.)

11. DANKSAGUNG

Aus Datenschutzgründen entfernt

12. ERKLÄRUNG ÜBER DIE IN ANSPRUCH GENOMMENEN HILFEN

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung der Prozessierungs- und Interferenzaktivität des CRISPR/Cas-Systems in *Haloferax volcanii*“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ulm, den _____

(Jutta Brendel)