

**CRISPR-Cas9 induzierte Gen-*Knockouts* von
Enzymen der Riboflavinbiosynthese
in Prokaryoten**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

an der Universität Hamburg
Institut für Lebensmittelchemie, Fachbereich Chemie

vorgelegt von

M. Sc. Alexandra Scharf

Hamburg, 2022

*„Die Wissenschaft geht nicht immer vorwärts.
Es ist ein bisschen wie ein Zauberwürfel. Manchmal musst du mit einem Zauberwürfel mehr
Chaos anrichten, bevor du es richtig machen kannst.“*

Jocelyn Bell Burnell

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2016 bis Februar 2019 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Markus Fischer und der technischen Anleitung von Dr. Boris Illarionov an der Hamburg School of Food Science - Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Markus Fischer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Agnes Weiß

Disputation & Druckfreigabe: 12.05.23

Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Markus Fischer (Vorsitz)

Prof. Dr. Peter Heisig

Prof. Dr. José A.C. Broekaert

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
Zusammenfassung.....	XV
Abstract.....	XVII
1 Einleitung.....	1
2 Theoretische Grundlagen.....	3
2.1 Riboflavin	3
2.1.1 Technologische und wirtschaftliche Bedeutung	5
2.1.2 Die Riboflavinbiosynthese	6
2.1.3 Rolle der HAD-Phosphatasen in der Riboflavinbiosynthese von <i>B. subtilis</i>	12
2.1.4 Bedeutung der Identifizierung der Phosphatasen	14
2.2 Gentechnische Methoden	15
2.2.1 Das CRISPR-Cas System	18
2.2.2 Molekularbiologische Anwendung des CRISPR-Cas9 Systems	22
2.2.3 Mechanismen der Reparatur und Rekombination von DNA in Prokaryoten	25
2.2.4 Besonderheiten bei der Anwendung des CRISPR-Cas9 Systems in Prokaryoten	28
3 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	30
3.1 Vorgehen zur Anwendung der CRISPR-Cas9 Technologie in <i>E. coli</i>	30
3.2 Kombinatorische <i>Knockouts</i> der putativen Phosphatase(n) in <i>B. subtilis</i>	33
4 Ergebnisse und Diskussionen	34
4.1 Etablierung der CRISPR-Cas9 Technologie in <i>E. coli</i>	34
4.1.1 Auswahl geeigneter CRISPR-Cas9 <i>Target</i> -Sequenzen	34
4.1.2 Einbringung der ausgewählten crRNA-Sequenzen zur Herstellung der Plasmide pTargetF- <i>ribA</i> , pTargetF- <i>ribB1/B2</i> , pTargetF- <i>ribC1/C2</i>	36
4.1.3 Konstruktion der <i>Donor-Templates</i> für die <i>Knockouts</i> von RibA, RibB und RibC.....	40
4.1.4 Auswahl der Transformationsmethode zur Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> - und <i>E. coli</i> (pCas)-Zellen und Expression der Lambda Red Gene	44

4.1.5	Genom Editierung mittels CRISPR-Cas9 und Selektion der Mutanten	46
4.1.5.1	Optimierung des CRISPR-Cas9-Events in <i>E. coli</i> BL21(DE3) anhand des <i>Knockouts</i> der GTP-Cyclohydrolase II (RibA).....	46
4.1.5.2	CRISPR-Cas9 induzierte <i>Knockouts</i> der Riboflavinsynthese (RibC) und der Riboflavin-Mutase (RibB)	54
4.1.6	Diskussion der Bedeutung effizienter crRNAs für die CRISPR-Cas9 vermittelte Genom Editierung in Prokaryoten.....	62
4.2	Einzelne und kombinatorische <i>Knockouts</i> von putativen Phosphatasen der Riboflavinbiosynthese in <i>B. subtilis</i>	66
4.2.1	Auswahl der CRISPR-Cas9 <i>Target</i> -Sequenzen	66
4.2.2	Einbringung der ausgewählten crRNA-Sequenzen zur Herstellung der Plasmide pJOE8999-ycsE, pJOE8999-yitU und pJOE8999-ywtE und Optimierung der SDM-PCR	67
4.2.3	Konstruktion der <i>Donor-Templates</i> für die <i>Knockouts</i> von YcsE, YitU und YwtE und Klonierung der <i>Donor-Templates</i> in die pJOE8999-Plasmide	69
4.2.4	Herstellung und Elektroporation kompetenter <i>B. subtilis</i> -Zellen unter optimierten Bedingungen.....	71
4.2.5	CRISPR-Cas9 induzierte <i>Knockouts</i> in <i>B. subtilis</i> und Selektion der Mutanten.....	73
4.2.5.1	Einzeldeletionsmutanten	73
4.2.5.2	Multideletionsmutanten.....	80
4.2.6	Vergleich der Erfolgsquoten der angewandten CRISPR-Cas9 Methoden in <i>B. subtilis</i> und in <i>E. coli</i>	82
4.2.7	Gesamtgenomsequenzierungen zur Analyse von <i>On-Target</i> - und <i>Off-Target</i> Mutationen	84
4.2.7.1	Nachweis der <i>On-Target</i> Mutationen.....	85
4.2.7.2	Identifizierung möglicher <i>Off-Target</i> Mutationen.....	88
4.2.8	Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutanten	89
4.2.8.1	Untersuchung der Deletionsmutanten auf eine Riboflavin-Auxotrophie	89
4.2.8.2	Bestimmung der Wachstumszeiten in Flüssigmedium	90
4.2.8.3	Morphologische Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskopie	92
4.2.9	Bestimmung der bakteriellen Riboflavin-Produktionsraten mittels ELISA ..	92
4.2.10	Diskussion der Rolle von YcsE, YitU und YwtE sowie weiterer HAD-Phosphatasen in der Riboflavinbiosynthese.....	96
4.3	Weitere Ergebnisse dieser Doktorarbeit	99
5	Ausblick	101
6	Experimenteller Teil: Materialien	105
6.1	Chemikalien, Puffer, Kits, Reagenzien und Materialien	105

6.2	Geräte	105
6.3	Software	105
6.4	Bakterienstämme	106
6.5	Plasmide	107
6.6	Primer und DNA-Größenmarker	108
6.7	CRISPR-Cas9 <i>Target</i> -Sequenzen	109
6.8	DNA-Sequenzen der <i>Donor-Templates</i>	109
6.9	Medien/Medienzusätze und (Selektiv)-Agarplatten.....	109
7	Experimenteller Teil: Methoden	112
7.1	Mikrobiologische Methoden	112
7.1.1	Anzuchtverhalten und Stammhaltung.....	112
7.1.2	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen und Elektroporation.....	113
7.1.3	Herstellung elektrokompetenter <i>B. subtilis</i> -Zellen und Elektroporation ...	114
7.1.4	Anzucht, Zellernte und Aufschluss von <i>B. subtilis</i> Zellen zur Bestimmung der intra- und extrazellulären Riboflavingehalte	115
7.1.5	Wachstumstests der Deletionsmutanten auf Agaroseplatten.....	116
7.2	Molekularbiologische Methoden.....	117
7.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	117
7.2.2	Aufreinigung von DNA aus präparativen PCR-Ansätzen, Restriktionsverdau und Ligation	117
7.2.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	117
7.2.4	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	117
7.2.4.1	Photometrische Absorptionsmessung	118
7.2.4.2	Fluorometrische Emissionsmessung.....	118
7.2.5	Sequenzspezifische Restriktion von Plasmid-DNA	118
7.2.6	Ligation von Plasmid-DNA.....	119
7.2.7	Methoden der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	121
7.2.7.1	Kolonie-PCR.....	121
7.2.7.2	Präparative PCR zur Amplifizierung genomischer Bakterien- DNA	122
7.2.7.3	Präparative PCR zur Herstellung des crRNA/tracrRNA- <i>Inserts</i> .	124
7.2.7.4	<i>Side-directed mutagenesis</i> (SDM)-PCR.....	125
7.2.7.5	<i>Overlap-extension</i> (OE)-PCR	128
7.2.8	Agarosegelelektrophorese (AGE).....	131
7.2.9	Genom Editierung mittels CRISPR-Cas9	132
7.2.9.1	Genom Editierung in <i>E. coli</i>	132
7.2.9.2	Genom Editierung in <i>B. subtilis</i>	133

7.2.10 SANGER-Sequenzierung	134
7.2.11 <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS) und Datenprozessierung	134
7.2.12 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	135
7.3 Bildgebende Verfahren	136
7.4 Bioinformatische Methoden.....	136
Literaturverzeichnis	137
Eigene Veröffentlichungen.....	157
Anhang.....	158
Anhangverzeichnis	158
Danksagung.....	194
Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Eidesstattliche Versicherung	195

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturformeln von Riboflavin, FMN und FAD	4
Abbildung 2:	Darstellung der Riboflavinbiosynthese in <i>B. subtilis</i> und <i>E. coli</i>	8
Abbildung 3:	Genkarte des <i>rib</i> -Operons von <i>B. subtilis</i>	10
Abbildung 4:	Lokalisation der Riboflavin-Biosynthese Gene auf dem <i>E. coli</i> -Chromosom.....	11
Abbildung 5:	Position des <i>rib</i> -Operons und der HAD-Phosphatasen YcsE, YitU und YwtE auf dem Genom von <i>B. subtilis</i>	13
Abbildung 6:	Zeitlicher Überblick über die Entwicklung von gentechnischen Methoden...	15
Abbildung 7:	Schematische Darstellung eines CRISPR-Locus.....	18
Abbildung 8:	Ablauf der adaptiven Immunabwehr beim Typ II CRISPR-Cas9 System aus <i>S. pyogenes</i>	20
Abbildung 9:	Chimäre sgRNA bestehend aus der <i>Target</i> -komplementären crRNA und der tracrRNA.	22
Abbildung 10:	Induktion eines CRISPR-Cas9 vermittelten DNA-Doppelstrangbruches und Generierung anschließender genetischer Veränderungen unter zu Hilfeahme der zelleigenen Reparatur- und Rekombinationsprozesse	24
Abbildung 11:	Schematische Darstellung der Funktionsweise der Homologen Rekombination (HR) und des <i>non-homologous end joinings</i> (NHEJ) bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen bzw. bei der Rekombination von DNA	27
Abbildung 12:	Ablaufschema zur Anwendung der CRISPR-Cas9 Technologie in <i>E. coli</i> ...	31
Abbildung 13:	crRNA-Sequenzen (hier sgRNA <i>sequence</i>) für den <i>Knockout</i> der Enzyme RibA, RibB und RibC, welche mit Hilfe des CRISPR-ERA Online-Tools und unter den oben aufgeführten Bedingungen ausgewählt wurden.	36
Abbildung 14:	Elektropherogramm zur Überprüfung des Einbaus des crRNA/tracrRNA-Inserts in das Plasmid pTargetF- <i>ribA</i> mittels Kolonie-PCR.....	37
Abbildung 15:	Elektropherogramme der mittels SDM-PCR modifizierten, linearen Plasmid-DNA von pTargetF- <i>ribB1/ribB2</i> und pTargetF- <i>ribC1/ribC2</i>	39
Abbildung 16:	Elektropherogramme der mittels OE-PCR synthetisierten <i>Donor-Templates</i> DTribA, DTribB und DTribC.....	44
Abbildung 17:	<i>Target</i> -Sequenz und resultierende crRNA für den <i>Knockout</i> von <i>ribA</i>	49
Abbildung 18:	Überlebende Transformanten nach dem CRISPR-Cas9-Event zum <i>Knockout</i> von <i>ribA</i>	51
Abbildung 19:	Wachstumstest einiger Kolonien nach dem CRISPR-Cas9-Event mit pTargetF- <i>ribA</i> -G (A) und anschließende Untersuchung der Riboflavin-auxotrophen Kolonien in der Kolonie-PCR (B).....	52
Abbildung 20:	<i>Alignments</i> der <i>ribA</i> -Gensequenzen (A) sowie der Aminosäuresequenzen (B) des BL21(DE3)-Wildtyp-Stammes (Annotationsnummer: ACT43142.1) und der <i>ribA</i> -Mutante.....	53
Abbildung 21:	Überlebende Transformanten nach dem CRISPR-Cas9-Event zum <i>Knockout</i> von <i>ribC</i>	55

Abbildung 22: Wachstumstests einiger Kolonien nach den CRISPR-Cas9-Events mit pTargetF- <i>ribC2</i> (A) und pTargetF- <i>ribB1</i> und anschließende Untersuchung der Riboflavin-auxotrophen Kolonien in der Kolonie-PCR (B und D).....	57
Abbildung 23: <i>Alignments</i> der <i>ribC</i> -Gensequenzen (A) sowie der Aminosäuresequenzen (B) des BL21(DE3)-Wildtyp-Stammes (Annotationsnummer: ACT43491.1) und der <i>ribC</i> -Mutante.....	59
Abbildung 24: <i>Alignments</i> der <i>ribB</i> -Gensequenzen (A) sowie der Aminosäuresequenzen (B) des BL21(DE3)-Wildtyp-Stammes (Annotationsnummer: ACT44717.1) und der <i>ribB</i> -Mutante.....	61
Abbildung 25: crRNA-Sequenzen (hier sgRNA <i>sequence</i>) für die <i>Knockouts</i> der Enzyme YcsE, YitU und YwtE, die mit Hilfe des CRISPR-ERA Online-Tools und unter den oben aufgeführten Bedingungen ausgewählt wurden .67	
Abbildung 26: Elektropherogramme der mittels SDM-PCR generierten, linearen Plasmid-DNA von pJOE8999- <i>ycsE</i> (A) und der mittels modifizierter SDM-PCR erzeugten Plasmid-DNA von pJOE8999- <i>yitU</i> und pJOE8999- <i>ywtE</i> (B).....	69
Abbildung 27: Elektropherogramme der mittels OE-PCR synthetisierten <i>Donor-Templates</i> DT <i>ycsE</i> , DT <i>yitU</i> und DT <i>ywtE</i>	71
Abbildung 28: Nachweis der CRISPR-Cas9 induzierten <i>Knockouts</i> von <i>ycsE</i> , <i>yitU</i> und <i>ywtE</i> in <i>B. subtilis</i>	75
Abbildung 29: <i>Alignments</i> der <i>ycsE</i> -Gensequenzen (A) sowie der Aminosäuresequenzen (B) des <i>B. subtilis</i> NIG1121-Wildtyp-Stammes (Annotationsnummer: AIY91687.1) und der <i>ycsE</i> -Mutante.....	77
Abbildung 30: <i>Alignments</i> der <i>yitU</i> -Gensequenzen (A) sowie der Aminosäuresequenzen (B) des <i>B. subtilis</i> NIG1121-Wildtyp-Stammes (Annotationsnummer: AIY92396.1) und der <i>yitU</i> -Mutante.....	78
Abbildung 31: <i>Alignments</i> der <i>ywtE</i> -Gensequenzen (A) sowie der Aminosäuresequenzen (B) des <i>B. subtilis</i> NIG1121-Wildtyp-Stammes (Annotationsnummer: AIY94900.1) und der <i>ywtE</i> -Mutante.....	79
Abbildung 32: Ablaufschema zur kombinatorischen Erzeugung der Multideletionsmutanten	80
Abbildung 33: Nachweis der CRISPR-Cas9 induzierten <i>Knockouts</i> in <i>B. subtilis</i> zur Herstellung der Doppeldelentionsmutanten $\Delta ycsE/\Delta ywtE$, $\Delta ycsE/\Delta yitU$ und $\Delta ywtE/\Delta yitU$ (A) sowie der Tripledeletionsmutante $\Delta ycsE/\Delta ywtE/\Delta yitU$ (B) .81	
Abbildung 34: Visualisierung der CRISPR-Cas9 induzierten <i>On-Target</i> Mutation im <i>ycsE</i> -Gen der Triplemutante mittels IGV-Software	86
Abbildung 35: Visualisierung der CRISPR-Cas9 induzierten <i>On-Target</i> Mutationen im <i>yitU</i> -Gen (A) und im <i>ywtE</i> -Gen (B) der Triplemutante mittels IGV-Software	87
Abbildung 36: Wachstumstest der Triplemutante auf M9-Minimal-Agar (links) und LB-Agar (rechts).....	90
Abbildung 37: Bestimmung der intrazellulären Riboflavinkonzentrationen des <i>B. subtilis</i> Wildtypen und der Deletionsmutanten mittels ELISA.....	94
Abbildung 38: PeqGOLD DNA-Leiter Mix in einem Größenbereich von 100-10.000 bp (Peqlab Biotechnologie GmbH).....	108
Abbildung 39: Vektorkarte von Plasmid pCas	167
Abbildung 40: Vektorkarte von Plasmid pTargetF	168

Abbildung 41:	Vektorkarte von Plasmid pJOE8999	169
Abbildung 42:	Elektropherogramme des pTargetF- <i>ribA</i> -Screenings nach CRISPR-Cas9-Event.....	181
Abbildung 43:	Elektropherogramme des pCas-Screenings nach CRISPR-Cas9-Event ...	181
Abbildung 44:	Elektropherogramme der Kolonie-PCRs im Anschluss an die CRISPR-Cas9-Events zum <i>Knockout</i> von <i>ycsE</i> (A), <i>yitU</i> (B) bzw. <i>ywtE</i> (C).....	182
Abbildung 45:	Schematische Darstellung der SDM-PCR-Reaktion zur Herstellung der Plasmide pTargetF- <i>ribB1/B2</i> und pTargetF- <i>ribC1/C2</i>	183
Abbildung 46:	Schematische Darstellung der SDM-PCR-Reaktion zur Herstellung der Plasmide pJOE8999- <i>ycsE</i> , pJOE8999- <i>yitU</i> und pJOE8999- <i>ywtE</i>	184
Abbildung 47:	Schematische Darstellung der OE-PCR	185
Abbildung 48:	Sekundärstruktur-Vorhersage für die crRNA-Sequenz <i>ribC1</i>	186
Abbildung 49:	Wachstumskurve von <i>B. subtilis</i> NIG1121 bei 30 °C in LB-Medium	187
Abbildung 50:	Darstellung der Sequenzabdeckung (<i>coverage</i>) des Genoms des <i>B. subtilis</i> Wildtypstammes (oranger Kreis) und der Tripledeletionsmutante (grüner Kreis) in Form eines Circos Plots	190
Abbildung 51:	Visualisierung des mittels BCFtools und IGV-Software identifizierten SNPs im <i>yjaZ</i> -Gen der Triplemutante	191
Abbildung 52:	REM-Aufnahmen des LEO 1525 Gemini (23 000 bis 50 000-fache Vergrößerung).....	192
Abbildung 53:	Standardkurve und Messwerte der Zellpellets im Riboflavin-ELISA.	193

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht der Nomenklatur der Riboflavinbiosynthese-Gene in <i>B. subtilis</i>9
Tabelle 2:	Übersicht der Nomenklatur der Riboflavinbiosynthese-Gene in <i>E. coli</i>9
Tabelle 3:	Auswahl von HAD-Enzymen, welche die Dephosphorylierung von ARPP katalysieren. 12
Tabelle 4:	Überblick über die kinetischen Kenndaten der HAD-Phosphatasen YcsE, YitU und YwtE in <i>B. subtilis</i> (modifiziert nach Sarge et al. 2015b). 14
Tabelle 5:	Überblick über die geplanten CRISPR-Cas9 induzierten Deletionen in den Riboflavinbiosynthese-Genen in <i>E. coli</i> BL21(DE3) (NCBI-Zugangsnummer: CP001509.3) und Design der entsprechenden <i>Donor-Templates</i> 43
Tabelle 6:	Merkmale der für die Genom Editierung in <i>E. coli</i> verwendeten crRNA-Sequenzen 64
Tabelle 7:	Überblick über die geplanten CRISPR-Cas9 induzierten Deletionen für die <i>Knockouts</i> der putativen Phosphatasen der Riboflavinbiosynthese in <i>B. subtilis</i> NIG1121 (NCBI-Zugangsnummer: CP010052.1) und Design der entsprechenden <i>Donor-Templates</i> 70
Tabelle 8:	Merkmale der für die Genom Editierung in <i>B. subtilis</i> verwendeten crRNA-Sequenzen 83
Tabelle 9:	Wachstumszeiten [h:min] der <i>B. subtilis</i> -Stämme in M9-Minimal-Medium...91
Tabelle 10:	Überblick über die kinetischen Kenndaten der 14 rekombinant exprimierten und im Phosphatetest analysierten HAD-Phosphatasen aus <i>B. subtilis</i> (modifiziert nach Sarge et al. 2015b) 97
Tabelle 11:	Verwendete Software. 105
Tabelle 12:	Verwendete Bakterienstämme. 106
Tabelle 13:	Plasmide..... 107
Tabelle 14:	Ausgewählte crRNAs und ihre jeweiligen <i>Target</i> -Sequenzen..... 109
Tabelle 15:	Für die Kultivierung, Transformation und Lagerung von Bakterien verwendete Medien, Medienzusätze und (Selektiv)-Agarplatten. 110
Tabelle 16:	Restriktionsansatz für die Zirkularisierung der Plasmid-DNA von pTargetF und pJOE8999 nach der SDM-PCR. 119
Tabelle 17:	Restriktionsansätze der pJOE8999-Plasmide und der <i>Donor-Templates</i> für die Klonierung. 119
Tabelle 18:	Restriktionsansätze für das Plasmid pTargetF und das crRNA/tracrRNA- <i>Insert</i> für die Klonierung. 119
Tabelle 19:	Ligationsansatz für die Zirkularisierung der Plasmid-DNA von pTargetF und pJOE8999 nach der SDM-PCR..... 120
Tabelle 20:	Ligationsansatz für die Insertion der <i>Donor-Templates</i> in die pJOE8999-Plasmide..... 120
Tabelle 21:	Ligationsansatz für die Insertion des crRNA/tracrRNA- <i>Inserts</i> in das Plasmid pTargetF 120
Tabelle 22:	Mastermix der Kolonie-PCR. 122
Tabelle 23:	Temperaturprogramm der Kolonie-PCR. 122

Tabelle 24:	Mastermix der präparativen PCR.	123
Tabelle 25:	Temperaturprogramm der präparativen PCR.	123
Tabelle 26:	Mastermix der ersten PCR-Reaktion.	125
Tabelle 27:	Mastermix der zweiten PCR-Reaktion.	125
Tabelle 28:	Temperaturprogramm der ersten und zweiten PCR-Reaktion.	125
Tabelle 29:	Mastermix der ersten SDM-PCR.	126
Tabelle 30:	Mastermix der zweiten SDM-PCR.	127
Tabelle 31:	Verwendete Primerpaare für die SDM-PCR.	127
Tabelle 32:	Temperaturprogramm der ersten und zweiten SDM-PCR.	127
Tabelle 33:	Verwendete Primerpaare für die OE-PCR-Reaktionen 1A und 1B.	128
Tabelle 34:	Mastermix der OE-PCR-Reaktionen 1A und 1B.	129
Tabelle 35:	Temperaturprogramm der OE-PCR 1A und 1B.	129
Tabelle 36:	Mastermix der zweiten OE-PCR-Reaktion.	130
Tabelle 37:	Temperaturprogramm der zweiten OE-PCR-Reaktion vor Zugabe der Primer.	130
Tabelle 38:	Temperaturprogramm der zweiten OE-PCR-Reaktion nach Zugabe der Primer.	131
Tabelle 39:	Verzeichnis der verwendeten Chemikalien.	160
Tabelle 40:	Definition der GHS-Symbole in Tabelle 39.	161
Tabelle 41:	Verwendete Lösungen und Puffer.	162
Tabelle 42:	Verwendete Kits.	163
Tabelle 43:	Weitere verwendete Reagenzien und Materialien.	163
Tabelle 44:	Verzeichnis der verwendeten Geräte.	165
Tabelle 45:	Verzeichnis der verwendeten Primer.	170
Tabelle 46:	Verzeichnis der DNA-Sequenzen der in dieser Arbeit hergestellten <i>Donor-Templates</i>	175
Tabelle 47:	Autoklavierbedingungen der verwendeten Autoklavierprogramme.	178
Tabelle 48:	Elektroporationseffizienz der elektrokompent hergestellten <i>B. subtilis</i> - Zellen unter Anwendung einer elektrischen Feldstärke von 17 kV/cm bzw. 20 kV/cm.	188
Tabelle 49:	Protokoll zur Herstellung und Transformation elektrokompenter Zellen unter Einsatz osmoprotektiver Substanzen und hoher elektrischer Feldstärken.	189
Tabelle 50:	Einfluss verschiedener Zellhüllen-schwächender Additive im Wachstumsmedium auf die Elektroporationseffizienz von <i>B. subtilis</i> NIG1121.	189

Abkürzungsverzeichnis

(GC)-Gehalt.....	Guanin-Cytosin-Gehalt
(OE)-PCR.....	<i>Overlap-Extension</i> PCR
<i>A. gossypii</i>	<i>Ashbya gossypii</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AcCoA.....	Acetylcoenzym A
AMP.....	Adenosinmonophosphat
ARP.....	5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-pyrimidindion
ARPP.....	5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-pyrimidindion-5' phosphat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BW.....	Blindwert
Cas.....	<i>CRISPR-associated</i>
cfu.....	<i>colony forming units</i> ; Kolonien bildende Bakterieneinheiten
CRISPR.....	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
crRNA.....	CRISPR-RNA
DNA-POL	DNA-Polymerase
dsDNA.....	<i>double stranded</i> DNA; doppelsträngige DNA
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DT.....	<i>Donor-Template</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-Score	Effizienz-Score
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN.....	Flavinmononukleotid
fw.....	<i>forward</i> ; vorwärts
GNAT	GCN5-assoziierten N-Acetyltransferase
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i> ; generell als sicher eingestuft
GTP.....	Guanosintriphosphat
GVOs.....	Gentechnisch Veränderte Organismen
HAD.....	Haloacid Dehalogenase
HPLC-FLD.....	<i>High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection</i>
HR	Homologe Rekombination
IAP.....	Intestinale Alkalische Posphatase
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LBS-Medium.....	LB-Sorbitol-Medium
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>

<i>M. liparidae</i>	<i>Mycoplasma liparidae</i>
MFE.....	Minimale Freie Energie
mRNA.....	<i>Messenger-RNA</i>
Mutase.....	3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphatsynthase
NGS.....	<i>Next Generation Sequencing</i>
NHEJ.....	<i>Non-Homologous End Joining</i> ; nicht homologe Verknüpfung von DNA-Enden
OgM.....	Oligonukleotid gerichtete Mutagenese
ORFs.....	<i>Open Reading Frames</i> ; offene Leserahmen
ori.....	<i>origin of replication</i> ; Replikationsursprung
PAM.....	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
PCR.....	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
r.....	<i>reverse</i> ; rückwärts
REM.....	Rasterelektronenmikroskopie
RFLP.....	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RFN-Element.....	Riboflavin Nukleotid Element
<i>rib</i> -Gene.....	Riboflavin-Gene
RVD.....	<i>Repeat-Variable Diresidue</i> ; hochvariable Aminosäurereste
SDM-PCR.....	<i>Site Directed Mutagenesis PCR</i> ; Ortsgerichtete Mutagenese-PCR
SDN.....	<i>Side Directed Nucleases</i> ; ortsspezifische Nucleasen
sgRNA.....	<i>single guide RNA</i>
siRNAs.....	<i>small interfering RNA</i>
SNP.....	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ; Einzelbasenaustausch
<i>S-Score</i>	Spezifitäts-Score
ssDNA.....	<i>single stranded DNA</i> ; einzelsträngige DNA
TAE.....	TRIS-Acetat-EDTA
TALENs.....	<i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>
TE.....	Tris-EDTA
tracrRNA.....	<i>trans-activating crRNA</i>
TSS.....	Transkriptionsstartstelle
WGS.....	<i>Whole Genome Sequencing</i> ; Gesamtgenomsequenzierung
WT.....	Wildtyp
ZF.....	Zinkfinger
ZFNs.....	<i>Zinc Finger Nucleases</i> ; Zinkfingernucleasen

Des Weiteren wurden das internationale Einheitensystem (SI-Einheiten) laut Veröffentlichung der IUPAC verwendet (IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry)

Zusammenfassung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Entdeckung von drei HAD-Phosphatasen im Bakterium *B. subtilis*, die vermutlich den *Missing Link* in der Riboflavinbiosynthese katalysieren.

Um die Rolle dieser HAD-Phosphatasen in der Riboflavinbiosynthese zu bestätigen, war es das Ziel, alle möglichen einzelnen und kombinatorischen *Gen-Knockouts* der drei Enzyme in *B. subtilis* zu erzeugen und die erhaltenen Deletionsmutanten anschließend auf eine Riboflavin-Auxotrophie zu testen. Diese umfangreichen *Gen-Knockouts* sollten unter Anwendung der CRISPR-Cas9 Technologie durchgeführt werden, welche hierfür zunächst im Arbeitskreis etabliert werden musste.

Insgesamt wurden zwei verschiedene CRISPR-Cas9 Methoden zur Genom Editierung von Bakterien ausgewählt, um diese auf die in unserem Arbeitskreis genutzten Stämme *E. coli* BL21(DE3) und *B. subtilis* NIG1121 zu adaptieren. Die beiden etablierten CRISPR-Cas9 Methoden zeigten teilweise deutliche Unterschiede in ihrer Leistungsfähigkeit: Zwar konnten unter Anwendung von beiden Methoden hohe Mutationseffizienzen (ca. 60-75%) erzielt werden, jedoch wurden für *E. coli* BL21 deutliche Schwächen bzgl. der Erfolgsquote (lediglich 50% erfolgreiche CRISPR-Cas9-Events) festgestellt. Demgegenüber waren alle in *B. subtilis* durchgeführten CRISPR-Cas9-Events erfolgreich. Die unterschiedlichen Beobachtungen bzgl. der Leistungsfähigkeiten der CRISPR-Cas9 Methoden in dieser Arbeit sowie die in der Literatur beschriebenen Schwierigkeiten in Bezug auf die Anwendung des CRISPR-Cas Systems in einigen Prokaryoten zeigen eindrücklich, dass weitere Studien notwendig sein werden, um umfangreiche Kenntnisse über die möglichen Einflussfaktoren zu gewinnen und eine breite Anwendung der CRISPR-Cas Technologie in industriell bzw. biomedizinisch relevanten Bakterienstämmen zu ermöglichen.

Mit Hilfe der auf *B. subtilis* NIG1121 erfolgreich adaptierten CRISPR-Cas9 Methode konnten sowohl alle drei Einzeldelentionsmutanten der HAD-Phosphatasen als auch die verschiedenen Kombinationen der jeweiligen Doppeldelentionsmutanten sowie eine Tripledelenionsmutante molekularbiologisch erzeugt werden. Die anschließende phänotypische Charakterisierung der Klone ergab, dass alle sieben *Knockout*-Mutanten – auch die Tripledelenionsmutante – weiterhin in der Lage waren, ohne eine exogene Riboflavinquelle zu wachsen, was darauf hindeutet, dass es weitere Phosphatasen geben muss, welche diese Reaktion mit nennenswerten Raten katalysieren können.

Mittels eines kompetitiven ELISAs wurden die intrazellulären Riboflavinkonzentrationen der jeweiligen *Knockout*-Klone im Vergleich zum initialen *B. subtilis* Stamm bestimmt. Während die Einzeldelentionsmutanten und zwei der Doppeldelentionsmutanten eine Abnahme der intrazellulären Riboflavinkonzentrationen um 34 bis 52% zeigten, wiesen eine Doppelmutante und die Tripledeletionsmutante eine weitere Abnahme mit Ergebnissen unterhalb der Bestimmungsgrenze auf.

Im Zusammenhang mit den biochemischen Untersuchungen der Deletionsmutanten wurden zudem Effekte beobachtet, welche denen einer positiven Epistasie ähneln und evtl. den Verlust der Enzymaktivitäten, der drei HAD-Phosphatasen kompensiert haben. Auch eine mögliche Riboswitch-vermittelte Genregulation wird im Zuge der vorliegenden Ergebnisse diskutiert.

Abstract

The initial point of this work was the discovery of three HAD phosphatases in the bacterium *B. subtilis* which are assumed to catalyse the missing link in riboflavin biosynthesis.

To confirm the role of those HAD phosphatases in riboflavin biosynthesis the aim was to generate all possible single and combinatorial gene knockouts of the three enzymes in *B. subtilis* and subsequently testing the resulting deletion mutants for riboflavin auxotrophy. These comprehensive gene knockouts should be realised using the CRISPR-Cas9 technology, which first had to be implemented in our working group.

Altogether, two different CRISPR-Cas9 methods for bacterial genome editing were selected for adaptation to the strains *E. coli* BL21(DE3) and *B. subtilis* NIG1121 which were used in our working group. The two established CRISPR-Cas9 methods revealed some clear differences in their performance: although high mutation efficiencies (approx. 60-75%) could be achieved using both methods, considerable shortcomings were found for *E. coli* BL21 regarding the success rate (only 50% successful CRISPR-Cas9 events). In contrast, all CRISPR-Cas9 events performed in *B. subtilis* were successful. The different findings regarding the performance of CRISPR-Cas9 methods in this work, as well as the challenges described in the literature with respect to the application of the CRISPR-Cas system in some procaryotes, impressively show that further studies will be necessary to provide comprehensive knowledge about the possible influence factors and to allow the broad application of the CRISPR-Cas technology in industrially or biomedically relevant bacterial strains.

With the help of the CRISPR-Cas9 method, which was successfully adapted to *B. subtilis* NIG1121, all three single deletion mutants of the HAD phosphatases as well as the combinations of the respective double deletion mutants and a triple deletion mutant could be genetically generated. Subsequent phenotypic characterisation of the clones revealed that all seven knockout mutants - even the triple deletion mutant - were still able to grow without an exogenous riboflavin source, suggesting that there must be other phosphatases capable of catalysing this reaction at appreciable rates.

By means of a competitive ELISA, the intracellular riboflavin concentrations of the respective knockout clones were determined in comparison to the initial *B. subtilis* strain. While the single deletion mutants and two of the double deletion mutants showed a decrease in intracellular riboflavin concentrations from 34 to 52%, one double mutant and the triple deletion mutant showed a further decrease with results below the limit of quantification.

In the context with the biochemical investigations of the deletion mutants, we also observed effects comparable to those of positive epistasis, which may have compensated the loss of the enzyme activities of the three HAD phosphatases. A possible riboswitch-mediated gene regulation is also discussed together with the present results.

1 Einleitung

Die Aufklärung von Biosynthesewegen in Bakterien und die Identifizierung aller daran beteiligter Enzyme und Regulationsmechanismen können wertvolle, wissenschaftliche Einblicke in komplexe Stoffwechselwege gewähren. Darüber hinaus können die aus den Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse in einigen Fällen für die Produktion bzw. zur Optimierung der Produktion von biotechnologisch hergestellten Rohstoffen genutzt werden. So werden heutzutage eine Vielzahl an Vitaminen (u.a. Vitamin B₁₂, Vitamin C), Arzneimitteln (u.a. Insulin, therapeutische Antikörper), kosmetischen Inhaltsstoffen (u.a. Hyaluronsäure) und Lebensmittelzusatzstoffen (u.a. Glutamat, Cystein und Aspartam) mit Hilfe von Fermentationsprozessen durch Mikroorganismen gewonnen (Baeshen et al., 2014; Kinoshita et al., 1957; Luo et al., 2016; Sunguroğlu et al., 2018). Auch Riboflavin wird seit vielen Jahren durch Fermentation mit u.a. rekombinant veränderten *Bacillus subtilis*-Stämmen produziert (Perkins et al., 1999) und eine weitere Optimierungen bzgl. der Effizienz der Riboflavin Produktion ist angesichts der stetig steigenden Nachfrage von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit liegt im Bereich der Medizin: Sind einzelne Stoffwechselschritte bekannt, welche allein für Bakterien essenziell sind, so können diese als *Targets*, zur Inhibierung pathogener Organismen genutzt werden (Neu, 1992). Als Beispiel können hier Antibiotika aus der Gruppe der Sulfonamide genannt werden, welche die Dihydropteroat-Synthase (DHPS) im Folsäure-Stoffwechselweg von Bakterien inhibieren (Connor, 1998).

Die Biosynthese von Riboflavin wird bereits seit mehr als drei Jahrzehnten intensiv erforscht. Ungeachtet dessen, sind jedoch bis heute nicht alle an der Biosynthese beteiligten Enzyme bekannt. Bei dem „*Missing Link*“ handelt es sich um eine unbekannte Phosphatase, welche die essenzielle Dephosphorylierung von 5-Amino-6-Ribityl-amino-2,4(1*H*,3*H*)-Pyrimidindion 5'-Phosphat (ARPP) in der Riboflavinbiosynthese katalysiert (Perkins et al., 1999). Neben den bereits aufgeführten Möglichkeiten, welche sich durch die Aufklärung dieses Reaktionsschrittes ergeben könnten, besteht vor allem ein wissenschaftliches Interesse daran, diesen letzten Schritt der Biosynthese zu entschlüsseln (Bacher & Lingens, 1970; Sa et al., 2016).

In den letzten Jahren wurden innerhalb unserer Forschungsgruppe mehrere Kandidaten-Enzyme in den Bakterien *Escherichia coli* und *B. subtilis* entdeckt, welche in der Lage waren die Hydrolyse von ARPP *in-vitro* zu katalysieren (Haase et al., 2013; Sarge et al., 2015b). Parallel hierzu wurden von Sa et al. (2016) in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* ebenfalls mehrere Phosphatasen identifiziert, welche ARPP dephosphorylieren.

In weiterführenden Arbeiten hatten wir bereits nachgewiesen, dass einzelne *Knockouts* der identifizierten Phosphatase-Gene *yigb* und *ybjl* (in *E. coli*) und *yceE* (in *B. subtilis*) zu keiner Riboflavin-Auxotrophie führten (Haase et al., 2013; Sarge et al., 2015b). Ebenso wurde in der Studie von Sa et al. (2016) beschrieben, dass einzelne Mutationen bzw. Herabregulierungen des Transkriptniveaus der identifizierten Phosphatasen PyrP1 und PyrP2 in *A. thaliana*, zu keiner Veränderung des Wachstums (PyrP1) bzw. lediglich zu einer Verlangsamung des Wachstums und zu einem reduzierten Flavin-Gehalt (PyrP2), nicht jedoch zu einer vollständigen Riboflavin-Abhängigkeit der Pflanzen führten.

Eine im Jahre 2017 veröffentlichte Studie, hatte alle 98 Klone einer 3970 Einzelgendeletionen umfassenden *B. subtilis* Bibliothek, welche einen *Knockout* in einem noch unbekanntem Gen aufwies mit Hilfe eines Wachstumstests in Minimalmedium (enthält nur die zum Wachstum von *B. subtilis* notwendigen Nährstoffe) auf eine Auxotrophie untersucht. Mit Ausnahme einer Phosphatase, welche in der Studie als Serin-Biosyntheseenzym identifiziert wurde, waren keine weiteren unbekanntem Phosphatasen unter den auxotrophen Mutanten gefunden worden (Koo et al., 2017). Diese Befunde sowie die Gegebenheit, dass in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Fischer neben YceE in einem Phosphatasetest weitere Phosphatasen mit einer hohen enzymatischen Aktivität gegenüber ARPP identifiziert werden konnten (YitU und YwtE aus *B. subtilis*; Sarge et al., 2015b), implizieren, dass mehrere Enzyme den „*Missing Link*“ der Riboflavinbiosynthese katalysieren müssen und daher neben einzelnen Gen-Deletionen kombinatorische Gen-*Knockouts* notwendig sind, um die Rolle von YceE, YitU und YwtE in der Riboflavinbiosynthese von *B. subtilis* zu klären.

Eine geeignete Methode, um präzise genetische Veränderungen in Organismen einzuführen, stellt das im Jahre 2012 erstmalig als gentechnische Methode beschriebene CRISPR-Cas9 System dar (Jinek et al., 2012). Die CRISPR-Cas Technologie hat den Vorteil, dass sie neben seiner einfachen und kostengünstigen Anwendbarkeit eine große Flexibilität sowie eine hohe Spezifität aufweist. Zudem ist es mit Hilfe dieser Technik prinzipiell möglich, mehrere Gene in einem Genom gleichzeitig zu editieren (Wilkinson & Wiedenheft, 2014). Obwohl das CRISPR-Cas System ursprünglich aus Bakterien stammt, wurde es bisher vor allem zur Genom Editierung von eukaryotischen Organismen genutzt. Eine Anwendung des CRISPR-Cas Systems in Prokaryoten war zu Beginn dieser Arbeit lediglich von einigen wenigen Forschungsgruppen publiziert worden und beschränkte sich auf Modellorganismen wie bspw. *E. coli*.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Riboflavin

Riboflavin (7,8-Dimethyl-10-D-ribitylisoalloxazin), auch als Vitamin B₂ bezeichnet, gehört zu den wasserlöslichen Vitaminen und zur Gruppe der Flavine. Es wurde erstmals 1879 von dem britischen Chemiker Blyth aus Milchpulver isoliert und auf Grund seiner Herkunft und der gelblichen Farbe zunächst Lactochrom genannt (Blyth, 1879). Riboflavin besteht aus einem Isoalloxazin-Ringsystem und einer Ribityl-Seitenkette, wobei es aufgrund des Isoalloxazin-Gerüsts seine charakteristische gelbe Färbung sowie seine gelb-grüne Fluoreszenz in wässrigen Lösungen aufweist (Bhagavan, 2002). Es handelt sich um ein hitzebeständiges Vitamin, das empfindlich gegenüber der Einwirkung von UV-Strahlung und Sonnenlicht ist (Ashoori & Sadedisomeolia, 2014; Northrop-Clewes & Thurnham, 2012). So wird es unter Exposition von Sonnenlicht und in Abhängigkeit des pH-Wertes zu den biologisch inaktiven Produkten Lumichrom (neutrale bis schwach saure Lösungen) oder Lumiflavin (alkalische Lösungen) umgesetzt (Shils & Shike, 2006). Während Pflanzen und ein Großteil der Prokaryonten und Hefen in der Lage sind Riboflavin selbst herzustellen, müssen Säuger das Vitamin über die Nahrung aufnehmen. Eine Ausnahme hiervon bilden Wiederkäuer, die Vitamin B₂ mikrobiell mit Hilfe ihrer Darmflora im Pansen generieren können (Bacher et al., 2000). Auch bei den Bakterien sind einige wenige auxotrophe Ausnahmen bekannt, wie beispielsweise *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes* und einige Laktobazillen (Koser, 1968; Vitreschak et al., 2002).

Riboflavin selbst ist nicht biologisch aktiv. Sein Vitamin Charakter erklärt sich dadurch, dass seine Derivate Flavinmononukleotid (FMN, Riboflavin-5'-Phosphat) und Flavinadenindinukleotid (FAD, Riboflavin-5'-Adenosindiphosphat) die Coenzyme für mehr als 90 verschiedene Flavin-abhängige Proteine (Flavoproteine) in Säugetieren bilden, die unter anderem zahlreiche Redoxreaktionen katalysieren (Bacher et al., 2001; Bhagavan, 2002; Eisenbrand et al., 2006). Zusätzlich zu diesen klassischen Ein- und Zwei-Elektronen Übertragungen, an denen verschiedene Flavoproteine beispielweise in der Atmungskette, dem Cytochrom-P-450-System sowie dem Lipidstoffwechsel beteiligt sind, sind FMN und FAD auch in physiologische Prozesse, wie beispielsweise der Lichterzeugung in biolumineszierenden Bakterien, der Blaulichtwahrnehmung von Pflanzen und Mikroorganismen, DNA-Reparaturprozesse und den programmierten Zelltod involviert (Fischer & Bacher, 2005; Massey, 2000).

Der Tagesbedarf an Riboflavin beträgt für einen Erwachsenen im Alter von 25 bis 51 Jahren 1,4 mg (für Männer) und 1,1 mg (für Frauen) (Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., 2015). Lebensmittel, die eine gute Riboflavin-Quelle für die menschliche Ernährung darstellen, sind beispielsweise Eier, Leber, Fisch, Milchprodukte, Leguminosen, Pilze und grünes Blattgemüse

(Belitz et al., 2008; Eisenbrand et al., 2006). Mit Ausnahme der Milch, die etwa 90% des enthaltenen Riboflavins in seiner freien Form enthält, liegen FMN und FAD in den meisten Lebensmitteln proteingebunden in Form von Flavoproteinen vor. Unter Einwirkung der Magensäure werden FMN und FAD aus der Proteinbindung gelöst und mittels Phosphatasen und Pyrophosphatasen zu Riboflavin freigesetzt. Das freie Riboflavin kann anschließend im Zwölffingerdarm resorbiert werden. Innerhalb der Zelle wird es dann erneut in seine Coenzymformen umgewandelt (Bhagavan & Ha, 2011; Eisenbrand et al., 2006). Dabei katalysiert zunächst die Riboflavinkinase die Übertragung eines Phosphates von Adenosintriphosphat (ATP) auf Riboflavin, wodurch Riboflavin-5'-Phosphat (FMN) entsteht. Die anschließende Umwandlung in FAD erfolgt mittels der FAD-Pyrophosphorylase (FMN Adenyltransferase), die die Abspaltung von zwei Phosphaten von einem weiteren ATP Molekül katalysiert und das entstehende Adenosinmonophosphat (AMP) auf FMN überträgt (Litwack, 2018). Die Strukturformeln von Riboflavin sowie seiner Cofaktoren FMN und FAD sind in Abbildung 1 dargestellt.

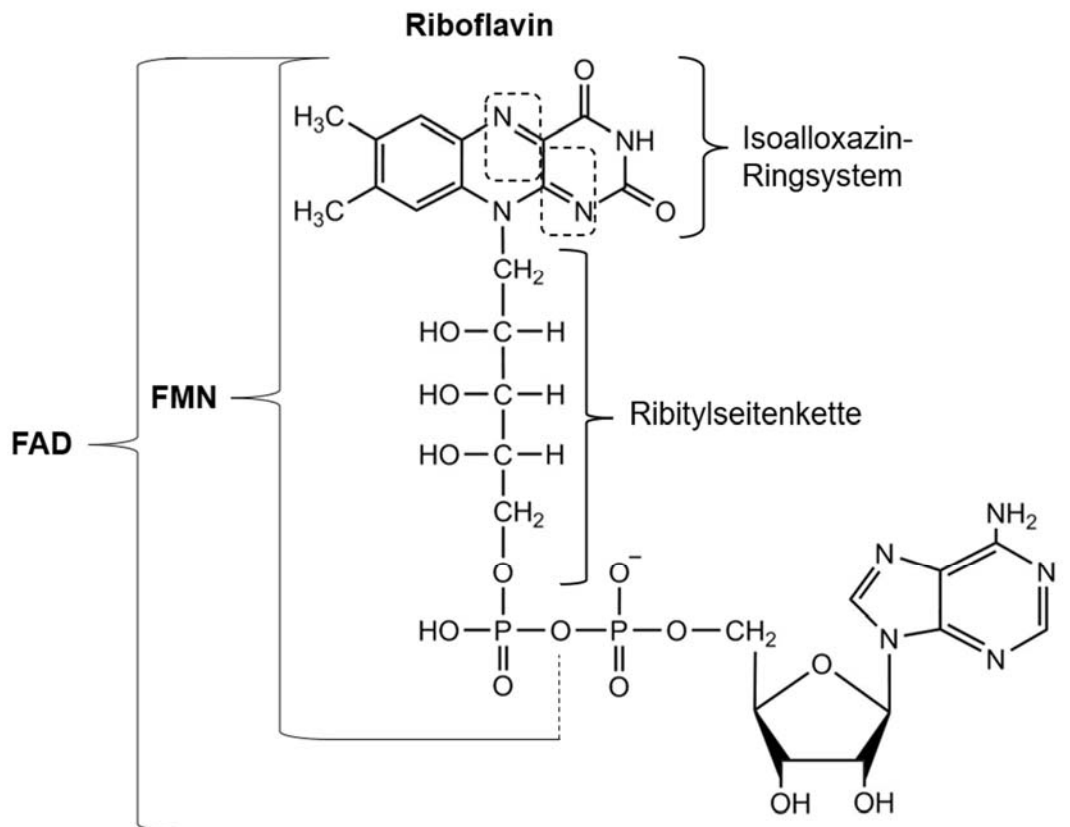


Abbildung 1: Strukturformeln von Riboflavin, FMN und FAD. Die beiden Stickstoff-Atome und die beiden Kohlenstoff-Atome, die durch die gestrichelte Markierung im Isoalloxazin-Ringsystem gekennzeichnet sind, nehmen an den Oxidations-Reduktionsreaktionen der Flavin-Coenzyme teil. Abbildung in Anlehnung an Eisenbrand et al., 2006.

Ein Riboflavinmangel (Ariboflavinosis) äußert sich in entzündlichen Hautveränderungen (Exanthemen), Hautrissen und Rötungen an den Mundwinkeln (Cheilosis), Atrophie und Trockenheit von Rachenschleimhaut und Ösophagus sowie einer erhöhten Lichtempfindlichkeit

der Augen (Photophobie). Eine Unterversorgung mit Riboflavin tritt in den Industriestaaten eher selten auf und ist fast ausschließlich in Verbindung mit einem Mangel an weiteren B-Vitaminen zu beobachten (Bhagavan, 2002; Eisenbrand et al., 2006).

2.1.1 Technologische und wirtschaftliche Bedeutung

Jährlich werden schätzungsweise mehr als 9000 Tonnen Vitamin B₂ von den drei Marktführern DSM (Niederlande), BASF (Deutschland), und ADM (USA) produziert (Fischer & Glomb, 2015; Revuelta et al., 2017; Schwechheimer et al., 2016; Stahmann et al., 2000). Der Großteil des industriell produzierten Riboflavins (etwa 80%) wird dabei zur Erhöhung des Nährwertes in der Tierfutterindustrie verwendet (Fischer & Glomb, 2015). Im Falle eines Riboflavinmangels kann es insbesondere bei Schweinen und Geflügel zu einer Wachstumshemmung, einer schlechteren Futterverwertung und Diarrhöen kommen. Da ein Überschuss des wasserlöslichen Vitamins über den Urin effizient ausgeschieden werden kann und somit unbedenklich ist und aufgrund seiner farbgebenden Komponente, wird es zudem in vielen Lebensmitteln als Farbstoff (E101 bzw. Food Yellow 15) zugesetzt (Fischer & Bacher, 2008; Stahmann et al., 2000). So erhalten beispielsweise Mayonnaisen, Vanille-Puddings und Multi-Vitaminsäfte ihre charakteristische gelb-orangene Farbe. Nur ein geringer Anteil des weltweit produzierten Riboflavins gelangt in die pharmazeutische Industrie und wird anschließend als Nahrungsergänzungsmittel für die Humanernährung angeboten. Bei einer gemischten Ernährungsweise, die tierische Lebensmittel, wie beispielsweise Eier und Milch einschließt, besteht in der Regel kein Risiko für eine Unterversorgung mit Vitamin B₂ (s. auch Abschnitt 2.1) (Fischer & Bacher, 2008; Stahmann et al., 2000).

Etwa 50 Jahre lang, von 1933 bis in die 1980er Jahre, wurde kommerziell vermarktetes Riboflavin nahezu ausschließlich mittels chemischer Synthese produziert (Revuelta et al., 2017). Die chemische Synthese erreichte jedoch nur eine maximale Ausbeute von ca. 60%. Zudem ging diese mit einem hohen Verbrauch an Energie und organischen Lösungsmitteln und der Entstehung von giftigen Abfallprodukten einher (Revuelta et al., 2017; van Loon et al., 1996). Im Jahre 1965 hatten zwar einige Unternehmen bereits Fermentationsverfahren zur Produktion von Riboflavin basierend auf dem anaeroben Bakterium *Clostridium acetobutylicum* und den beiden natürlichen Riboflavin-Überproduzenten *Eremothecium ashbyii* und *Ashbya gossypii* (*A. gossypii*) entwickelt, jedoch wurden die entsprechenden Produktionsanlagen einige Jahre später wieder geschlossen, da sie der chemischen Synthese gegenüber noch nicht konkurrenzfähig waren.

1974 wurde die Fermentation von Merck unter Verwendung von *A. gossypii* wieder aufgenommen, und durch das Generieren von Mutanten-Stämmen weiter optimiert. Nachdem im Jahr 1990 eine Produktionsanlage mit einer *A. gossypii* Mutante von der BASF in Betrieb genom-

men wurde, konnte dort sechs Jahre später die chemische Synthese endgültig eingestellt werden. Neben *A. gossypii* (BASF; Produktionsrate: 15 g/L) werden gegenwärtig die Hefe *Candida famata* (ADM) und das grampositive Bakterium *B. subtilis* (DSM) mit Riboflavin-Produktionsmengen von 20 g/L und 14 g/L für die Riboflavin Produktion genutzt (Perkins et al., 1999; Stahmann et al., 2000). Bei *B. subtilis* handelt es sich um keinen natürlichen Überproduzenten, zur gesteigerten Produktion wurden unterschiedliche Mutationen mittels gentechnischer Methoden in die regulierenden Gene der Riboflavinbiosynthese eingebracht. Die Expression der Riboflavin-Gene (*rib*-Gene) wurde beispielsweise durch eine *Knockout*-Mutation des Gens (*ribC*) erhöht, dass in *B. subtilis* für die bifunktionelle Flavokinase/FAD-Synthetase codiert und die Umwandlung von Riboflavin zu FMN und FAD katalysiert (Mack et al., 1998). Zusätzlich konnte die Riboflavin Produktion in *B. subtilis* durch eine Erhöhung der Kopienzahl einiger *rib*-Gene sowie durch den Austausch der zugehörigen nativen Promotor-Regulationsstellen durch konstitutive Promotoren gesteigert werden. Für eine weitere Erhöhung der Riboflavin-Produktionsrate wurden unter Exposition von toxischen Purin-Analoga, purinanaloga-resistente Mutanten selektiert. Die resultierenden Mutationen im Purinbiosyntheseweg führen zur Maximierung des metabolischen Flusses von Kohlenstoff zu Guanosintriphosphat (GTP) und gewährleisteten somit die ausreichende Verfügbarkeit von GTP, als Ausgangssubstanz der Riboflavinbiosynthese (Perkins et al., 1999).

Die Verwendung von *B. subtilis* als Produktionsstamm für Riboflavin hat einige Vorteile. So sind viele Produkte, die aus *Bacillus*-Arten hergestellt und in der Lebens- und Futtermittelindustrie verwendet werden, als GRAS (*Generally Recognized As Safe*) klassifiziert (Debabov, 1982). Des Weiteren waren bereits in den 1980er Jahren fortgeschrittene molekulargenetische und gentechnische Technologien für die Verwendung in diesem Stamm verfügbar. Da die Gene der Riboflavinbiosynthese fast ausschließlich in einem einzigen Operon (*rib*-Operon) organisiert sind, werden zudem einige genetische Modifizierungen des Stammes erleichtert (Perkins et al., 1999). Ein weiterer erheblicher Vorteil ist die Fähigkeit von *B. subtilis* das synthetisierte Riboflavin direkt ins Medium zu sekretieren, so dass weitere aufwendige Zellaufschluss-Verfahren entfallen (Sauer et al., 1996).

2.1.2 Die Riboflavinbiosynthese

Mehr als drei Jahrzehnte lang war die Aufklärung der Riboflavinbiosynthese Gegenstand intensiver Forschung und wurde in einer Reihe von Übersichtsartikeln zusammengefasst (Bacher et al., 1975; Bacher et al., 2000; Bacher et al., 2001; Fischer & Bacher, 2005; Lingens et al., 1967; Plaut & Harvey, 1971; Young, 1986). Trotz umfangreicher Forschungsprojekte auf dem Gebiet der Riboflavinbiosynthese ist diese jedoch bis heute nicht vollständig aufgeklärt (Bacher & Lingens, 1970; Sa et al., 2016).

Die Biosynthese von Riboflavin verläuft bei Pflanzen, Hefen, Pilzen, Archaeen und Bakterien sehr ähnlich, wobei der pflanzliche Weg im Vergleich zu Archaeen, Hefen und Pilzen überraschender Weise eine größere Ähnlichkeit mit dem eubakteriellen Weg aufweist (Fischer & Bacher, 2006). Eine schematische Darstellung des Reaktionsweges der Riboflavinbiosynthese von Bakterien, Pilzen und Hefen ist in Abbildung 2 zusammengefasst. Die Riboflavinbiosynthese beginnt mit einem Molekül GTP (**1**) und zwei Molekülen Ribulose-5-Phosphat (**7**), wobei GTP in insgesamt sieben enzymatischen Schritten in Riboflavin umgewandelt wird (Bacher et al., 2001). Als Erstes erfolgt die hydrolytische Aufspaltung des Imidazolrings von GTP. Hierbei katalysiert die GTP Cyclohydrolase II (**I**) die Abspaltung von Formiat und Pyrophosphat. Das entstandene 2,5-Diamino-6-Ribosylamino-4(3*H*)-Pyrimidinon 5'-Phosphat (**2**) wird in einem zweistufigen Reaktionsmechanismus zu 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-Pyrimidindion 5'-Phosphat (**ARPP**; **5**) umgewandelt. Die Reihenfolge der Reaktionen unterscheidet sich je nach Organismus voneinander und wird von einem bifunktionellen Enzym katalysiert. In *B. subtilis* und *E. coli* findet durch die bifunktionelle Pyrimidindesaminase/Pyrimidinreduktase (**II**) zunächst die Desaminierung statt und anschließend die Reduktion der Seitenkette des 5-Amino-6-Ribosylamino-2,4(1*H*,3*H*)-Pyrimidindion-5'-phosphat (**3**). Bei Hefen und Pilzen folgt auf die Reduktion der Ribosyl-Seitenkette und die Entstehung von Intermediat **4** die hydrolytische Abspaltung der Aminogruppe an Position 2. Nach der Umwandlung von ARPP (**5**) zu 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-Pyrimidindion (**ARP**; **6**) durch eine oder mehrere noch nicht vollständig identifizierte Phosphatasen (**III**) können im nächsten Schritt ARP und 3,4-Dihydroxybutan-2-on-4-Phosphat (**8**) durch eine Kondensationsreaktion miteinander verknüpft werden. Diese Reaktion wird von der Lumazinsynthase (**V**) katalysiert und es entsteht 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin (**9**) als Reaktionsprodukt (Lingens et al., 1967; Nielsen et al., 1986). Als zweites Substrat dieser Reaktion wurde **8** schon relativ früh durch Untersuchungen an *Candida guilliermondii* und *E. coli* charakterisiert (Volk & Bacher, 1990). Es wird durch das Enzym 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-synthase (**IV**) aus **7** synthetisiert.

Im finalen Reaktionsschritt katalysiert die Riboflavinsynthase (**VI**) die Dismutation von zwei Lumazin-Molekülen (**9**), was zur Bildung von Riboflavin (**10**) und ARP führt, das von der Lumazin-Synthase wieder in den Biosyntheseweg zurückgeführt wird (Bacher et al., 2000; Fischer & Bacher, 2005; Fischer & Bacher, 2008; Plaut, 1963; Sedlmaier et al., 1987).

Mit Ausnahme der schwer fassbaren Phosphatase sind alle Enzyme, die für andere Reaktionsschritte der Riboflavin-Biosynthese verantwortlich sind, bereits vor Jahren und Jahrzehnten identifiziert worden (Perkins et al., 1999). In den letzten Jahren wurden schließlich in verschiedenen Organismen eine Gruppe von Enzymen entdeckt, die der *Haloacid Dehalogenase* (HAD)-Superfamilie angehören. Diese sind in der Lage unter anderem die Dephosphorylierung von ARPP zu katalysieren und stellen somit möglicherweise den „Missing Link“ im Riboflavinbiosyntheseweg dar (Haase et al., 2013; Sa et al., 2016; Sarge et al., 2015b).

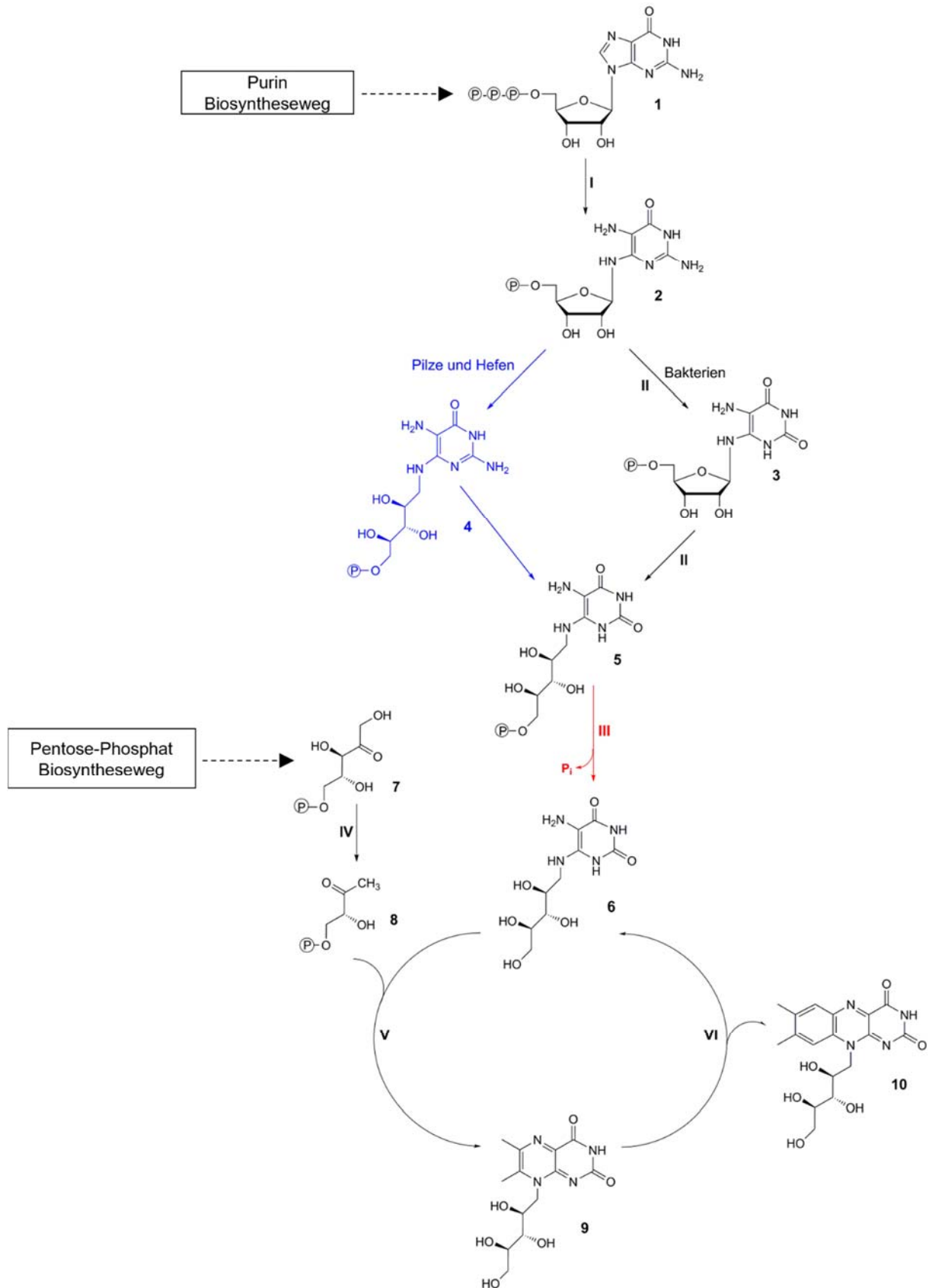


Abbildung 2: Darstellung der Riboflavinbiosynthese in *B. subtilis* und *E. coli*. I: GTP-Cyclohydrolase II; II: Pyrimidindesaminase/Pyrimidinreduktase; III: unbekannte Phosphatase(n); IV: 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphatsynthase (Mutase); V: 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase; VI: Riboflavinsynthase; 1: GTP; 2: 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat; 3: 5-Amino-6-ribosylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat; 4: 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidinon-5'-phosphat; 5: 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat (ARP); 6: 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion-5'-phosphat (ARP); 7: Ribulose-5-phosphat; 8: 3,4-Dihydroxybutan-2-on-4-Phosphat; 9: 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin; 10: Riboflavin.

Infolgedessen, dass viele Forschergruppen parallel an der Aufklärung der an der Riboflavinbiosynthese beteiligten Gene bzw. Enzyme arbeiteten und ihre enzymatische Funktion häufig erst später geklärt wurde, entwickelte sich keine einheitliche Nomenklatur für diese Gene. Die jeweilige Nomenklatur der offenen Leserahmen (*Open Reading Frames*, ORFs), die für die entsprechenden Enzyme der Riboflavinbiosynthese in *B. subtilis* bzw. *E. coli* kodieren, sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der Nomenklatur der Riboflavinbiosynthese-Gene in *B. subtilis*.

Enzym-nummer	ORF	Enzym	Literatur
I/IV	<i>ribA</i>	GTP-Cyclohydrolase II/Mutase	(Richter et al., 1992)
II	<i>ribG</i>	Desaminase/Reduktase	(Richter et al., 1997a)
V	<i>ribH</i>	Lumazinsynthase	(Bacher et al., 1997; Kis et al., 1995)
VI	<i>ribB</i>	Riboflavinsynthase	(Bacher et al., 1980; Bacher et al., 1997)

Tabelle 2: Übersicht der Nomenklatur der Riboflavinbiosynthese-Gene in *E. coli*.

Enzym-nummer	ORF	Enzym	Literatur
I	<i>ribA</i>	GTP-Cyclohydrolase II	(Richter et al., 1993)
II	<i>ribD</i>	Desaminase/Reduktase	(Richter et al., 1997a)
V	<i>ribE</i>	Lumazinsynthase	(Bacher et al., 1997; Mörtl et al., 1996)
VI	<i>ribC</i>	Riboflavinsynthase	(Bacher et al., 1997; Eberhardt et al., 1996)
IV	<i>ribB</i>	Mutase	(Richter et al., 1992; Richter et al., 1997b)

Im Gegensatz zu *E. coli*, bei dem die ORFs der Enzyme der Riboflavinbiosynthese einzeln im Genom vorliegen, sind diese bei *B. subtilis* innerhalb des 4,3 kbp großen *rib*-Operons (*ribGBAHT*) organisiert (s. Abbildung 3). Die Position des *rib*-Operons auf dem Chromosom von *B. subtilis* liegt bei 210° (Bresler et al., 1974; Mironov et al., 1990; Mironov et al., 1994; Osina et al., 1985). Neben den vier bereits vorgestellten Biosynthesegenen *ribG*, *ribB*, *ribA* und *ribH*, codiert das Operon auch für das Enzym RibT, das nicht für die Biosynthese benötigt wird. Im Jahre 2018 konnte mit Hilfe von Strukturanalysen gezeigt werden, dass RibT ein Mitglied der GCN5-assoziierten N-Acetyltransferase (GNAT)-Superfamilie ist.

Die Mitglieder der GNAT-Familie übertragen die Acetylgruppe von Acetylcoenzym A (AcCoA) auf eine Vielzahl von Substraten (Srivastava et al., 2018). Ein weiteres Enzym, das im Zusammenhang mit der Riboflavinbiosynthese steht, dessen Gen jedoch nicht auf dem *rib*-Operon lokalisiert ist, ist die bifunktionelle Flavokinase/FAD-Synthetase (RibC). Diese katalysiert die Umwandlung von Riboflavin in seine Coenzymformen FMN und FAD. Zusätzlich wurde ein weiteres Gen (*ribR*) in *B. subtilis* gefunden, das für eine monofunktionelle Flavokinase kodiert und möglicherweise eine regulatorische Funktion aufweist (Im Solov'eva et al., 1997; Mack et

al., 1998; Solovieva et al., 1999). Die Transkription der Gene des *rib*-Operons wird überwiegend von Promotor *ribP*₁ sowie von einem Riboflavin Nukleotid-Element (RFN-Element, *rib leader*) kontrolliert. Die Transkription von *ribA*, *ribH* und *ribT* kann auch von dem Promotor *ribP*₂, ausgehen. RibT kann auch von Promotor *ribP*₃ transkribiert werden. Das regulatorische RFN-Element befindet sich in der 5'-untranslatierten Region der Messenger-RNA (mRNA) und wird durch FMN kontrolliert, weshalb es auch als FMN-Riboswitch bezeichnet wird.

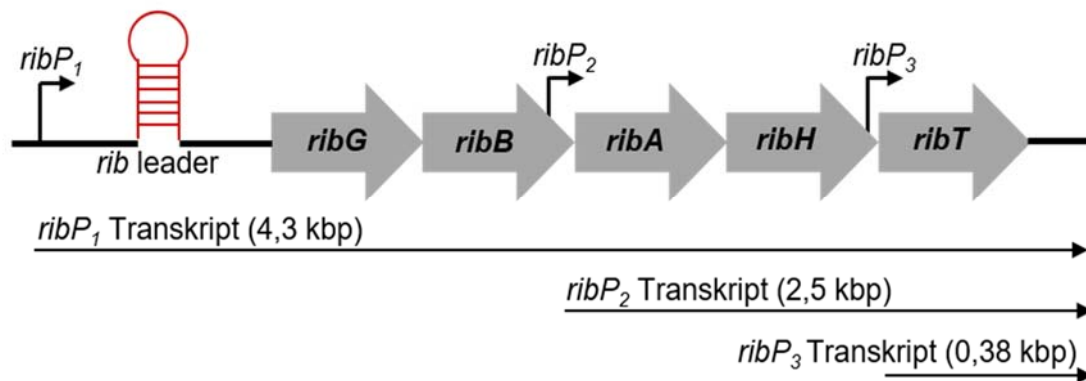


Abbildung 3: Genkarte des *rib*-Operons von *B. subtilis*. Die unteren Pfeile markieren den jeweiligen Transkriptionsstart ausgehend von den Promotoren (*ribP*₁, *ribP*₂ und *ribP*₃). Die *rib leader* Sequenz (RFN-Element, Riboswitch) ist in Rot dargestellt und befindet sich im 5'-Bereich des Operons zwischen dem Transkriptionsstart (Promotor *ribP*₁) und dem Translationsstart des ersten *rib*-Genes (*ribG*). Abbildung nach Vogl, 2008.

Kommt es zur Akkumulation von freiem FMN in der Zelle, dann bindet dieses an das RFN-Element und bewirkt eine Konformationsänderung, die letztendlich zu einem Transkriptionsstopp der Riboflavinbiosynthese-Gene führt (Vitreschak et al., 2002; Winkler et al., 2002). Diese Funktion ermöglicht es der Zelle je nach Verfügbarkeit von FMN, regulatorisch in die Biosynthese seines Vorläufers (Riboflavin) einzugreifen.

Obwohl *B. subtilis*, wie die meisten Prokaryonten, Riboflavin de-novo synthetisieren kann, verfügt das Bakterium zusätzlich über ein Transportprotein, mit Hilfe dessen es Riboflavin aktiv aus dem umgebenen Medium aufnehmen kann (Vitreschak et al., 2002). Ebenso wie für das *rib*-Operon, konnte auch für das Gen *ypaA* (*ribU*), das für den Riboflavintransporter kodiert, ein RFN-Element in der 5'-untranslatierten Region der mRNA und somit ein Riboswitch-Mechanismus nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von FMN an das RFN-Element zur Bildung einer alternativen Sekundärstruktur führt, die den Translationsstartpunkt, die Shine-Dalgarno-Sequenz, verdeckt und somit die Translation der mRNA von *ypaA* verhindert (Sklyarova & Mironov, 2014; Vogl et al., 2007).

Neben der Erforschung der Riboflavinbiosynthese in *B. subtilis*, bestand zunehmend auch ein Interesse daran, diese in dem leicht zu handhabenden Modelorganismus *E. coli* zu erforschen. Die Gene der Riboflavinbiosynthese bilden in *E. coli* keine gemeinsame Transkriptionseinheit,

sie liegen breit verstreut auf dem Chromosom vor. In Abbildung 4 ist die Position der Riboflavinbiosynthese-Gene (*ribA*, *ribB*, *ribC*, *ribD* und *ribE*) sowie die des Gens, der bifunktionellen Flavokinase/FAD-Synthetase RibF auf dem Chromosom von *E. coli* dargestellt.

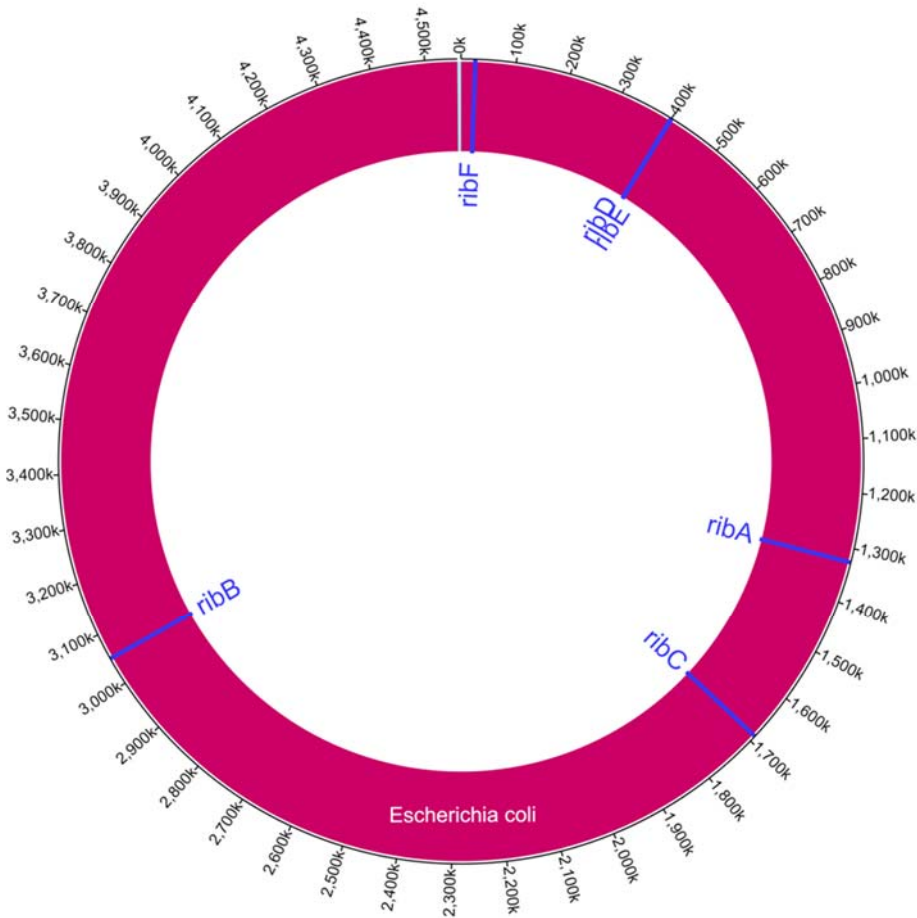


Abbildung 4: Lokalisation der Riboflavin-Biosynthese Gene auf dem *E. coli*-Chromosom. Es sind die Positionen der Gene *ribA*, *ribB*, *ribC*, *ribD*, *ribE* und *ribF* in Blau dargestellt. (K) = Kilobasenpaare. Der Circos Plot wurde mit Hilfe der Circa Genomics Software erstellt.

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Biosynthese von Riboflavin in *E. coli* konstitutiv verläuft und nicht durch Riboswitches reguliert wird (Abbas & Sibirny, 2011). Da der typische Lebensraum von *E. coli* kein freies Riboflavin bereithält und *E. coli* auch im Gegensatz zu *B. subtilis* über keinen Riboflavintransporter verfügt, muss das Bakterium lediglich das zytoplasmatische Niveau von Riboflavin regulieren (Bacher et al., 2000; Hemberger et al., 2011; Yonezawa & Inui, 2013). Vitreschak et al. stellten 2002 die Hypothese auf, dass das Gen *ribB*, welches für die Riboflavin-Mutase kodiert, einen Riboswitch-Mechanismus aufweisen könnte. Im Jahre 2015 konnten Pedrolli et al. nachweisen, dass tatsächlich ein RFN-Element in der 5'-untranslatierten Region der mRNA des Genabschnittes von *ribB* existiert. Auch in diesem Fall führt eine Akkumulation von FMN in der Zelle zu einer negativen Regulation des Riboswitches.

2.1.3 Rolle der HAD-Phosphatasen in der Riboflavinbiosynthese von *B. subtilis*

Die enzymatische Dephosphorylierung von ARPP (**5**) zu ARP (**6**) ist ein essenzieller Schritt in der Synthese von Riboflavin, da die Lumazinsynthase (**V**) im nächsten Reaktionsschritt kein 5'-phosphoryliertes **5** als Substrat nutzen kann. Ebenso konnte gezeigt werden, dass das hypothetische 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin-5'-phosphat (**9**) ebenfalls nicht von der Riboflavinsynthase (**VI**) akzeptiert wird (Harzer et al., 1978; Neuberger & Bacher, 1986). Wie im Abschnitt 2.3.1, Abbildung 3 dargestellt, enthält das *rib*-Operon die Gene *ribG*, *ribB*, *ribA*, *ribH* und *ribT*. Ein Gen, welches für eine Phosphatase kodiert, ist demnach nicht innerhalb des *rib*-Operons lokalisiert. Dieser Umstand erschwerte die Identifizierung des Enzyms, das die Dephosphorylierung von Intermediat **5** katalysiert. In den letzten Jahren – nach über 50 Jahren intensiver Erforschung der Riboflavinbiosynthese – wurde in verschiedenen Organismen eine Gruppe von Enzymen entdeckt, die der HAD-Superfamilie angehören und in der Lage sind die Dephosphorylierung von ARPP zu katalysieren. Die HAD-Superfamilie ist eine große Gruppe von Proteinen, die Phosphatasen, Beta-Phosphoglucomutasen, Phosphonatasen und Dehalogenasen umfasst und somit eine breite Substratspezifität aufweist (Allen & Dunaway-Mariano, 2004; Koonin & Tatusov, 1994). Die Sequenzhomologie der HADs untereinander ist relativ gering, Mitglieder dieser Familie können jedoch über vier hoch konservierte Sequenzmotive identifiziert werden (Burroughs et al., 2006). Tabelle 3 zeigt eine Auswahl von HAD-Enzymen aus verschiedenen Organismen, welche die Dephosphorylierung von ARPP katalysieren können.

Tabelle 3: Auswahl von HAD-Enzymen, welche die Dephosphorylierung von ARPP katalysieren.

Enzym	Organismus	Literatur
YigB	<i>E. coli</i>	(Haase et al., 2013)
Ybjl	<i>E. coli</i>	(Haase et al., 2013)
YcsE	<i>B. subtilis</i>	(Sarge et al., 2015b)
YwtE	<i>B. subtilis</i>	(Sarge et al., 2015b)
YitU	<i>B. subtilis</i>	(Sarge et al., 2015b)
EFI-501083 (Bt_0970)	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	(London et al., 2015)
AtcpFHy (AtPyrP1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Sa et al., 2016)
AtPyrP2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(Sa et al., 2016)

Zusätzlich zur Dephosphorylierung von ARPP zeigten alle in Tabelle 3 aufgeführten HAD-Phosphatasen mit Ausnahme von AtPyrP2 und Bt_0970 auch eine hohe Dephosphorylierungsaktivität gegenüber FMN. Im Falle von YigB, Ybjl, YcsE, YitU und AtcpFHy/PyrP1 wurde diese Substratpromiskuität auch in Bezug auf weitere Substrate beobachtet, darunter Nukleotide, Desoxynukleotide, Zuckerphosphate und phosphorylierte Kofaktoren (Haase et al., 2013; Kuznetsova et al., 2006; Niu et al., 2021; Rawat et al., 2011; Terakawa et al., 2016; Yusupova et al., 2020). Für YcsE und YitU konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass die Km-Werte für Riboflavin um

den Faktor 50 bis 400 niedriger liegen und Riboflavin und FMN somit die präferierten Substrate der HAD-Phosphatasen darstellen (Terakawa et al., 2016; Yusupova et al., 2020). Neben YcsE, YitU und YwtE wurden innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Fischer insgesamt 11 weitere HAD-Phosphatasen in *B. subtilis* identifiziert, welche in der Lage waren die Hydrolyse von ARPP *in-vitro* zu katalysieren (Sarge et al., 2015b). Diese zeigten jedoch deutlich geringere enzymatische Aktivitäten.

Die Tatsache, dass HAD-ähnliche Phosphatasen, die normalerweise eine breite Substratspezifität aufweisen, auch für die Dephosphorylierung von ARPP verantwortlich sein können, war bis zu einem gewissen Grad überraschend, da eine breite Substratspezifität für kein anderes Enzym dieses Biosynthesewegs bekannt ist. Des Weiteren ist es unklar, warum nicht auch aus dem, zu ARPP sehr ähnlichen Intermediat **4**, 2,5-Diamino-6-ribitylamino-4(3H)-pyrimidin-dion gebildet wird (Hollander & Brown, 1979).

Die von Sarge et al. (2015b) identifizierten HAD-Phosphatasen liegen im Gegensatz zu den anderen Riboflavinbiosynthese-Genen in *B. subtilis* breit verstreut auf dem Chromosom vor (s. Abbildung 5).

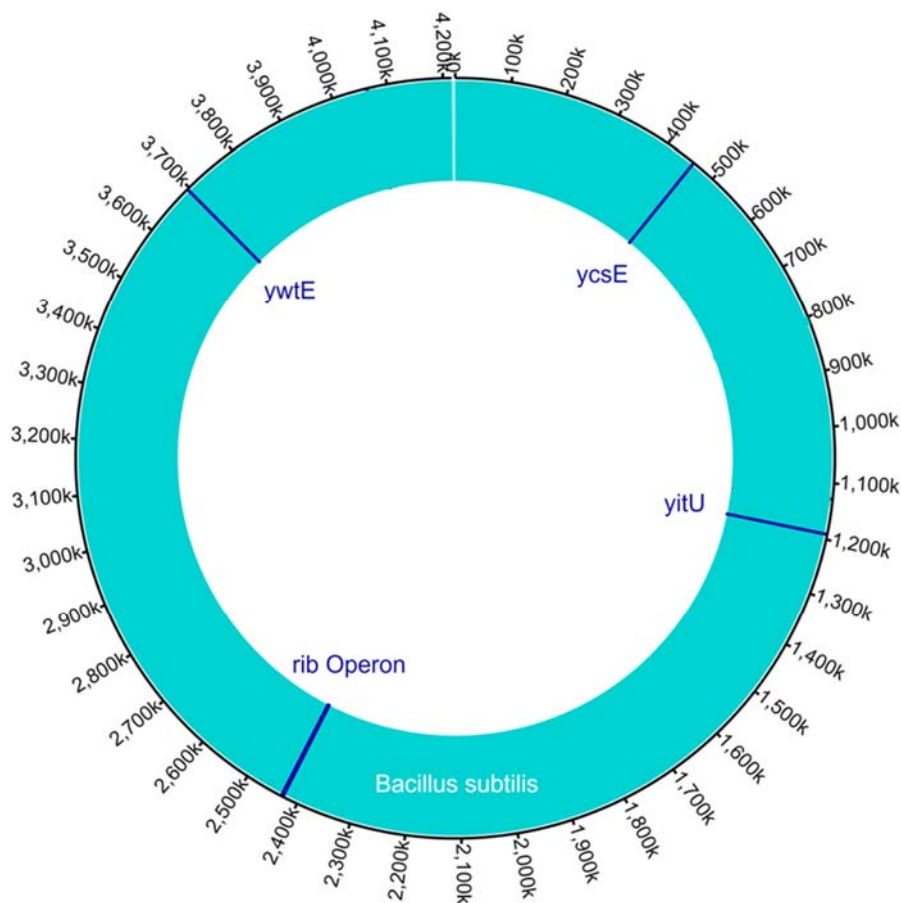


Abbildung 5: Position des *rib*-Operons und der HAD-Phosphatasen YcsE, YitU und YwtE auf dem Genom von *B. subtilis*. K) = Kilobasenpaare. Der Circos Plot wurde mit Hilfe der Circa Genomics Software erstellt.

Die für die kommerzielle Produktion von Riboflavin verwendeten rekombinanten *B. subtilis* Stämme wurden so modifiziert, dass unter anderem eine Hyperexpression des gesamten *rib*-Operons ermöglicht wird. Obwohl innerhalb des *rib*-Operons kein Gen vorhanden ist, das für eine Phosphatase kodiert und dieses somit auch nicht koexprimiert wurde, können mit Hilfe dieses rekombinanten Stammes hohe Riboflavin-Ausbeuten bei der Fermentation erzielt werden (Birkenmeier et al., 2014). Abbas und Sibirny stellten bereits 2011 die Hypothese auf, dass die Phosphatase eine hohe enzymatische Aktivität aufweisen muss, damit diese hohe Riboflavinausbeute der Produktionsstämme erreicht werden kann. Diese Vermutung konnte mit der Entdeckung der HAD-Phosphatasen in *B. subtilis* und der Bestimmung ihrer spezifischen Aktivitäten gegenüber ARPP bestätigt werden:

Es konnte gezeigt werden, dass die spezifischen Aktivitäten der Enzyme der Riboflavinbiosynthese mit 0,01-0,2 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ zum Teil deutlich niedriger sind als die spezifischen Aktivitäten der Phosphatasen. In Bezug auf YcsE (12 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$) liegen die spezifischen Aktivitäten um den Faktor 1200-60 niedriger. Die Michaeliskonstanten (K_M -Werte) der HAD-Phosphatasen unterscheiden sich hingegen nicht von denen der meisten Biosyntheseenzyme. In Tabelle 4 sind die enzymatischen Kenndaten der drei HAD-Phosphatasen YcsE, YitU und YwtE in Bezug auf Intermediat **5** (ARPP) und FMN zusammengefasst (Sarge et al., 2015b; Yusupova et al., 2020).

Tabelle 4: Überblick über die kinetischen Kenndaten der HAD-Phosphatasen YcsE, YitU und YwtE in *B. subtilis* (modifiziert nach Sarge et al., 2015b).

Enzym	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$] gegenüber:		K_M [μM]	K_M [μM]
	ARPP	FMN	gegenüber ARPP	gegenüber FMN
YcsE	12	25	54	
YitU	1,7	17	81	96 (Yusupova et al., 2020)
YwtE	0,69	7,4	21	

2.1.4 Bedeutung der Identifizierung der Phosphatasen

Da die Herstellung von Riboflavin großtechnisch u.a. mittels rekombinanter *B. subtilis*-Stämme erfolgt, besteht neben dem wissenschaftlichen Interesse daran den „Missing Link“ der Riboflavinbiosynthese zu finden, auch ein ökonomisches Interesse an der Identifizierung der schwer fassbaren Phosphatasen. Indem die HAD-Phosphatasen näher charakterisiert und ihre Funktionen in der Riboflavinbiosynthese aufgeklärt würden, könnten die entsprechenden Gene in Form von mehreren Kopien in das Genom eines Riboflavin-Produktionsstammes eingebracht und somit möglicherweise die Riboflavinausbeute weiter erhöht werden. Hierbei wäre allerdings noch unklar, ob die zusätzliche Aktivität der Phosphatasen gegenüber FMN zu einem

bakteriellen Defizit an den essenziellen Cofaktoren FMN und FAD führen würde. Dies könnte nur experimentell geprüft werden.

Des Weiteren hat die Tatsache, dass die Riboflavinbiosynthese-Enzyme im Menschen nicht präsent sind, zu der Überlegung geführt, diese als Zielort für die Entwicklung neuer Antibiotika gegen pathogene Mikroorganismen zu nutzen. Viele pathogene Mikroorganismen, wie beispielsweise Enterobakterien besitzen keine Riboflavintransporter, die es ihnen ermöglichen Riboflavin aus der Umgebung aufzunehmen. Somit sind diese von der De-novo-Biosynthese von Riboflavin zwingend abhängig und der Einsatz von Inhibitoren dieser Enzyme würde eine bakterizide Wirkung aufweisen (Dahl et al., 2004; Stratton, 2000). Hierfür bliebe jedoch noch zu klären, ob geeignete Inhibitoren eine ausreichende Spezifität aufweisen würden, um die selektive Inhibierung der bakteriellen HAD-Phosphatasen zu gewährleisten. Ein mögliches Problem könnte sich auch hier durch die FMN-Hydrolase Aktivität der HAD-Phosphatasen ergeben, da, im Gegensatz zu den Riboflavinbiosynthese-Genen, FMN-Hydrolasen auch im Menschen präsent sind.

2.2 Gentechnische Methoden

Unter dem traditionellen Begriff der Gentechnik werden Methoden der Biotechnologie verstanden, die dazu verwendet werden, durch gezielte Eingriffe in das Genom gentechnisch veränderte Organismen (GVOs) zu erzeugen. Der Begriff der roten Gentechnik bezeichnet hierbei eine Anwendung im Bereich der Medizin und Pharmazie, bei der weißen Gentechnik handelt es sich um eine Anwendung im Bereich der Mikroorganismen und Enzyme und bei der grünen Gentechnik um eine Anwendung in Pflanzen (Heberer, 2015). In Abbildung 6 ist die Entwicklung der gentechnischen Methoden auf einer Zeitachse dargestellt.

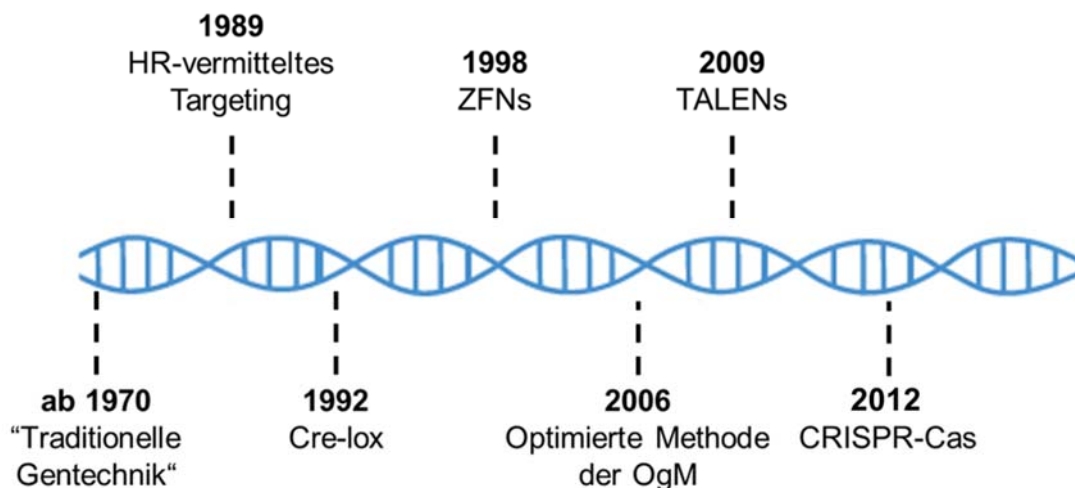


Abbildung 6: Zeitlicher Überblick über die Entwicklung von gentechnischen Methoden.

Von 1970 bis in die frühen 2000er Jahre wurden vorwiegend die "traditionellen" gentechnischen Methoden angewendet. Bei diesen Methoden werden große DNA-Abschnitte, so genannte Genkassetten in das Genom des zu verändernden Organismus eingebracht. Diese enthalten - neben dem eigentlichen Zielgen - ein Marker-Gen sowie ein spezifisches Startsignal (Promotor) und ein Stoppsignal (Terminator), welche die spätere Expression des eingebauten Gens gewährleisten sollen. Nach Einbringung dieser, zumeist aus Teilsequenzen verschiedener Organismen stammenden Gen-Konstrukte, erfolgt die zufällige ungerichtete Integration der DNA in den Wirtsorganismus. Hierbei sind weder die Häufigkeit der Integration und der Integrationsort noch die daraus resultierenden Veränderungen der Genregulation des Organismus kontrollierbar (Latham et al., 2006). Zusätzlich zur ungerichteten Integration von DNA war es bereits seit den 1989er Jahren möglich, mit Hilfe der homologen Rekombination (HR) zielgerichtete Mutationen in das Erbgut von Lebewesen einzubringen. Hierbei werden synthetisch erzeugte DNA-*Templates* verwendet, welche bis auf die zu verändernde(n) spezifische(n) Base(n) mit der Zielregion identisch sind und somit mit dieser Hybridisieren können. Anschließend werden die entsprechenden Mutationen in die zelleigene DNA übernommen. Da die HR in eukaryotischen Zellen extrem selten auftritt, ist die Rekombinationsfrequenz (1 von 10^6 - 10^9 Zellen) bei Anwendung dieser Methode jedoch relativ gering (Capecchi, 1989). Auch bei der Anwendung in Bakterien hat diese Methode zum Nachteil, dass häufig nur eine geringe Rekombinationsrate erzielt wird und ohne das Einführen von Markern wie bspw. Antibiotikaresistenzen aufwendige *Screenings* notwendig sind, um die Zellen, welche die Mutation enthalten, zu selektieren.

Im Jahr 2006 wurde die Methode weiter optimiert und es entstand die Bezeichnung der Oligonukleotid-gerichteten-Mutagenese (OgM). Die OgM ist zwar relativ spezifisch, hat jedoch weiterhin den Nachteil einer geringen Mutationseffizienz, so dass große Mengen an Oligonukleotiden in den Wirtsorganismus eingebracht werden müssen (Sauer et al., 2016). In den 1990er Jahren wurde zudem die Cre-lox-Technologie bekannt, bei der die Rekombinase Cre eines Bakteriophagen genutzt wird, um die ortsspezifische Rekombination von DNA-Sequenzen zu ermöglichen. Die Cre-Rekombinase erkennt spezifisch einen 34-bp-Locus namens loxP und vermittelt die ortsspezifische Deletion von DNA-Sequenzen zwischen zwei loxP-Stellen (Sternberg & Hamilton, 1981; Suzuki et al., 2005). Nachteile dieser Methode sind zum einen die mit zunehmendem genetischen Abstand der loxP-Stellen verringerte Effizienz und zum anderen die Tatsache, dass kurze Bereiche des loxP-Locus nach der Deletion auf dem Chromosom zurückbleiben (Carter & Delneri, 2010; Zheng et al., 2000).

Seit Beginn der 2000er Jahre sind einige neue molekularbiologische Methoden verfügbar, die unter dem Begriff der ortsspezifischen Nukleasen (*Site Directed Nucleases*, kurz SDN) zusammengefasst werden. Neben der erstmalig im Jahr 2012 angewandten CRISPR-Cas Technik (Jinek et al., 2012), werden die Zinkfinger-nukleasen (ZFNs) sowie die *Transcription Activator-*

Like Effector Nukleasen (TALENs) diesen neuen Methoden der Genom Editierung zugeordnet. Mit Hilfe dieser Techniken ist es möglich die DNA von Lebewesen gezielt und ortsgerichtet zu modifizieren. Hierbei sind sowohl Deletionen als auch Insertionen von größeren Genen/Genabschnitten, als auch Einzelbasenaustausche möglich (Sprink et al., 2016). Bei allen dieser Techniken werden die zelleigenen Reparatur- bzw. Rekombinationsmechanismen des *Non-Homologous End Joinings* (NHEJ) oder der HR genutzt, um die jeweiligen Veränderungen in der DNA hervorzurufen. Hierfür erzeugen die ortsspezifischen Nukleasen zunächst einen Doppelstrangbruch in der chromosomalen DNA des zu verändernden Organismus.

Sowohl ZFNs als auch TALENs, sind chimäre Proteine, die aus einer hochspezifischen DNA-Bindungsdomäne und einer unspezifischen Nukleasedomäne des Restriktionsenzym FokI aus dem Bakterium *Flavobacterium okeanoikoites* bestehen (Hiroyuki & Susumu, 1981; Kim & Chandrasegaran, 1994; Kim et al., 1996; Kim et al., 2010).

Da die FokI-Nuklease nur als Dimer enzymatisch aktiv ist, müssen immer zwei ZFN bzw. TALEN zum Induzieren eines Doppelstrangbruches auf der DNA-Zielsequenz über ihre FokI-C-Termini dimerisieren (Bitinaite et al., 1998).

TAL-Effektoren gehören zu einer großen Gruppe hochkonservierter bakterieller Proteine, die in verschiedenen Stämmen von *Xanthomonas* sp. vorkommen (Hayward, 1993; Leyns et al., 1984). Die spezifische DNA-Bindung von TAL-Effektoren wird über eine Domäne mit 12 bis 27 konservierten, fast identischen Wiederholungseinheiten (*Repeats*) von je 33 bis 35 Aminosäuren vermittelt, wobei jede dieser Einheiten über zwei hochvariable Aminosäurereste an Position 12 und 13 (*Repeat-Variable Di-residue* = RVD) an genau eine Base der Zielsequenz bindet. Es handelt sich hiermit um ein modulares System bestehend aus vier verschiedenen Wiederholungseinheiten, das es ermöglicht durch einfache Rekombination theoretisch für jede beliebige DNA-Sequenz einen passenden TAL-Effektor zu entwerfen (Kim & Kim, 2014; Mahfouz et al., 2011; Moscou & Bogdanove, 2009).

Die Zinkfinger (ZF)-DNA-Bindungsdomänen setzen sich aus einzelnen Modulen zusammen, wobei jeweils ein Modul, bestehend aus etwa 30 Aminosäuren, an drei Basen innerhalb der gewünschten ZF-Bindungsstelle bindet. ZFN bestehen aus drei bis vier solcher ZF-Module, welche beliebig tandemartig arrangiert werden können, um so eine Vielfalt an neuen DNA-Zielsequenzen zu adressieren (Beerli & Barbas, 2002; Cathomen & Keith Joung, 2008; Kim et al., 2010).

Während die ZFNs und die TALENs Protein-DNA-Wechselwirkungen nutzen, basiert das CRISPR-Cas System auf der hochspezifischen Bindung zwischen der CRISPR-RNA und der Ziel-DNA (Sander & Joung, 2014). Die relativ neue CRISPR-Cas-Technologie hat daher neben der hohen Präzision den Vorteil, dass das zeitaufwendige, fehleranfällige und kostenintensive Entwerfen von spezifischen Enzymen entfällt, da für unterschiedliche Genmodifikationen nicht

die Nuklease selbst, sondern lediglich eine kurze, spezifische RNA-Sequenz neu hergestellt werden muss (Belhaj et al., 2013; Kim et al., 2010; Ramirez et al., 2008). Im Folgenden werden die Entdeckung und Funktion des CRISPR-Cas Systems im Allgemeinen sowie das CRISPR-Cas9 System als neue Methode der Genom Editierung im Speziellen näher dargestellt.

2.2.1 Das CRISPR-Cas System

CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) sind Abschnitte kurzer (21-37 Basenpaare), palindromischer DNA-Sequenzen (*Repeats*), die von Abstandshaltern (*Spacern*) unterbrochen werden. Zusammen mit den Cas-Genen (*CRISPR-associated genes*), einer CRISPR-RNA (crRNA) sowie einer tracrRNA (*trans-activating crRNA*) sind sie auf dem Genom von etwa 42% aller bisher untersuchten Eubakterien und 85% der Archaeen in bestimmten Bereichen, den CRISPR-Loci, zu finden (Horvath & Barrangou, 2010; Jansen et al., 2002; Makarova et al., 2020; van der Oost et al., 2009). Mittlerweise sind zahlreiche unterschiedliche CRISPR-Systeme bekannt, die in Abhängigkeit des Organismus unterschiedliche Komponenten aufweisen. So kann beispielsweise die Anzahl der einzelnen *Repeat-Spacer* Einheiten von einigen wenigen bis hin zu mehreren hundert variieren. Die CRISPR-Loci codieren zudem für unterschiedliche Cas-Proteine und einige Systeme kommen ohne eine tracrRNA aus (Mojica & Garrett, 2013; Zetsche et al., 2015). In Abbildung 7 ist die schematische Darstellung eines CRISPR-Locus zu sehen.

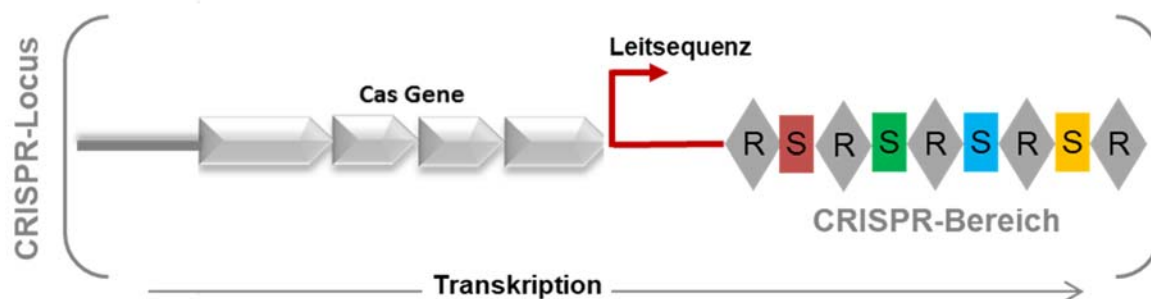


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines CRISPR-Locus. Vor dem CRISPR-Array liegt die AT-reiche Leitsequenz, die den Transkriptionsstartpunkt darstellt. Dahinter befinden sich unterschiedliche *Spacer*-Sequenzen (S, farbige Rechtecke), flankiert von identischen *Repeat*-Sequenzen (R, graue Rauten), deren Anzahl variieren kann. In grau vorgeschaltet sind die tracrRNA und die CRISPR-assoziierten Cas Gene (Cas-Operon) dargestellt. Während die Cas-Gene in Proteine translatiert werden, werden die meisten CRISPR-Arrays zunächst als eine einzige RNA transkribiert, bevor sie anschließend zu kürzeren crRNAs verarbeitet werden. Abbildung in Anlehnung an Makarova et al., 2020.

Bei Untersuchungen der intestinalen alkalischen Phosphatase (IAP) wurde 1987 von Nakata und Kollegen erstmals ein solcher CRISPR-Locus im Bakterium *E. coli* entdeckt. Sie berichteten über ein kuriose Set von 29 Basenpaar-Wiederholungen stromabwärts des *iap*-Gens, dessen Funktion ihnen nicht bekannt war (Ishino et al. 1987). Erst 18 Jahre später, in den Jahren 2005 bis 2008, konnte durch verschiedene, unabhängige Studien gezeigt werden, dass es sich bei den von repetitiven Sequenzen eingerahmten *Spacern* um Fremd-DNA aus Bakterien-infizierenden Viren (Bakteriophagen) handelt. Dies führte zu der Hypothese, dass die

Funktion der CRISPR-Cas Systeme darin besteht, den jeweiligen Organismus gegen Fremd-DNA aus Viren und Plasmiden zu verteidigen (Bolotin et al., 2005; Brouns et al., 2008; Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005). Mit Hilfe von experimentellen Studien am Milchsäurebakterium *Streptococcus thermophilus* konnte im Jahr 2007 bestätigt werden, dass nach einer Virusinfektion ein Teil der Zellen neue, Viren-spezifische *Spacer*-Sequenzen im CRISPR-Array ihres Genoms aufweisen, die bei einer Zweitinfektion zu einer Resistenz gegenüber dem Virus führten. Die Deletion dieser neu akquirierten *Spacer*-Sequenzen resultierte wiederum in einem Verlust der zuvor gezeigten Resistenz, wodurch bewiesen werden konnte, dass es sich bei den auf dem CRISPR-Locus enthaltenen genetischen Komponenten um ein adaptives Immunsystem von Prokaryoten handelt (Barrangou et al., 2007).

Mittlerweile (Stand 2022) sind zwei verschiedene Klassen, sechs Typen und 33 Subtypen des CRISPR-Cas Systems bekannt, die in verschiedenen Bakterien oder Archaeen gefunden wurden und in einigen Bereichen stark differieren. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten CRISPR-Cas9 System handelt es sich um eine adaptive Immunabwehr aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes*. Das System wird der Klasse 2, Typ II zugeordnet und zählt zusammen mit zwei weiteren kürzlich entdeckten Typen (V, VI) zu den CRISPR-Cas Systemen, die bislang aufgrund ihrer Einfachheit als Methoden der Genom Editierung favorisiert werden. CRISPR-Cas9 ist hierbei das am längsten bekannte und am umfangreichsten erforschte System (Cong et al., 2013; Jinek et al., 2012; Makarova et al., 2020; Sander & Joung, 2014). Im Folgenden wird die adaptive Immunabwehr anhand des CRISPR-Cas9 Systems näher dargestellt. Die CRISPR-vermittelte Immunabwehr gegenüber parasitärer Fremd-DNA kann in drei Phasen unterteilt werden: 1. Akquisitionsphase, 2. Bearbeitungsphase und 3. Interferenzphase (s. Abbildung 8).

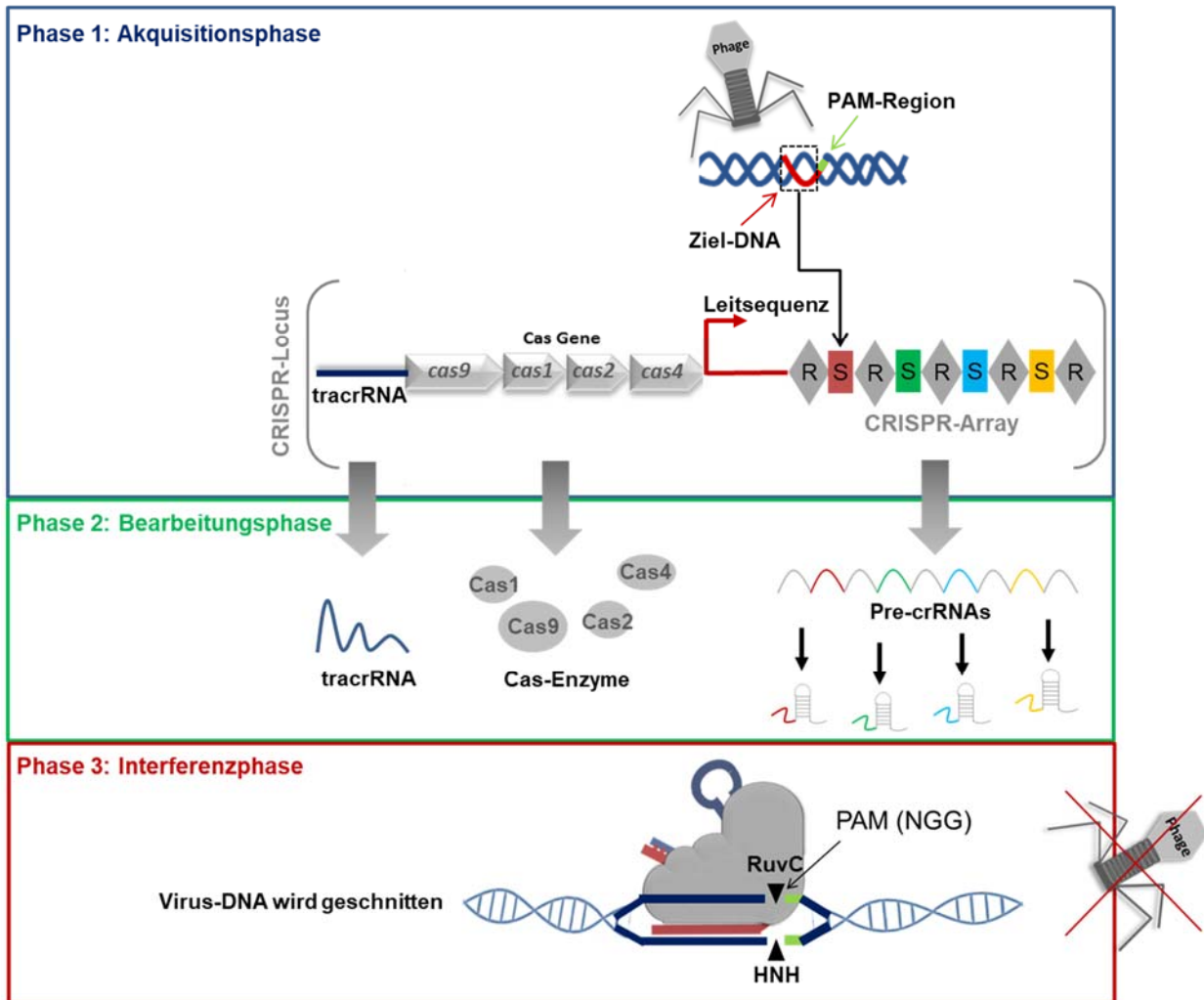


Abbildung 8: Ablauf der adaptiven Immunabwehr beim Typ II CRISPR-Cas9 System aus *S. pyogenes*. Es werden die drei Phasen (Akquisitionsphase (blau), Bearbeitungsphase (grün) und Interferenzphase (rot)) der CRISPR-Cas9 vermittelten Immunabwehr dargestellt. Der CRISPR-Cas9-Locus von *S. pyogenes* enthält die *tracrRNA*, ein Cas-Operon mit den Genen *cas9*, *cas1*, *cas2* und *cas4*, eine Leitsequenz sowie einen CRISPR-Array. Auf dem CRISPR-Array befinden sich die unterschiedlichen *Spacer*-Sequenzen (S, farbige Rechtecke), die flankiert werden von identischen *Repeat*-Sequenzen (R, graue Rauten). Abbildung in Anlehnung an Bhaya et al., 2011 und Makarova et al., 2020.

In der Akquisitionsphase wird ein Teil, der durch einen Virus oder ein Plasmid eingebrachten Fremd-DNA (auch *Protospacer* genannt), in der Nähe einer für das jeweilige CRISPR-System spezifischen Orientierungssequenz, der so genannten PAM Region (*Protospacer Adjacent Motif*) erkannt und in Form einer neuen *Spacer*-Sequenz auf dem CRISPR-Locus des bakteriellen Genoms eingebaut. Die Adaption neuer *Spacer*-Sequenzen wird von den Enzymen Cas1 und Cas2 vermittelt (Wang et al., 2015; Yosef et al., 2012). Die akquirierte Sequenz ist jetzt Teil des bakteriellen Genoms und wird bei einer Zellteilung an die nachkommenden Generationen vererbt (Barrangou et al., 2007; Deveau et al., 2008). Der neue *Spacer* wird dabei direkt von einer *Repeat*-Sequenz eingerahmt. Die *Spacer*-Sequenz besteht aus einer mit einem Teil der viralen DNA identischen, etwa 20-71 bp langen DNA-Sequenz, in Aussparung der PAM-Region. Die PAM-Region fungiert als eine Art Orientierungssequenz für die Cas-Nuklease, ohne die die Nuklease nicht aktiviert wird. Dieser Aufbau ermöglicht es dem

CRISPR-System später zwischen Fremd-DNA und eigener DNA zu unterscheiden (Mojica et al., 2009; Yosef et al., 2012). Die Cas9-Nuklease aus *S. pyogenes* erkennt eine 5'-NGG-3' bzw. 3'-NCC-5' (N = A, T, C oder G) PAM-Sequenz (Jinek et al., 2012; Mojica et al., 2009). Während der Bearbeitungsphase (Phase 2) entsteht nach der Transkription des CRISPR-Arrays, der tracrRNA und der Cas-Gene zunächst eine Vorläufer-crRNA (pre-crRNA), welche anschließend in die „reife“ crRNA prozessiert wird. Jede dieser crRNAs besteht anschließend aus je einem Teil der *Repeat*- und einem Teil einer *Spacer*-Sequenz. Die tracrRNAs, die eine *Anti-Repeat*-Sequenz enthalten, gehen eine Basenpaarung mit den pre-crRNA-*Repeats* ein. Diese Interaktion wird durch die Cas9-Nuklease gefördert und stabilisiert und führt zur Bildung eines Ribonukleoprotein-Komplexes. Nach der Bildung des tracrRNA:crRNA-Cas9-Komplexes werden beide RNAs von der wirtseigenen Ribonuklease III gemeinsam prozessiert, was zur Bildung einer prozessierten tracrRNA (75 Nukleotide) und einer Übergangsform der crRNA (66 Nukleotide) führt. Nach dieser ersten Reifungsphase wird die crRNA durch bisher noch unbekannte Faktoren weiter prozessiert und es entsteht die reife crRNA, die 39-42 Nukleotide umfasst. Der resultierende tracrRNA:crRNA-Duplex bleibt an der Cas9-Nuklease gebunden (Deltcheva et al., 2011). In der Interferenzphase (Phase 3) vermittelt schließlich die RNA-gesteuerte DNA-Endonuklease Cas9 die Spaltung der eindringenden Fremd-DNA (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012). Das Enzym Cas9 besitzt zwei Nuklease Domänen, eine RuvC-ähnliche Nuklease Domäne in der Nähe des Aminoterminus und eine HNH-ähnliche Nuklease Domäne in der Mitte des Proteins. Zusätzlich weist sie verschiedene Regionen auf, die für die spezifische Zielerkennung sowie das Auffinden der PAM-Sequenz von Bedeutung sind (Anders et al., 2014; Nishimasu et al., 2014). Die Bindung der Cas9-Nuklease an den tracrRNA:crRNA-Duplex bewirkt eine Konformationsänderung die es dem Protein ermöglicht, die Fremd-DNA nach PAM-Sequenzen abzusuchen (F. Jiang et al., 2015). Bei Erkennung der PAM-Sequenz lösen sich die Stränge der doppelsträngigen DNA, wodurch die crRNA in die Lage versetzt wird, die Komplementarität mit der Ziel-DNA zu prüfen (Anders et al., 2014). Wenn eine ausreichende Komplementarität besteht, geht die crRNA eine Watson-Crick-Basenpaarung mit dem komplementären DNA-Strang ein und der nicht-komplementäre Strang wird verschoben, wodurch eine R-Schleifenstruktur entsteht (Gasiunas et al., 2012). Die R-Schleifenbildung verläuft dabei vom PAM-proximalen zum PAM-distalen Teil der *Target*-Sequenz. Dabei sind insbesondere die PAM-Erkennung, als auch die Basenpaarung zwischen der crRNA und der *Target*-Sequenz der ersten 10-12 PAM-proximalen Nukleotide (auch als *Seed-Region* bezeichnet) wesentliche Voraussetzungen für die Cas9-Endonukleaseaktivität.

Nach erfolgreicher Bindung der crRNA an die *Target*-Sequenz der Fremd-DNA erfolgt eine erneute Konformationsänderung der Nuklease und der HNH- und RuvC-vermittelte Doppelstrangbruch drei Basenpaare stromaufwärts der PAM-Region (Chen et al., 2014; Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012).

2.2.2 Molekularbiologische Anwendung des CRISPR-Cas9 Systems

Bereits ein halbes Jahr nachdem die genaue Funktionsweise des CRISPR-Cas Systems in Bakterien und Archaeen erstmalig beschrieben wurde, konnte gezeigt werden, dass sich die Cas9 Nuklease aus dem Typ II CRISPR-Cas9 System als ortsspezifisch programmierbare Endonuklease zur Veränderung des Genoms verschiedener Organismen einsetzen lässt (Barrangou & Marraffini, 2014; Jinek et al., 2012; Sternberg & Doudna, 2015). Das CRISPR-Cas9 System ist für eine molekularbiologische Anwendung besonders geeignet, da es im Gegensatz zu anderen CRISPR-Cas Systemen, neben einer crRNA und einer tracrRNA, nur ein einziges Multidomänen-Protein, die Cas9 Nuklease, benötigt, um einen DNA-Doppelstrangbruch zu induzieren. Durch die Entwicklung einer so genannten *single guide RNA* (sgRNA), einer synthetisch erzeugten Chimäre, bestehend aus der *Target*-komplementären crRNA und der tracrRNA (s. Abbildung 9), konnte das System für die Anwendung in Eukaryoten weiter vereinfacht werden, da eine Bindung über die *Repeat*-Region der beiden RNAs hiermit entfällt. Somit werden für die Funktionalität des Systems lediglich zwei Komponenten, eine sgRNA sowie eine Cas9-Nuklease benötigt (Jinek et al., 2012; Makarova et al., 2020). Bei der Anwendung der CRISPR-Cas Methode in Prokaryoten werden die Sequenzen der Cas9-Nuklease sowie der crRNA und der tracrRNA mit Hilfe eines Plasmides in die Zellen eingebracht, weshalb die Synthese einer Chimäre hier keine ersichtlichen Vorteile mit sich brachte und zunächst keine Anwendung fand (Jiang et al., 2013; Oh & van Pijkeren, 2014).

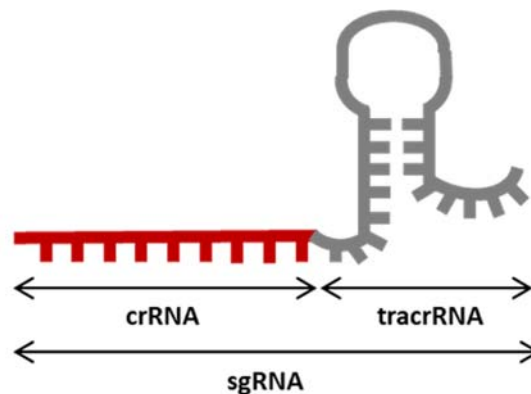


Abbildung 9: Chimäre sgRNA bestehend aus der *Target*-komplementären crRNA und der tracrRNA.

Die gezielte Induktion von Doppelstrangbrüchen, die es ermöglicht verschiedene Modifikationen wie Basendeletionen und Insertionen sowie einzelne Basenaustausche in die DNA von Lebewesen einzubringen, war bereits unter Verwendung anderer ortsspezifischer Nucleasen, wie den TALENs und den ZNFs möglich (Sander & Joung, 2014).

Ein großer Vorteil des CRISPR-Cas Systems besteht im Gegensatz zu den anderen SDN-Techniken jedoch darin, dass seine Spezifität nicht durch Protein-DNA-Interaktionen, sondern durch eine leicht an verschiedene Zielsequenzen anzupassende RNA-DNA-Interaktion be-

stimmt wird. Hierdurch entfällt die zeitaufwendige und kostenintensive Anpassung der Erkennungsregionen an die zu bindende DNA-Sequenz (s. auch Abschnitt 2.2) (Belhaj et al., 2013; Kim & Kim, 2014). Weitere Vorteile des CRISPR-Cas Systems sind, neben seiner leichten Anwendbarkeit, eine große Flexibilität sowie eine hohe Spezifität. Zudem ist es mit Hilfe dieser Technik und unter Bereitstellung von mehreren crRNAs möglich, mehrere Gene in einem Genom gleichzeitig zu editieren (Wilkinson & Wiedenheft, 2014).

Um das Genom eines Organismus zielgerichtet mittels der CRISPR-Cas9 Technologie zu modifizieren sind grundsätzlich drei Schritte notwendig:

1. Festlegung des chromosomalen DNA-Abschnittes und der Art der Modifizierung (Basendeletion, Baseninsertion oder Einzelbasenaustausch).
2. Induktion eines DNA-Doppelstrangbruches an der unter 1. beabsichtigten Stelle des Genoms.
3. Reparatur, d.h. ein erneutes Zusammenfügen der entstandenen doppelsträngigen DNA-Enden mit oder ohne Einführung einer modifizierten, "fremden", DNA-Sequenz.

Die *Protospacer*-Sequenz, nachfolgend im Kontext der molekularbiologischen Anwendung, als Zielsequenz oder auch *Target* bezeichnet, kann unter der Voraussetzung einer entsprechend assoziierten PAM-Sequenz (stromabwärts der Zielsequenz) frei gewählt werden. Für das Design der crRNA wird in der Regel ein DNA-Abschnitt von etwa 20 Basenpaaren ausgewählt. Abbildung 10 zeigt die Anwendung der CRISPR-Cas9 Methode zur Genom Editierung.

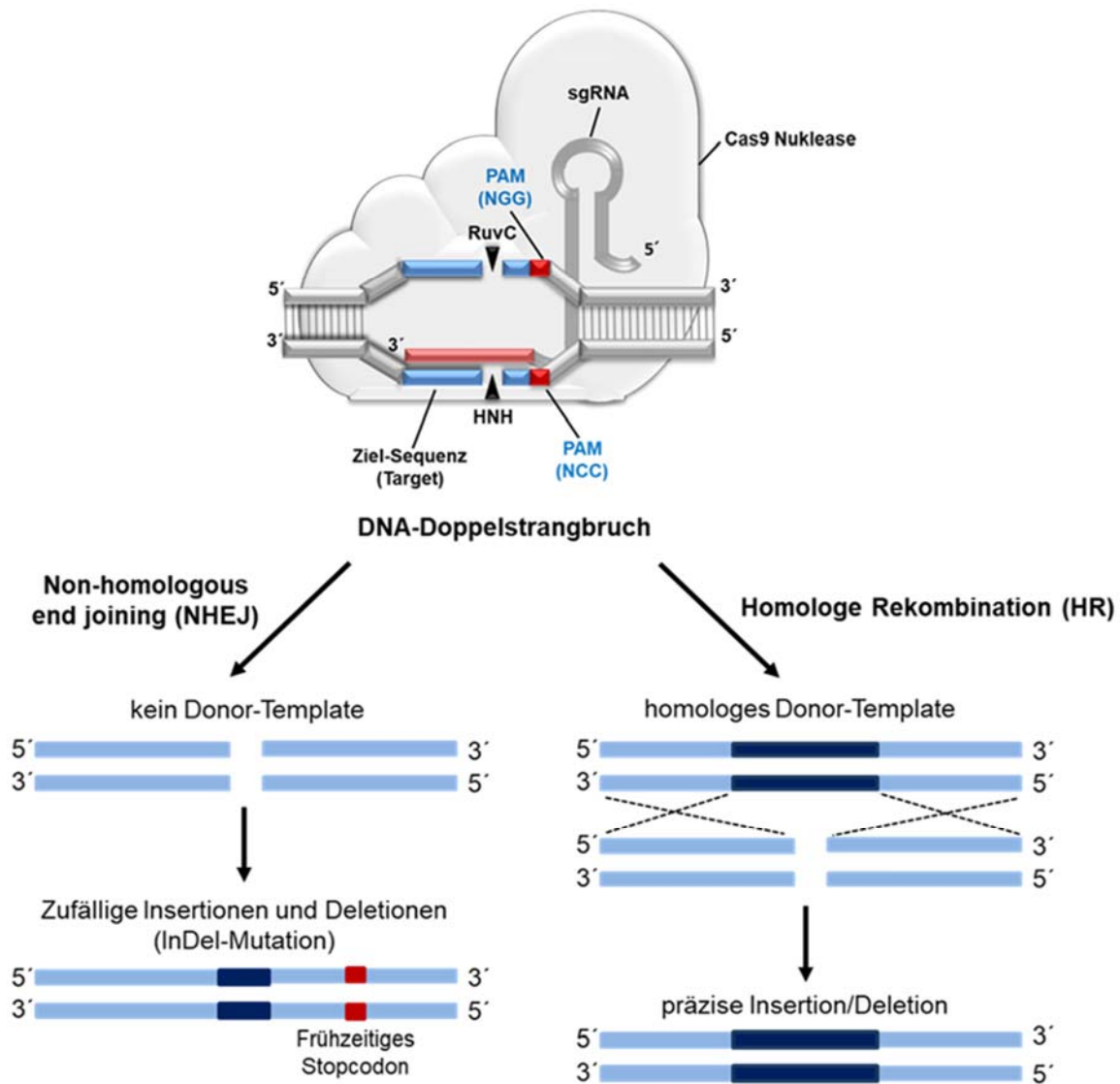


Abbildung 10: Induktion eines CRISPR-Cas9 vermittelten DNA-Doppelstrangbruchs und Generierung anschließender genetischer Veränderungen unter zu Hilfenahme der zelleigenen Reparatur- und Rekombinationsprozesse. Die tracrRNA (grau) und die *Target*-komplementäre crRNA (rot) liegen bei der molekularbiologischen Anwendung des CRISPR-Cas9 Systems in Eukaryoten bereits aneinandergelagert, in Form einer Chimäre, vor. Nach der Einführung eines zielgerichteten Doppelstrangbruchs in zu verändernden Organismus kann mittels HR und eines teilweise homologen *Donor-Templates* (die homologen Bereiche sind durch die gestrichelten Linien gekennzeichnet) eine präzise Baseninsertion bzw. Basendeletion (dunkelblau) vorgenommen werden. Wird kein *Donor-Template* in die Zelle eingebracht, kann es über eine Reparatur mittels des fehleranfälligen NHEJ in einigen Fällen zum Auftreten zufälliger InDel-Mutationen (dunkelblau) kommen. Diese InDel-Mutationen können wiederum einen *Frameshift* und somit die Entstehung einer oder mehrerer Stoppcodone (rot) im Zielgen bewirken. Abbildung in Anlehnung an Razzaq & Masood, 2018.

Der *Target*-komplementäre Abschnitt der sgRNA, die crRNA, leitet den sgRNA-Cas9 Komplex zunächst zum Zielbereich der genomischen DNA, die von einer PAM-Region (hier: 3'-NCC-5') flankiert wird. Bei erfolgreicher Bindung (Watson-Crick-Basenpaarung) des crRNA-Bereiches an die *Target*-DNA des zu verändernden Organismus kommt es zu einer Konformationsänderung der Cas9-Nuklease und einem, durch die beiden Nuklease-Domänen HNH und RuvC vermittelten DNA-Doppelstrangbruch etwa drei Nukleotide stromaufwärts der PAM-Region (Jinek et al., 2012; Nishimasu et al., 2014). Nach der Induktion eines glatten DNA-Doppelstrangbruchs werden die zelleigenen Reparatur- bzw. Rekombinationsmechanismen, das

NHEJ oder die HR genutzt, um Veränderungen in der DNA hervorzurufen. Wird, ähnlich wie beim HR-vermittelten *Targeting* oder bei der OgM, eine partial zur Zielsequenz homologe DNA-Vorlage als „Spender“ (eng. *Donor-Template*) in die Zelle eingeführt, so erfolgt die Reparatur des Doppelstrangbruches in einigen Fällen über den präzisen HR-Mechanismus. Durch das Einführen von Doppelstrangbrüchen in das Genom wird die Rekombination in der Zelle getriggert, so dass die Rekombinationsrate im Vergleich zur OgM und zum HR-vermittelten *Targeting* deutlich höher liegt (Choulika et al., 1995). Das *Donor-Template* kann in Form einer doppel- oder einzelsträngigen DNA vorliegen (Cobb et al., 2015; Huang et al., 2015; Jiang et al., 2013; Y. Jiang et al., 2015). Durch eine entsprechende Modifikation des *Donor-Templates* können sowohl Basendeletionen als auch Insertionen im Zielorganismus eingeführt werden. Wenn keine Reparaturvorlage in die Zelle eingebracht wird bzw. der HR-Mechanismus in dem entsprechenden Organismus nicht aktiv ist, werden die restriktierten DNA-Enden mit Hilfe des fehleranfälligen NHEJ wieder miteinander verbunden. Dies führt häufig zu einem heterogenen Pool von Insertionen und Deletionen (Indel-Mutationen) und häufig zu einer Verschiebung des Leserasters auf dem Gen (*Frameshift*). Diese *Frameshifts* begünstigen wiederum das Entstehen frühzeitiger Stopcodone, die zu einem Abbruch der Translation und somit zum gewünschten *Knockout* im Zielgen führen (Bibikova et al., 2002; Rouet et al., 1994; Solomon & Puchta, 1998). Auf den genauen Ablauf der beiden hier genannten Reparatur- bzw. Rekombinationsmechanismen wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

2.2.3 Mechanismen der Reparatur und Rekombination von DNA in Prokaryoten

Ein DNA-Doppelstrangbruch stellt für die Wirtszelle einen der schwersten Schäden dar und würde ohne Reparatur zum Zelltod führen (Bennett et al., 1993). Um diesem Schicksal zu entgehen, besitzen eukaryotische Zellen unter anderem zwei Mechanismen zur Reparatur von DNA: Das NHEJ und die HR. Diese beiden zellinternen Mechanismen werden bei der Genom Editierung mittels der CRISPR-Cas9 Technologie genutzt, um genetische Modifikationen einzuführen. Bei Eukaryoten stellt das NHEJ das dominierende Reparatursystem dar. Im Gegensatz dazu besitzen die meisten Prokaryoten keinen bzw. nur einen temporär aktiven NHEJ-Mechanismus (Michel & Leach, 2012; Wilson et al., 2003; Wyman & Kanaar, 2006). Während *E. coli* zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ausschließlich auf die HR angewiesen ist, weisen einige Bakterien wie beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis* und *B. subtilis* zusätzlich eine rudimentäre NHEJ-Maschinerie auf. Diese besteht aus zwei Proteinen, der multifunktionalen ATP-abhängigen Ligase LigD und dem Protein Ku, die gemeinsam DNA-Enden schützen, verarbeiten und ligieren (Della et al., 2004; Gong et al., 2004; Weller et al., 2002; Wilson et al., 2003). Das NHEJ-Reparatursystem ist u.a. in *B. subtilis* lediglich während der Sporulationsphase aktiv. Während dieser Phase ist es für das Bakterium nicht möglich, DNA-Schäden mittels HR zu reparieren, da nur eine chromosomale Kopie der DNA vorliegt und

somit die notwendige Reparaturvorlage in Form einer intakten Kopie des Genabschnittes (Genomäquivalents) fehlt (Moeller et al., 2007; Vega, 2013; Wang et al., 2006). Der HR-Mechanismus ist nicht nur für die Bewahrung der Genomintegrität durch die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen von Bedeutung, er ist des Weiteren grundlegend für die genetische Diversifikation von bakteriellen Genomen. So erlaubt er bei Bakterien die Integration von DNA, die beispielsweise durch eine Aufnahme aus dem umgebenen Medium (Transformation) oder durch die zeitweise Verbindung zweier Bakterienzellen (Konjugation) in die Zelle gelangt ist (Lorenz & Wackernagel, 1994; Smith, 1991). Auch die Rekombination mit fremder bakterieller DNA, die über eine Transfektion mit einem Phagen erhalten wurde, ist möglich. Dieses natürliche Rekombinationsvermögen von Bakterien wurde bereits vor der Entdeckung von zielspezifischen-Nukleasen und der Einführung gezielter Doppelstrangbrüche technologisch genutzt, um mit Hilfe von *Donor-Templates* genetische Veränderungen in Bakterien zu erzielen. Anhand von Abbildung 11 ist die Funktionsweise der beiden Reparatur- bzw. Rekombinationsmechanismen in Bakterien dargestellt.

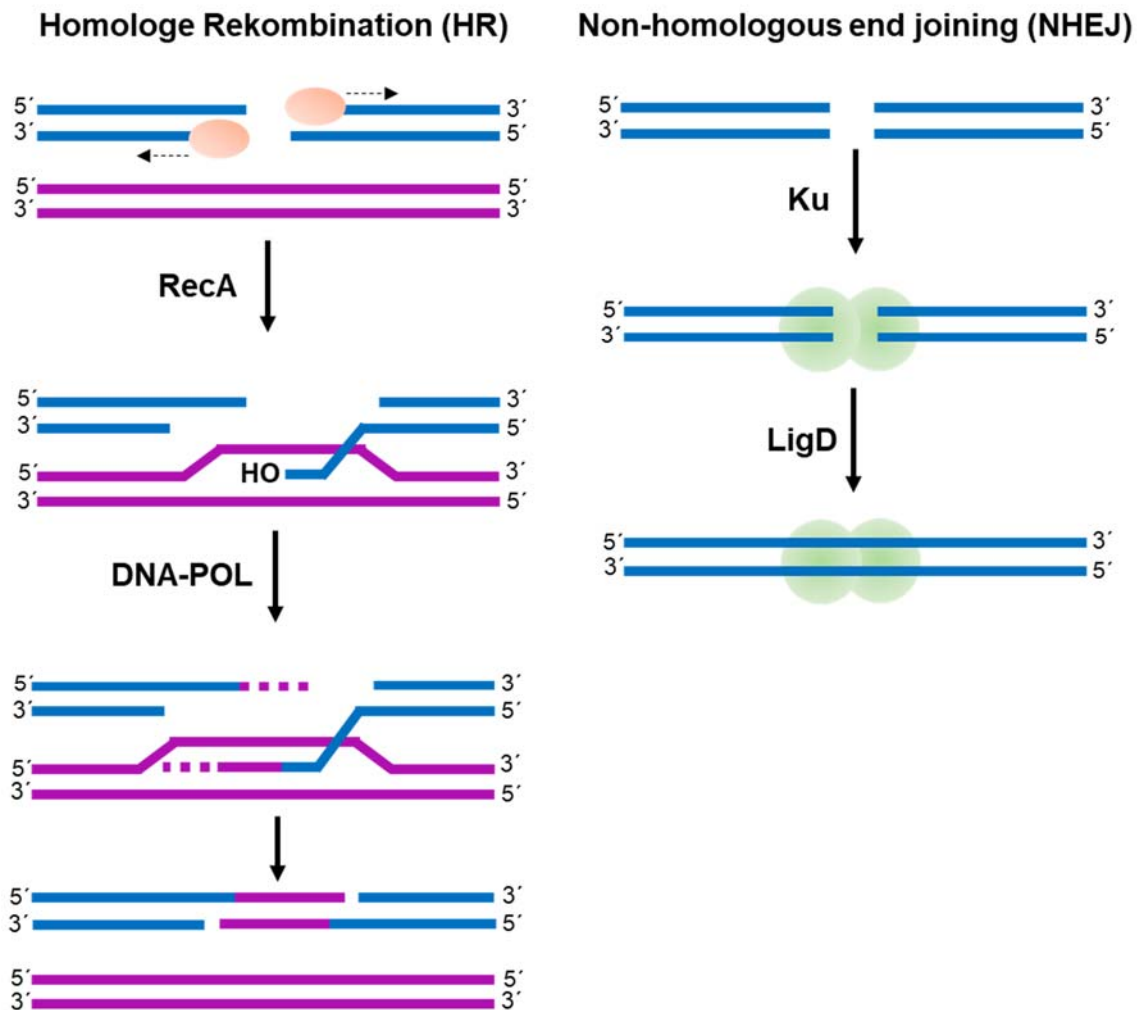


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Homologen Rekombination (HR) und des non-homologous end joinings (NHEJ) bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen bzw. bei der Rekombination von DNA. Bei der HR werden ein oder beide Enden des DNA-Doppelstrangbrüches (blau) zunächst durch eine Helikase entwunden und dann durch eine 5'-3'-Exonuklease (orange) restriktiert und es entstehen einzelsträngige Überhänge an den 3'-OH-Enden. In *E. coli* katalysiert der Multiprotein-Komplex RecBCD diese Reaktion, in *B. subtilis* der Enzymkomplex AddAB (Rocha et al., 2005). Vermittelt durch das bakterielle Protein RecA kommt es zu einer Stranginvasion des längeren OH-Endes in das intakte homologe Genomäquivalent (magenta) bzw. bei einer technologischen Anwendung, in das synthetisch erzeugte *Donor-Template*. Der eindringende, blaue Strang dient hierbei als Primer für eine DNA-Polymerase (DNA-POL), welche die magentafarbene Chromatidinformation über die Bruchstelle hinaus kopiert. Der zweite verlängerte Strang bindet aufgrund der Basenhomologie ebenfalls an das magentafarbene Template und wird über die DNA-Polymerase verlängert. Nach der Auflösung der als Holliday-Struktur (eng. *Holliday junction*) bezeichneten Verknüpfung der Rekombinationsintermediate, ist der Doppelstrangbruch korrigiert. Die verbleibenden Einzelstrangkerben im reparierten Duplex werden höchstwahrscheinlich durch replikative DNA-Ligasen verschlossen (Lusetti & Cox, 2002; Shuman & Glickman, 2007). Ein solcher Austausch von DNA-Abschnitten zwischen zwei DNA-Molekülen wird auch als *Crossing-over* bezeichnet. Es konnte noch nicht vollständig geklärt werden, wodurch die Rekombination der intakten chromosomalen DNA mit der durch beispielsweise Transformation, Konjugation oder Transfektion eingebrachten Fremd-DNA getriggert wird, bzw. falls diese durch Strangbrüche initiiert wird, welche zellulären Prozesse daran beteiligt sind. Bekannt ist, dass Abschnitte der chromosomalen DNA als einzelsträngige DNA (eng. *single stranded DNA*; ssDNA) vorliegen müssen. Diese ssDNA-Abschnitte können beispielsweise durch eine unvollständige Replikation oder durch den Abbau eines Strangabschnittes durch Exonukleasen entstehen. Der weitere Verlauf der DNA-Rekombination unterscheidet sich nicht wesentlich von dem der DNA-Reparatur (Lovett et al., 2002). Beim NHEJ ist kein homologes Genomäquivalent für die Reparatur des Doppelstrangbrüches erforderlich. Der Doppelstrangbruch wird durch das die DNA-Enden bindende Protein Ku (grün) angenähert und anschließend durch die DNA-Ligase LigD ligiert. Während die DNA-Reparatur über den HR-Mechanismus in der Regel fehlerfrei verläuft, kann diese beim NHEJ mutagen sein. Dies ist davon abhängig, ob die DNA-Enden direkt wieder miteinander verbunden werden oder ob diese zuvor durch Nukleasen oder Polymerasen modifiziert wurden (Bertrand et al., 2019; Brissett et al., 2007; Shuman & Glickman, 2007). Abbildung in Anlehnung an Shuman & Glickman, 2007.

2.2.4 Besonderheiten bei der Anwendung des CRISPR-Cas9 Systems in Prokaryoten

Das CRISPR-Cas9 System wurde bereits in zahlreichen eukaryotischen Organismen wie beispielsweise humanen Zellen, Zebrafischen, Schweinen, Reis, Weizen, Champignons, Würmern und Hefen angewendet (Hruscha et al., 2013; Kildegaard et al., 2019; Kim et al., 2018; Liu et al., 2014; Sakuma et al., 2014; Waltz, 2016; Whitworth et al., 2014; Zhou et al., 2014). Obwohl die Methoden zur Genom Editierung in Bakterien limitiert sind und häufig den Nachteil einer geringen Mutationseffizienz aufweisen, hat sich die CRISPR-Cas-basierte Genombearbeitung nur langsam auf die Anwendung in prokaryotischen Modelorganismen oder industriell relevanten Bakterien ausgeweitet (Vento et al., 2019).

Im Jahre 2013 wurde das CRISPR-Cas System von Jiang et al. erstmals in Prokaryoten (*E. coli* und *Streptococcus pneumoniae*) erfolgreich angewendet. In den darauffolgenden Jahren wurde seine Anwendung auf weitere Bakterien der Gattungen *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* und *Streptomyces* erweitert (Altenbuchner, 2016; Chen et al., 2017; Huang et al., 2015; Huang et al., 2016; Leenay et al., 2019; van der Els et al., 2018; Wirth et al., 2020). Der Grund für die im Vergleich zu Eukaryoten weniger intensiv genutzte Anwendung des CRISPR-Cas Systems könnte eventuell in der Ineffizienz der Bakterienstämme zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen liegen, die durch die CRISPR-Cas Technologie eingeführt werden. Das Fehlen eines effektiven NHEJ-Mechanismus während der vegetativen Wachstumsphase der Bakterien hat zur Folge, dass bei der Anwendung des CRISPR-Cas Systems zur Genom Editierung ein synthetisch erzeugtes *Donor-Template* zwingend Vorhandensein muss, da die Zellen andernfalls infolge des Doppelstrangbruches sterben. Im Gegensatz zu natürlich (beispielsweise durch UV-Licht) entstehenden DNA-Doppelstrangbrüchen, werden bei der Anwendung von zielgerichteten Nukleasen, wie der Cas9-Nuklease, in der Regel alle in der Zelle vorhandenen Genomäquivalente des Chromosoms mit der entsprechenden Zielsequenz und der PAM-Region gespalten, sodass für die Reparatur kein intaktes Genomäquivalent mehr zur Verfügung steht. Das *Donor-Template* besteht für gewöhnlich aus homologen, die Zielsequenz flankierenden Armen sowie einer veränderten Zielsequenz und/oder einer modifizierten bzw. deletierten PAM-Region (Jiang et al., 2013). Neben der gewünschten genetischen Veränderung ist eine Modifikation der Zielsequenz und/oder der PAM-Region notwendig, damit die Zellen, welche die Modifikation auf ihrem Genom eingebaut haben, nicht weiterhin von der Cas9-Nuklease attackiert werden. Der genaue Editiermechanismus, der die genetischen Modifizierungen in das Chromosom der Bakterien einbringt, ist noch nicht vollständig geklärt und variiert vermutlich (Vento et al., 2019). Eventuell kommt es durch die Induktion des DNA-Doppelstrangbruches durch die Cas-Nukleasen, unter anderem zu einer getriggerten Reparatur mittels HR.

Einen vermutlich größeren Einfluss auf die Modifizierung des Genoms der Prokaryoten hat jedoch die HR der noch intakten DNA mit dem *Donor-Template*. Es wird angenommen, dass das CRISPR-Cas System bei Prokaryoten vorwiegend als Rekombinations-Induktor und als Gegenselektionswerkzeug (eng. *counter-selection tool*) fungiert, dass die Zellen, die noch eine intakte *Target*-Sequenz aufweisen, eliminiert (Jiang et al., 2013; Vento et al., 2019). Dies hat den Vorteil, dass ein aufwendiges *Screening* der überlebenden Bakterienzellen auf die gewünschte Mutation theoretisch entfällt und der Einbau von *Screening*-Markern, wie beispielsweise Antibiotika-Resistenzgenen, nicht zwingend erforderlich ist. Die Marker-freie genetische Manipulation von Bakterien ist für viele Anwendungen sehr wünschenswert, da der extensive Einsatz von selektiven Markern zu mehreren unerwünschten Effekten führen kann. Darüber hinaus kann die Generierung konsekutiver Genommutationen aufgrund der begrenzten Anzahl der verfügbaren Marker eine Herausforderung darstellen (Jiang et al., 2013; Mougiakos et al., 2016). Die homologen *Donor-Templates* werden abhängig vom jeweiligen Bakterienstamm und der Art der gewünschten Modifikation entweder mit Hilfe eines Plasmids oder in Form von linearer ssDNA oder linearer doppelsträngiger DNA (eng. *double stranded DNA*; dsDNA) in die Zelle eingebracht. Die Integration der *Donor-Templates* erfolgt dann zumeist durch HR-vermittelte *Crossing-overs* (siehe auch Abschnitt 2.2.3). Einige Prokaryoten, wie beispielsweise *E. coli*, weisen jedoch nur eine sehr geringe natürliche Rekombinationsrate auf. In diesen Fällen muss zusätzlich ein auf Rekombinationsproteinen basierendes System aus dem Bakteriophagen Lambda oder dem Prophagen Rac verwendet werden, um eine effiziente Rekombination des bakteriellen Chromosoms mit dem *Donor-Template* zu gewährleisten (Ellis et al., 2001; Hamilton et al., 1989; Murphy, 1998). Die von Rekombinasen aus Phagen vermittelte Rekombination verläuft unabhängig vom bakteriellen HR-Mechanismus und wird bereits seit Jahren als Methode des so genannten *Recombineerings* in Bakterien angewendet (Murphy, 1998; Zhang et al., 1998). Beide Rekombinations- bzw. *Recombineering*-Methoden hatten bisher den Nachteil, dass nur eine geringe Mutationseffizienz erzielt werden konnte und ohne das Einführen von Markern aufwendige *Screenings* notwendig waren, um die Zellen, die die Mutation enthalten, zu identifizieren. Durch eine Kombination der bereits existierenden Rekombinationstechniken mit der neuen CRISPR-Cas9 Methode kann sowohl die Rekombinationsrate (Anzahl der rekombinierten Zellen im Verhältnis zur Gesamtpopulation) als auch die Rekombinationseffizienz (Anzahl der rekombinierten Zellen im Verhältnis zur Anzahl der unter selektierten Bedingungen erhaltenen Zellen) deutlich erhöht und das nachfolgende *Screening* auf genetisch veränderte Zellen wesentlich erleichtert werden (Chung et al., 2017; Jiang et al., 2013; Mougiakos et al., 2016; Oh & van Pijkeren, 2014).

3 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit CRISPR-Cas9 vermittelten *Knockouts* zur Identifizierung der essenziellen Phosphatasen der Riboflavinbiosynthese in *B. subtilis* und ist in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil der Arbeit soll das CRISPR-Cas9 System im Modelorganismus *E. coli* angewendet werden. Da das System zu Beginn dieser Arbeit relativ neu war und seine Anwendung in Prokaryoten bisher nur in wenigen wissenschaftlichen Arbeiten beschrieben wurde, sollte dieses zunächst anhand eines einfach zu kultivierenden Bakteriums im Arbeitskreis etabliert werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte dieses System dann auf den in Bezug auf Riboflavin wirtschaftlich und technologisch bedeutsamen Organismus *B. subtilis* übertragen werden. Nach erfolgreicher Adaption der Methode auf *B. subtilis* soll das System genutzt werden, um die drei von Sarge et al. identifizierten HAD-Phosphatasen, die mit einer hohen enzymatischen Aktivität die Umsetzung von 5-Amino-6-Ribityl-amino-2,4(1*H*,3*H*)-Pyrimidindion 5'-Phosphat (ARPP) zu 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion (ARP) katalysieren, einzeln und kombinatorisch auszuschalten.

3.1 Vorgehen zur Anwendung der CRISPR-Cas9 Technologie in *E. coli*

Im Jahre 2015 wurde erstmals von Jiang und Kollegen eine Forschungsarbeit über die Entwicklung eines Plasmid-basierenden CRISPR-Cas9 Systems zur Anwendung in *E. coli* veröffentlicht (Y. Jiang et al., 2015). Das Plasmid-System sollte in dieser Arbeit verwendet werden, um mehrere genetische Veränderungen in das Genom des *E. coli*-Stammes BL21(DE3) einzuführen und somit die CRISPR-Cas9 Technologie innerhalb des Arbeitskreises zu etablieren. Für eine Anwendung und Etablierung des CRISPR-Cas9 Systems waren mehrere Schritte notwendig, die im Folgenden anhand eines Ablaufschemas (Abbildung 12) erläutert werden.

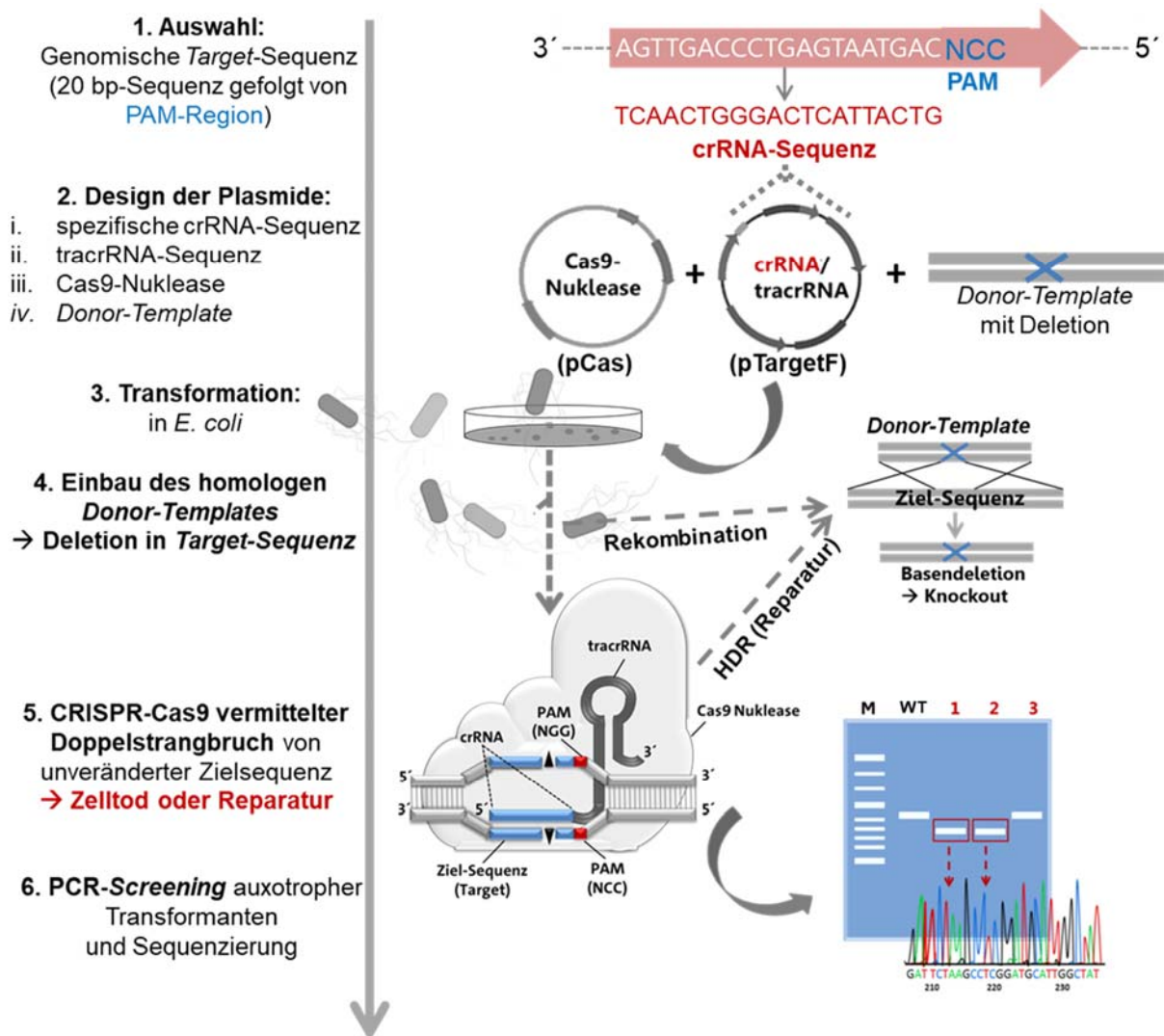


Abbildung 12: Ablaufschema zur Anwendung der CRISPR-Cas9 Technologie in *E. coli*.

Zunächst musste in Schritt 1 eine geeignete, 20 Basenpaare umfassende *Target*-Sequenz in dem Gen ausgewählt werden, in dem die gewünschte Modifikation eingeführt werden sollte. Da im zweiten Teil dieser Arbeit *Knockouts* in Genen generiert werden sollten, die möglicherweise für die Biosynthese von Riboflavin essenzielle Enzyme kodieren, wurden hier Gene der Riboflavinbiosynthese ausgewählt, von denen bereits bekannt war, dass ihre Funktion für die Synthese von Riboflavin zwingend erforderlich ist. Es sollten die Gene *ribA* (GTP-Cyclohydrolase II), *ribB* (Mutase) und *ribC* (Riboflavinsynthase) ausgeschaltet werden. Um das Risiko von *Off-Target*-Reaktionen zu minimieren, sollten zunächst Kriterien ermittelt werden, die für die Spezifität der crRNAs von Bedeutung sind. Ebenso sollte ermittelt werden, welche Kriterien eine crRNA aufweisen sollte, damit sie effizient an ihr *Target* bindet und einen Doppelstrangbruch induziert. In Schritt 2 musste das auf den beiden Plasmiden pCas und pTargetF basierende CRISPR-Cas9 System von Jiang et al. modifiziert werden. Das Plasmid pTargetF, das für die crRNA (i) und die tracrRNA (ii) codiert, musste so verändert werden, dass die enthal-

tende crRNA-Sequenz gegen die in Schritt 1 ausgewählte crRNA-Sequenz ausgetauscht werden konnte. Dieser „Austausch“ der spezifischen crRNA-Sequenz musste für jedes Zielgen erneut erfolgen. Daher soll hierfür eine Methode gewählt werden, die möglichst effizient und wenig zeitintensiv ist. Neben den beiden Plasmiden, die alle notwendigen Komponenten des CRISPR-Cas9 Systems enthalten, musste zudem ein *Donor-Template* (iv) synthetisiert werden. Dieses sollte in Form einer linearen dsDNA in die Zelle eingebracht werden. Um später sicherzustellen, dass das jeweilige Zielgen effizient ausgeschaltet wird, sollten möglichst große Bereiche des Genes deletiert werden. Insbesondere in Bezug auf das weitere Vorhaben, war das Einbringen von großen Deletionen in das jeweilige Zielgen von Bedeutung, da es sich bei den von Sarge et al. identifizierten HAD-Phosphatasen, um noch nicht umfangreich erforschte Proteine handelt und daher nur wenige Erkenntnisse darüber vorliegen, welche Aminosäuren einen Effekt auf die enzymatische Aktivität dieser Enzyme aufweisen. Die Größe der Deletionen sollten für die *Knockouts* der Gene *ribA*, *ribB* und *ribC* schrittweise erhöht werden, um zu evaluieren, ob diese effizient in den Zielgenen induziert werden können. Die Herstellung der *Donor-Templates*, die eine modifizierte Version der jeweiligen chromosomalen DNA-Abschnitte von *ribA*, *ribB* und *ribC* darstellen, sollte mit Hilfe einer geeigneten Methode der Polymerase-Kettenreaktion (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) erfolgen. Um alle für die Genom Editierung benötigten Komponenten in die Zellen einzubringen, musste in Schritt 3 eine Transformationsmethode gewählt werden. Je höher die Anzahl der Zellen ist, die nach der Transformation erfolgreich alle benötigten Komponenten aufgenommen haben (Transformationsrate), desto größer wird die Wahrscheinlichkeit sein, dass einige dieser Zellen anschließend die gewünschte Mutation enthalten. Daher sollen hier Methoden bevorzugt werden, die hohe Transformationsraten gewährleisten können. Nach Ablauf der, in den Zellen vermutlich simultan ablaufenden Schritte 4 und 5, bei denen die transformierten Komponenten des CRISPR-Cas9 Systems in einigen Zellen die gewünschte Deletion induzieren (s. hierzu auch Abschnitt 2.2.3 und 2.2.4), musste in Schritt 6 eine Untersuchung der überlebenden Zellen auf die jeweilige Mutation erfolgen. Hierzu sollte zunächst ein Großteil der Transformanten in einem Wachstumstest auf eine Riboflavin-Auxotrophie geprüft werden. Bei einem erfolgreichen *Knockout* der jeweiligen Riboflavinbiosynthese-Gene, sollten die mutierten Zellen aufgrund ihrer Riboflavin-Abhängigkeit, lediglich auf den Agar-Platten Wachstum zeigen, denen Riboflavin zugesetzt wurde. Mittels einer Kolonie-PCR könnten diese Zellen anschließend auf die Mutation getestet werden. Bakterienzellen, die die Deletion aufweisen, sollten im Vergleich zum Wildtyp (WT), ein um die jeweilige Größe der Deletion verkürztes DNA-Fragment aufweisen. Die Bestätigung der korrekten Mutation einer im PCR-*Screening* positiv getesteten Zelle, kann anschließend anhand der SANGER-Sequenzierung erfolgen.

3.2 Kombinatorische *Knockouts* der putativen Phosphatase(n) in *B. subtilis*

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll das zuvor im Modelorganismus etablierte CRISPR-Cas9 System auf den wirtschaftlich und technologisch bedeutsamen Riboflavinproduzenten *B. subtilis* adaptiert werden. Bei der Adaption der Methode auf das grampositive Bakterium *B. subtilis* ist zu beachten, dass für dieses, aufgrund seiner im Vergleich zu gramnegativen Bakterien etwa zehn Mal dickeren Zellwand (Mureinschicht), wesentlich geringere Transformationsraten erzielt werden können. Daher muss zunächst eine effiziente Methode zur Transformation von DNA in *B. subtilis* gefunden werden.

Nach der erfolgreichen Adaption der CRISPR-Cas9 Methode in *B. subtilis* soll diese genutzt werden, um die drei für die HAD-Phosphatasen codierenden Gene *ycsE*, *yitU* und *ywtE* einzeln und kombinatorisch auszuschalten. Die so generierten *Knockout*-Mutanten sollen im Anschluss auf eine Riboflavin-Auxotrophie getestet und ggf. biochemisch weiter charakterisiert werden. Des Weiteren soll die Gesamtgenomsequenzierung einer mittels CRISPR-Cas9 erzeugten *B. subtilis* Mutante erfolgen, um zum einen die gezielt eingebrachten genomischen Modifikationen nachzuweisen und zum anderen Aufschluss über möglicherweise aufgetretene *Off-Target*-Mutationen zu erhalten.

4 Ergebnisse und Diskussionen

4.1 Etablierung der CRISPR-Cas9 Technologie in *E. coli*

In diesem Abschnitt sollte das CRISPR-Cas9 System zunächst im Bakterium *E. coli* BL21(DE3) etabliert werden. Wie eingangs erwähnt sollte das von Y. Jiang et al. (2015) entwickelte Zwei-Plasmid-System bestehend aus pCas und pTargetF (Vektorkarten s. Anhang 2) verwendet werden, um auf genomischer Ebene die essenziellen Riboflavinbiosynthese-Enzyme RibA (GTP-Cyclohydrolase II), RibB (Mutase) und RibC (Riboflavinsynthase) auszuschalten. Dabei wurde die Größe der Basen-Deletionen für die *Knockouts* der jeweiligen Gene schrittweise erhöht, um zu evaluieren bis zu welcher Größe diese effizient in den Zielgenen induziert werden können.

4.1.1 Auswahl geeigneter CRISPR-Cas9 *Target*-Sequenzen

Es hat sich gezeigt, dass die Auswahl der *Target*-Sequenz bzw. das Design der crRNA-Sequenz sowohl für die Spezifität als auch die Effizienz von CRISPR-Cas9 vermittelten Doppelstrangbrüchen von Bedeutung ist (Hsu et al., 2013; Jinek et al., 2013). In den letzten Jahren wurden daher verschiedene experimentelle Ansätze sowie bioinformatische Methoden veröffentlicht, um crRNA-Sequenzen mit reduzierten *Off-Target*-Effekten und einer hohen Effizienz entwickeln zu können (Chuai et al., 2018; Doench et al., 2014; Doench et al., 2016; Hsu et al., 2013; Kocak et al., 2019; Tycko et al., 2016). Wie bereits beschrieben, hat sich die Anwendung des CRISPR-Cas9 Systems zur Genom Editierung in Prokaryoten im Vergleich zur Anwendung in eukaryotischen Organismen nur langsam durchgesetzt (Vento et al., 2019). Die zu Beginn dieser Arbeit verfügbaren Studien, die sich mit der Ermittlung von spezifischen und effizienten crRNAs beschäftigten und zur Entwicklung entsprechender Vorhersagealgorithmen führten, weisen daher die Limitation auf, dass sie ausschließlich auf experimentell erzeugten Datensätzen von eukaryotischen Zellen basieren.

Die Auswahl geeigneter *Target*-Sequenzen bzw. das Design der 20-Nukleotide umfassenden crRNAs für die *Knockouts* der Riboflavinbiosynthese-Gene *ribA*, *ribB* und *ribC* erfolgte in dieser Arbeit unter Verwendung des Online-Tools CRISPR-ERA (s. 6.3, Tabelle 11 und Abschnitt 7.4). Die Software verwendet einen Algorithmus für die Suche nach CRISPR-Cas9 *Target*-Sequenzen und bewertet deren Effizienz (E-Score) und Spezifität (S-Score) unter Verwendung eines Regelsatzes, der aus aktuellen, publizierten Daten zusammengefasst wurde (Liu et al., 2015) und unter Abschnitt 7.4 näher eräutert wird. CRISPR-ERA ermöglicht im Gegensatz zu den meisten verfügbaren Anwendungen, neben der Suche nach eukaryotischen *Target*-Sequenzen, auch die Auswahl von *Target*-Sequenzen für eine Anwendung in bakteriellen Genomen wie *E. coli* und *B. subtilis*.

Die Studienergebnisse, die für die Bewertung der jeweiligen Spezifität und Effizienz der *Target*-Sequenzen von der Software verwendet werden, basieren jedoch wie bereits oben erwähnt, auf experimentell erzeugten Datensätzen von eukaryotischen Zellen. Die *Target*-Sequenzen werden anschließend als resultierende crRNA-Sequenzen absteigend nach der Summe von E-Score und S-Score (maximal 20) geordnet, angezeigt. Zudem lassen sich die exakte Position der Sequenz und der jeweilige *Target*-Strang (+/-) ablesen. Bei der Auswahl einer geeigneten crRNA-Sequenz wurden nach Möglichkeit die Sequenzen berücksichtigt, die einen maximalen Score von 20 aufwiesen. Diese Sequenzen waren gekennzeichnet durch einen mittleren GC-Gehalt (25-75%) einer geringen Entfernung der TSS des Zielgens (maximal +300 bp) und einer hohen Spezifität (keine identischen genomischen Sequenzen unter Berücksichtigung der PAM-Region (5'-NRG-3', R = A oder G und 1-3 Basen-*Mismatches*). Eine geringe Entfernung der *Target*- bzw. crRNA-Sequenz von der TSS des Zielgens ist ein wichtiger Aspekt bei der Generierung von effektiven *Knockouts*, da die geplanten Basen-Deletionen, die zu *Frameshifts* und möglicherweise zur Entstehung von Stopcodonen führen, möglichst die Translation eines großen Bereichs der Gensequenz verhindern sollten. Neben diesen von CRISPR-ERA berücksichtigten Kriterien wurden zudem nur crRNA-Sequenzen ausgewählt, die nicht mehr als zwei aufeinanderfolgende Thymidin-Nukleotide aufwiesen (*Poly-T*-Sequenzen), da bekannt war, dass diese möglicherweise zu geringeren *On-Target*-Aktivitäten führen (Wu et al., 2014).

In Abbildung 13 ist ein Ausschnitt der mit Hilfe des Online-Tools CRISPR-ERA ermittelten crRNA-Sequenzen (hier: sgRNA *sequence*) für die *Knockouts* von *ribA*, *ribB* und *ribC* dargestellt. Die resultierenden *Target*-Sequenzen mit den dahinterliegenden PAM-Regionen sind unter 6.7 aufgeführt. Für die *Knockouts* von *ribB* und *ribC* wurden jeweils zwei crRNA-Sequenzen ausgewählt, da im weiteren Verlauf der Arbeit festgestellt wurde, dass einige crRNAs nicht effizient an die *Target*-Sequenz binden bzw. keinen Doppelstrangbruch induzieren.

Diese werden fortan entsprechend ihrer Reihenfolge in Abbildung 13 und ihrer Entfernung zur TSS als *ribB1* (ID 31) und *ribB2* (ID 41) bzw. *ribC1* (ID 21) und *ribC2* (ID 8) bezeichnet. Bei der Auswahl der jeweiligen crRNA-Sequenzen wurde darauf geachtet, dass diese in unmittelbarer Nähe zueinander lagen, damit die entsprechenden unter 4.1.3 hergestellten *Donor-Templates* (DT*riB* und DT*riC*) ohne weitere Modifikationen für beide CRISPR-Cas9-Versuche verwendet werden konnten. Während die ausgewählten crRNA-Sequenzen für die Gene *ribA* und *ribC* einen maximalen E+S Score aufwiesen, konnten für *ribB* lediglich geeignete crRNA-Sequenzen ermittelt werden, welche mehr als 300 bp hinter der TSS lagen und somit einen E+S-Score von 15 aufwiesen. Da für RibB jedoch bereits bekannt war, dass es auch am N-terminalen Ende mehrere kritische Aminosäuren aufweist, welche für die enzymatische Aktivität des Enzyms essenziell sind (s. auch Abschnitte 4.1.3 und 4.1.5.2), wurde die höhere Entfernung zum TSS als unproblematisch eingestuft. Alle hier ausgewählten crRNA-Sequenzen

lagen auf einem 5'-3'-DNA-Strangabschnitt und sollten später mittels komplementärer Basenpaarung an den jeweiligen 3'-5'-DNA-Strangabschnitt (+) binden. Da die in der Anwendung hinterlegte Genomsequenz von einem anderen *E. coli*-Stamm (*E. coli* K-12 MG1655, NCBI-Zugangsnummer: NC_000913) stammt als der in dieser Arbeit zur Genom Editierung verwendete Stamm (*E. coli* BL21(DE3)), wurden die ausgewählten *Target*-Sequenzen mit Hilfe des BLAST- (*Basic Local Alignment Search Tool*) Algorithmus mit der Gensequenz des jeweiligen Zielgens von *E. coli* BL21(DE3) (NCBI-Zugangsnummer: CP001509.3) verglichen, um sicherzustellen, dass diese identisch sind.

ID	sgRNA sequence	Target Gene	Distance to TSS	Location	Strand	E score	S score	E+S score
25	GCCAAACTGCCAACCCCATG	ribA	+44	1339116	+	20	0	20
31	ATTGATCTGATGACGCTGGC	ribB	+491	3183975	+	15	0	15
41	GACTAATGACGATGGCACGA	ribB	+544	3183922	+	15	0	15
21	GGTGCTTCCGTGGCGCATAA	ribC	+134	1743108	+	20	0	20
8	ATTGGCGGACACTTAATGTC	ribC	+299	1742943	+	20	0	20

Abbildung 13: crRNA-Sequenzen (hier sgRNA sequence) für den *Knockout* der Enzyme RibA, RibB und RibC, welche mit Hilfe des CRISPR-ERA Online-Tools und unter den oben aufgeführten Bedingungen ausgewählt wurden.

4.1.2 Einbringung der ausgewählten crRNA-Sequenzen zur Herstellung der Plasmide pTargetF-*ribA*, pTargetF-*ribB1/B2*, pTargetF-*ribC1/C2*

In diesem Abschnitt sollte das Plasmid pTargetF (Vektorkarte s. Anhang 2, DNA-Sequenz: Addgene # 62226), das u.a. für die crRNA und die tracrRNA codiert, so verändert werden, dass die im Plasmid enthaltene *Target*-spezifische crRNA-Sequenz gegen jeweils eine der unter 4.1.1 ausgewählten crRNA-Sequenzen ausgetauscht werden kann (s. Ablaufschema unter 3.1, Abbildung 12, Schritt 2). Die entsprechende Modifizierung der Plasmid-DNA erfolgte für die Herstellung von pTargetF-*ribA* zunächst mit Hilfe einer Klonierung. Hierzu wurde das *Insert* (129 bp) über zwei konsekutive PCR-Reaktionen hergestellt (s. 7.2.7.3). Das *Insert* enthielt die 20 bp-umfassende DNA-Sequenz der für den *Knockout* von *ribA* ausgewählten crRNA sowie die für das CRISPR-Cas9 System aus *S. pyogenes* spezifische DNA-Sequenz der tracrRNA und jeweils eine Schnittstelle für die Restriktionsendonukleasen *SpeI* und *EcoRI* zur späteren Klonierung in das Plasmid. Die Sequenz des crRNA/tracrRNA-*Inserts* ist in Anhang 4 aufgeführt. Das resultierende PCR-Amplifikat (crRNA/tracrRNA-*Insert*) wurde wie unter 7.2.7.3 beschrieben mit Hilfe einer Klonierung in das Plasmid pTargetF eingebracht. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels einer Kolonie-PCR (s. 7.2.7.1) und den zur Herstellung des *Inserts* verwendeten äußeren Primern *ribA2fw* (eng. *forward*, fw) und *ribAr* (eng. *reverse*, r) (Primersequenzen s. Anhang 3, Tabelle 45) überprüft. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe der AGE (s. 7.2.8) und unter Verwendung eines 3%igen Agarosegels analysiert. Alle in

der Kolonie-PCR getesteten Transformanten (1-4), zeigten eine Bande bei ca. 130 bp und enthielten somit das rekombinante Plasmid (pTargetF-*ribA*) mit dem gewünschten crRNA/tracrRNA-*Inserts* (s. Elektropherogramm in Abbildung 14). Die Negativ-Kontrolle zeigte keine DNA-Bande, wodurch die spezifische Amplifikation des crRNA/tracrRNA-*Inserts* bestätigt werden konnte. Mit Hilfe der SANGER-Sequenzierung (s. 7.2.10) und dem in Anhang 3, Tabelle 45 aufgeführten Primer (pTargetF-*ribAr*) wurde die Sequenz des eingefügten *Inserts* verifiziert (Daten nicht gezeigt).

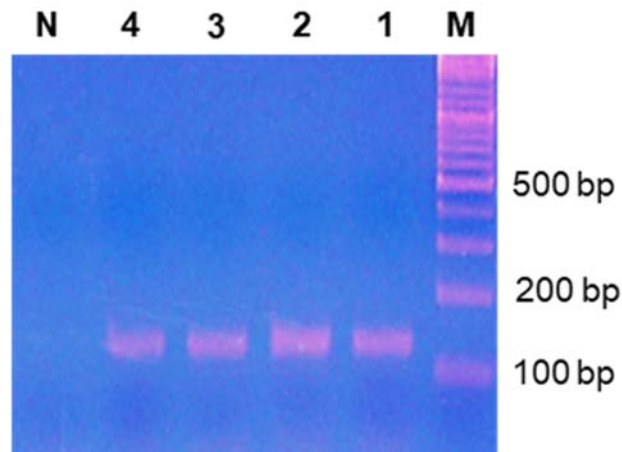


Abbildung 14: Elektropherogramm zur Überprüfung des Einbaus des crRNA/tracrRNA-*Inserts* in das Plasmid pTargetF-*ribA* mittels Kolonie-PCR. DNA-Marker (M), getestete Kolonien (1-4), Negativ-Kontrolle (N) = ursprüngliche pTargetF-DNA.

Wie bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben, muss der „Austausch“ der DNA-Sequenz der spezifischen crRNA für jedes *Target* erneut erfolgen. Zwar konnte das rekombinante Plasmid pTargetF-*ribA* anhand der oben beschriebenen Durchführung erfolgreich hergestellt werden, jedoch war die Herstellung des crRNA/tracrRNA-*Inserts* und die anschließende Klonierung in das Plasmid mit vielen Arbeitsschritten verbunden und hierdurch relativ zeitintensiv. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass im weiteren Verlauf der Arbeit festgestellt wurde, dass nicht jede crRNA-Sequenz geeignet war, um effizient einen Doppelstrangbruch im Zielgen zu induzieren, war es wichtig eine Methode zu finden, die es ermöglichte, die DNA-Sequenz der jeweiligen crRNA unter geringem Zeitaufwand und möglichst nach einem automatisierbaren Schema in das Plasmid einzubringen. Da die DNA-Sequenz der crRNA lediglich 20 bp umfasst und somit nur ein kleiner Abschnitt auf dem Plasmid modifiziert werden musste, wurde eine Ortsgerichtete Mutagenese-PCR (eng. *Site-Directed Mutagenesis*-PCR, SDM-PCR) als Alternative zur klassischen Klonierung ausgewählt. Unter der Verwendung von Mutagenese-Primern, die sich aus einem zur Zielsequenz auf dem Plasmid komplementären und einem variablen Bereich zusammensetzen, ermöglicht die Anwendung der SDM-PCR das Einbringen von Mutationen und die gleichzeitige Amplifikation des gesamten Plasmids (Hemsley et al., 1989). In Abhängigkeit der Sequenz der mutagenen Primer können SDM-Mutationen in Form von Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen (Substitutionen) eingebracht werden

(Mingfu Ling & Robinson, 2002). Die 20 bp-DNA-Sequenz der crRNA sowie eine weitere SpeI-Restriktionsschnittstelle wurden in dieser Arbeit in zwei Stufen (zwei PCR-Reaktionen) unter Verwendung von insgesamt drei Primern in das Plasmid pTargetF eingebracht (s. 7.2.7.4). Dies ermöglichte das Design von effizienten Mutagenese-Primern mit einem großen komplementären Bereich (15-25 Nukleotide) und einem reduzierten Anteil an mutagenen Nukleotiden (jeweils < 18).

Der Ablauf der zweistufigen SDM-PCR zur Substitution der DNA-Sequenzen der crRNAs sowie der Insertion einer zweiten SpeI-Restriktionsschnittstelle in das Plasmid pTargetF ist in Anhang 8, Abbildung 45 schematisch dargestellt.

Da bei der SDM-PCR die Sequenzintegrität der PCR-Amplifikate (modifizierte Plasmid-DNA) entscheidend war, wurde eine *Proofreading*-Polymerase (s. Anhang 1.3, Tabelle 43) verwendet, die durch ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität eine Korrekturlesefunktion und eine im Vergleich zur *Taq*-DNA-Polymerase um den Faktor 50 geringere Fehlerrate aufweist (McInerney et al., 2014; Zhang et al., 2009). Zudem wurde die Anzahl der PCR-Zyklen auf maximal 25 reduziert. Die erste SDM-PCR-Reaktion wurde mit dem jeweiligen ersten Mutagenese-Primer (fw1) durchgeführt, der einen Teil der ursprünglichen crRNA durch die neue crRNA-Sequenz ersetzte und komplementäre Bereiche zu der unmittelbar dahinterliegenden tracrRNA-Sequenz auf dem Plasmid aufwies. Als Rückwärtsprimer wurde bei allen PCR-Reaktionen der Primer pTargetFr verwendet, der in der ersten SDM-PCR eine SpeI-Restriktionsschnittstelle einbrachte. Die zweite SDM-PCR-Reaktion substituierte den restlichen Teil der crRNA-Sequenz unter Verwendung des jeweiligen zweiten Mutagenese-Primers (fw2) (Primersequenzen s. Anhang 3, Tabelle 45). Die aufgereinigten PCR-Produkte der zweiten SDM-Reaktionen wurden mittels 2%iger Agarosegelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 7.2.8) und mit Hilfe des DNA-Größenmarkers und den erwarteten Fragmentlängen verglichen. Alle PCR-Produkte zeigten eine Bande bei etwa 2000 bp und wiesen somit die erwartete Fragmentgröße der modifizierten linearen Plasmid-DNA auf (s. Elektropherogramme in Abbildung 15). Die Endprodukte der zweiten PCR, die die vollständige crRNA-Sequenz enthalten, sind lediglich um die in der zweiten SDM-PCR neu eingebrachten 20-22 bp länger und könnten anhand des Elektropherogramms nicht sicher von den Zwischenprodukten differenziert werden. Jedoch wurden in der ersten SDM-PCR lediglich vier PCR-Zyklen durchgeführt, um die Konzentration des unvollständigen Zwischenproduktes möglichst gering zu halten. Daher kann es sich bei den in den Elektropherogrammen sichtbaren DNA-Banden ausschließlich um PCR-Produkte handeln, welche die vollständige crRNA-Sequenzen enthalten, da die jeweiligen Mutagenese-Primer der zweiten PCR (fw2) nur dann erfolgreich an die DNA der Zwischenprodukte binden konnten, wenn in der ersten SDM-PCR Fragmente erhalten wurden, welche den ersten Teil der crRNA-Sequenzen und somit eine partielle Komplementarität zu den 2. Mutagenese-Primern aufwiesen.

Die anschließende Klonierung und Vervielfältigung der Plasmide erfolgten wie unter 7.2.7.4 weiter beschrieben. Mit Hilfe der SANGER-Sequenzierung (s. 7.2.10) und dem in Anhang 3, Tabelle 45 aufgeführten Sequenzierungs-Primer (Seq-pTargetFr) wurden die Plasmid-Modifikationen in den vier Plasmiden pTargetF-*ribB1/B2* und pTargetF-*ribC1/C2* verifiziert.

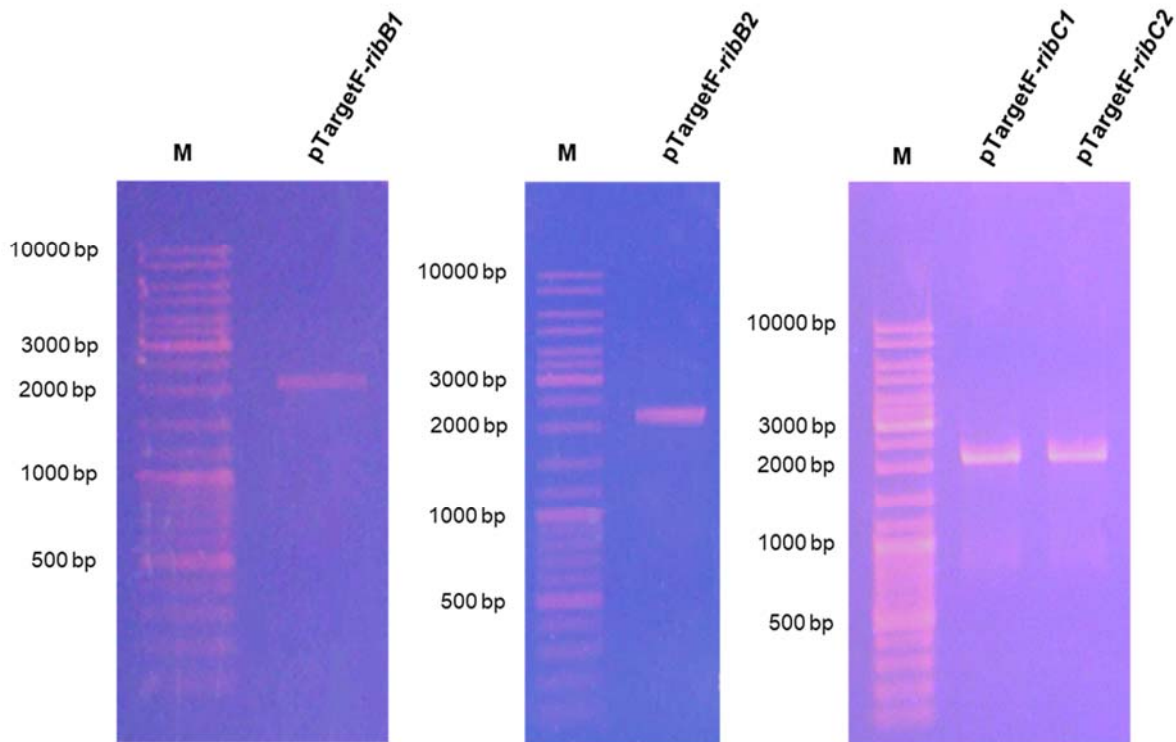


Abbildung 15: Elektropherogramme der mittels SDM-PCR modifizierten, linearen Plasmid-DNA von pTargetF-*ribB1/ribB2* und pTargetF-*ribC1/ribC2*. DNA-Marker (M).

Mittels der durchgeführten SDM-PCR konnten die entsprechenden crRNA-Sequenzen im Plasmid pTargetF innerhalb kurzer Zeit (in der Regel innerhalb von 2-3 Tagen) eingebracht werden. Es wurden nur geringe Mengen an unverdauter Plasmid-DNA als Template für die ersten SDM-PCR-Reaktionen benötigt, wodurch ein, bei der klassischen Klonierung erforderlicher, präparativer Plasmid-DNA-Verdau mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung und Isolierung nicht erforderlich war. Die Durchführung der SDM-PCR zur Herstellung der Plasmide mit den unterschiedlichen crRNA-Sequenzen war größtenteils analog zueinander. Während der Rückwärtsprimer universell für alle SDM-PCRs verwendet werden konnte, mussten lediglich die variablen Bereiche am 5'-Ende der Mutagenese-Primer der jeweiligen crRNA-Sequenz entsprechend angepasst werden. Da in der ersten SDM-PCR nur eine geringe Konzentration der ursprünglichen Plasmid-DNA (ca. 0,5 ng/μL) als Template verwendet wurde und zudem die Zyklenzahl zur Herstellung des Zwischenproduktes geringgehalten wurde, war eine Selektion gegen diese unerwünschten DNA-Komponenten (beispielsweise durch Restriktion) vor der Transformation nicht erforderlich. Unter Anwendung der Kolonie-PCR konnte bei etwa 80% der untersuchten *E. coli*-Kolonien die Aufnahme der rekombinanten

Plasmid-DNA nachgewiesen werden, wodurch das zeitaufwändige *Screening* von einer großen Anzahl an Transformanten entfiel. Alle mittels SANGER-Sequenzierung analysierten rekombinanten Plasmide wiesen zudem die korrekten DNA-Sequenzen der jeweiligen crRNAs auf, was für eine hohe Effizienz der Mutagenese-PCR sprach.

4.1.3 Konstruktion der *Donor-Templates* für die *Knockouts* von *RibA*, *RibB* und *RibC*

Nachdem die, für die jeweiligen *Target*-Sequenzen spezifischen crRNA-Sequenzen erfolgreich in die pTargetF-Plasmide eingebracht wurden, mussten wie im Ablaufschema (s. 3.1, Abbildung 12, Schritt 2) dargestellt, im nächsten Schritt die für die Rekombination bzw. Reparatur notwendigen *Donor-Templates* synthetisiert werden. Das von Jiang und Kollegen entwickelte und in dieser Arbeit verwendete Zwei-Plasmid-System bestehend aus den beiden Plasmiden pCas und pTargetF (Vektorkarten s. Anhang 2, Abbildungen 39 und 40) ermöglichte es die *Donor-Templates* in Form linearer dsDNA-Fragmente in die Zellen einzubringen (Y. Jiang et al., 2015). Somit konnte die *Target*-spezifische Modifizierung der pTargetF-Plasmide weiter vereinfacht werden, da eine zeitaufwendige Klonierung der entsprechenden *Donor-Templates* in die Plasmide entfiel. In Abhängigkeit des Designs der *Donor-Templates* ist es möglich sowohl Punktmutationen als auch Baseninsertionen oder Basendeletionen innerhalb des Zielgens zu generieren. In dieser Arbeit sollten zunächst exemplarisch verschiedene essenzielle Gene der Riboflavinbiosynthese in *E. coli* (*ribA*, *ribB* und *ribC*) ausgeschaltet werden. Ein effizienter *Gen-Knockout*, der einen vollständigen Funktionsverlust des Proteins zur Folge hat, ist theoretisch bereits durch eine einzige Punktmutation möglich, wenn diese zur Bildung eines Stopcodons (TAG, TAA oder TGA) und einem damit einhergehenden Translationsabbruch führt. Allerdings besteht hierbei ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Revertanten, die durch eine einfache Rückmutation die ursprüngliche Nukleotid-Sequenz des Gens wiedererlangen würden. Zudem kann es durch eine zweite so genannte kompensatorische Mutation im selben Gen dazu kommen, dass durch einen weiteren Aminosäureaustausch die für die Aktivität des Proteins notwendige Faltung annähernd wieder hergestellt würde (Hahn et al., 1991). Um zu verhindern, dass die erfolgreich rekombinierte DNA, weiterhin als *Target*-Sequenz von der crRNA-geleiteten Cas9-Nuklease erkannt wird, müsste eine Punktmutation zudem unmittelbar in die PAM-Region eingebracht werden, da mehrere Studien bereits gezeigt haben, dass einige DNA-Sequenzen trotz des Aufweisens von ein bis fünf Basen-*Mismatches* innerhalb der *Protospacer*-Sequenzen ebenfalls von der Cas9-Nuklease geschnitten werden (Cho et al., 2014; Hsu et al., 2013; Jinek et al., 2012; Semenova et al., 2011; Wiedenheft et al., 2011). Aus den oben genannten Gründen war es sinnvoll, größere Bereiche der jeweiligen Gene einschließlich ihrer *Protospacer*-Sequenzen und PAM-Regionen zu deletieren. Die *Donor-Templates* sollten zudem so designt werden, dass nach erfolgter Rekombination die distalen Berei-

che der mutierten Gene ihr ursprüngliches Leseraster verlieren und die resultierenden Aminosäurezusammensetzungen der Proteine von den eigentlichen Proteinsequenzen divergieren. Hierbei wurde darauf geachtet, dass durch die entsprechenden *Frameshifts* auch ein oder mehrere vorzeitige Stopcodone entstehen.

Diese mehrstufigen Mutationen sollten verhindern, dass weder die aktiven Proteine in ihrer vollen Größe noch Proteinfragmente mit einer möglichen verbleibenden enzymatischen Aktivität aus den jeweiligen mutierten Genen synthetisiert werden konnten. Ein weiterer Aspekt, der bei dem Design von *Donor-Templates* berücksichtigt werden sollte, sind die zur *Target-DNA* homologen Bereiche. Einige Studien haben bereits gezeigt, dass die Rekombinationseffizienz von *Donor-Templates* sowohl von der Größe der zu ersetzenden genomischen Sequenzen als auch von der Länge der homologen Bereiche („Arme“) abhängig ist (Pyne et al., 2015; Y. Jiang et al., 2015). Obwohl die Lambda-Red vermittelte Rekombination bereits mit homologen Bereichen ab 40 bp effizient funktionieren soll (Datsenko & Wanner, 2000), konnten Y. Jiang et al. beobachten, dass die Rekombinationseffizienz bei CRISPR-Cas9 vermittelten Insertionen in das Genom von *E. coli* um das 5-fache (von 28% zu 6%) abnahm, wenn sie die Länge der homologen Arme von 400 bp auf 40 bp verkürzten (Y. Jiang et al., 2015). Ähnliche Ergebnisse erzielten Hendel et al. unter Verwendung von TALENs und bei dem Versuch HR vermittelte Modifizierungen von einzelnen Nukleotiden in humane Zellen einzuführen: Sie konnten beobachten, dass die Rekombinationseffizienz von *Donor-Templates* mit 400 bp anstelle von 200 bp-homologen Armen, um den Faktor drei höher war. Eine Verlängerung der homologen Arme auf jeweils 800 bp konnte die Rekombinationseffizienz hingegen nicht weiter erhöhen. Allerdings muss beachtet werden, dass die für eine bestimmte Spezies optimierte Länge der homologen Arme nicht zwangsläufig auch auf eine andere Spezies übertragbar ist. So konnte bereits anhand von ZFN vermittelten Rekombinationsversuchen gezeigt werden, dass die optimale Länge der homologen Bereiche eines *Donor-Templates* sowohl zwischen verschiedenen Spezies, als auch in verschiedenen Zelltypen innerhalb einer Spezies stark variieren kann (Beumer et al., 2013; Orlando et al., 2010). Da wie bereits erwähnt in dieser Arbeit u.a. größere Deletionen in das Genom von *E. coli* bzw. *B. subtilis* eingebracht werden sollten, wurde beim nachfolgenden Design der *Donor-Templates* darauf geachtet, dass diese homologe Bereiche von mindestens 350-500 bp links und rechts der zu deletierenden genomischen DNA aufwiesen, um eine hohe Rekombinationseffizienz mit der *Target-DNA* zu gewährleisten.

Die Herstellung der *Donor-Templates*, die eine modifizierte Version der jeweiligen chromosomalen DNA-Abschnitte darstellen, erfolgte unter Anwendung der *Overlap-Extension* (OE)-PCR, auch *Megaprime-PCR* genannt. Die Verlängerung von sich überlappenden Gensegmenten ist eine vielseitige PCR-Technik, die es ermöglicht, Substitutionen, Insertionen und/oder

Deletionen ohne eine zusätzliche Verwendung von Restriktionsenzymen und Ligasen innerhalb eines DNA-Moleküls einzubringen (Ho et al., 1989; Horton et al., 1989). Für die Durchführung der OE-PCR wurde, wie bereits bei der SDM-PCR beschrieben, aufgrund der Bedeutung der Sequenzintegrität der PCR-Produkte (*Donor-Templates*) eine *Proofreading*-Polymerase verwendet. Zwar kann diese Variante der PCR bei kleineren Fragmenten auch mit der *Taq*-Polymerase durchgeführt werden, jedoch fügt diese teilweise an den 3'-Enden der PCR-Produkte unspezifische Überhänge in Form zusätzlicher Nukleotide ein, welche stören könnten, wenn diese Fragmente später als Megaprimer fungieren sollen (Clark, 1988). In Anhang 9, Abbildung 47 ist der Ablauf der unter 7.2.7.5 beschriebenen OE-PCR zur Herstellung der *Donor-Templates* schematisch dargestellt. Zunächst wurden in zwei separaten PCR-Reaktionen und unter Verwendung chromosomaler DNA aus *E. coli*, die jeweiligen homologen Bereiche der *Donor-Templates* erzeugt. Dabei synthetisierte das erste Primerpaar den linken homologen Bereich und das zweite Primerpaar den rechten homologen Bereich der *Donor-Templates*. Die beiden inneren Primer wurden so konzipiert, dass sie die jeweiligen zu deletierenden Bereiche auf der chromosomalen DNA flankierten und gleichzeitig einen neuen komplementären Bereich (Überlappungsbereich) von 15-16 bp für ein späteres Annealing der beiden Fragmente in einer zweiten PCR-Reaktion einbrachten. Für ein optimales Hybridisieren der Fragmente werden Überlappungsbereiche mit einer Größe von mindestens 15 bp sowie einem GC-Gehalt von etwa 60-70% empfohlen (Horton et al., 1989). Die zur Herstellung der *Donor-Templates* verwendeten Primerpaare sind unter 7.2.7.5, Tabelle 33 und die Sequenzen der jeweiligen Primer in Anhang 3, Tabelle 45 aufgeführt.

Die Größe der deletierten Bereiche in den *Donor-Templates* wurde für die *Knockouts* der Gene *ribA* (-23 bp), *ribC* (-87 bp) und *ribB* (-176 bp) schrittweise erhöht, um später zu evaluieren, bis zu welcher Größe Deletionen effizient mittels CRISPR-Cas9 induziert werden können. Für die Herstellung des *Donor-Templates* DTribA wurden die PAM-Region sowie ein großer Teil der Zielsequenz (14 von 20 bp) entfernt. Zudem wurde durch den inneren Primer (AmLr) eine Punktmutation eingeführt, die zur Entstehung eines Stopcodons führte. Bei den *Donor-Templates* DTribC und DTribB wurden die vollständigen Zielsequenzen von *ribC1* und *ribC2* bzw. *ribB1* und *ribB2* inklusive ihrer PAM-Regionen sowie weitere Bereiche der jeweiligen Gene entfernt. Bei allen *Donor-Templates* wurde darauf geachtet, dass die Anzahl der deletierten Basenpaare unter Berücksichtigung der jeweiligen Überlappungssequenzen (15-16 bp) nicht durch drei teilbar ist, um nach einer erfolgten Rekombination der *Donor-Templates* mit den jeweiligen Zielgenen, *Frameshift*-Mutationen zu induzieren. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die für die *Knockouts* ausgewählten Gene und das Design der entsprechenden *Donor-Templates*.

Tabelle 5: Überblick über die geplanten CRISPR-Cas9 induzierten Deletionen in den Riboflavinbiosynthese-Genen in *E. coli* BL21(DE3) (NCBI-Zugangsnummer: CP001509.3) und Design der entsprechenden *Donor-Templates*.

Annotationsnummer	ORF	Enzym	<i>Donor-Template</i> Gesamtgröße [bp]	Homologe Arme [bp]	Überlappungsbereich [bp]	Größe des deletierten Bereiches [bp]
ACT43142.1	<i>ribA</i>	GTP-Cyclohydrolase II	811	L = 400 R = 396	15	23
ACT44717.1	<i>ribB</i>	Mutase	1333	L = 814 R = 504	15	176
ACT43491.1	<i>ribC</i>	Riboflavin-synthase	771	L = 361 R = 394	16	87

In Folge dessen, dass die Hybridisierung der kurzen Überlappungsfragmente zwischen den DNA-Einzelfragmenten nur mit einer geringen Häufigkeit auftritt, enthalten die OE-PCR-Produkte in der Regel größere Mengen der DNA-Einzelfragmente (Ho et al., 1989; Shevchuk et al., 2004). Diese wurden mittels einer präparativen AGE (s. 7.2.8) entfernt. Da die synthetisierten *Donor-Templates* für die CRISPR-Cas9-Events in *E. coli* direkt, in Form linearer dsDNA, in die Zellen transformiert werden sollten, war es wichtig, dass diese als hochreine DNA-Produkte vorlagen und keine Verunreinigungen durch beispielsweise DNA-Einzelfragmente vorlagen. Diese würden die Anzahl der Transformanten, welche nach einer Elektroporation die gewünschten *Donor-Templates* aufweisen, signifikant reduzieren und somit auch die Mutationsrate negativ beeinflussen. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden anschließend mittels eines 1%igen Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt (s. 7.2.8) und mit Hilfe des DNA-Größenmarkers und den erwarteten Fragmentlängen verglichen. Alle PCR-Produkte zeigten eine der jeweiligen zu erwartenden Fragmentgröße entsprechende DNA-Bande (s. Elektropherogramme in Abbildung 16 mit $DTribA = 811$ bp, $DTribB = 1333$ bp und $DTribC = 771$ bp). In Anhang 5 sind die DNA-Sequenzen der mittels OE-PCR generierten *Donor-Templates* aufgeführt.

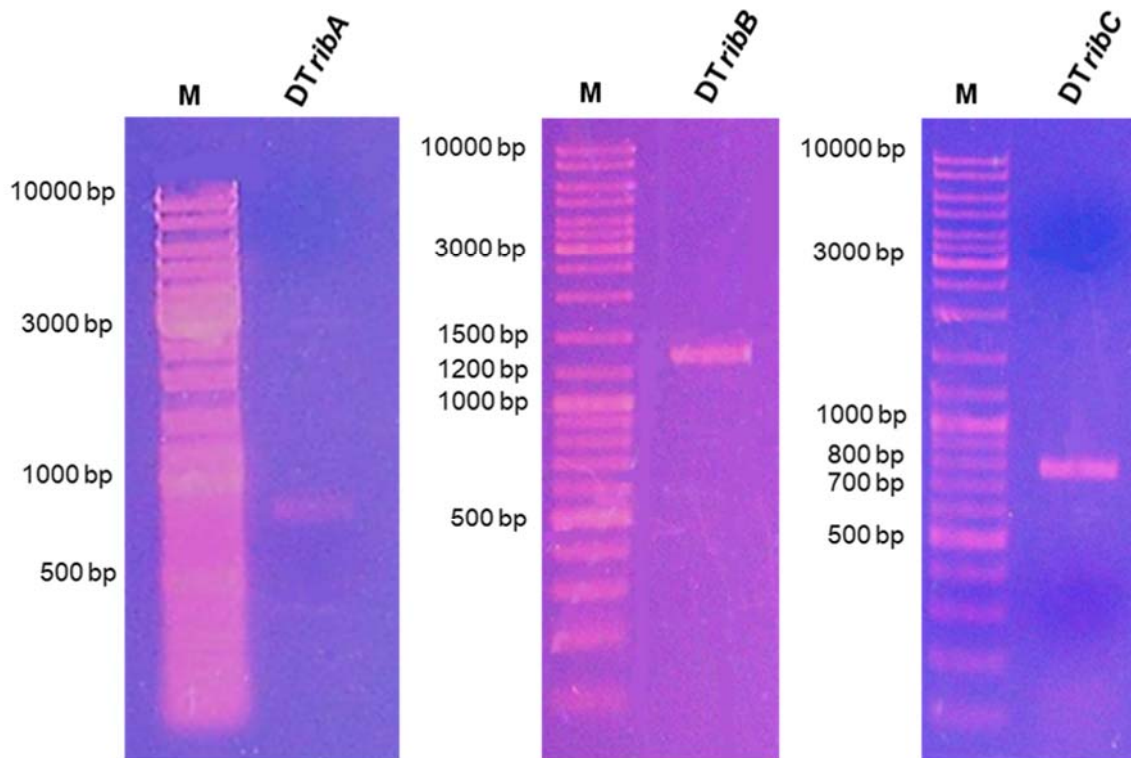


Abbildung 16: Elektropherogramme der mittels OE-PCR synthetisierten *Donor-Templates* DTribA, DTribB und DTribC. DNA-Marker (M).

4.1.4 Auswahl der Transformationsmethode zur Herstellung elektrokompenter *E. coli*- und *E. coli* (pCas)-Zellen und Expression der Lambda Red Gene

Nachdem alle für die Genom Editierung benötigten Komponenten hergestellt bzw. der *Target*-DNA entsprechend modifiziert wurden, mussten diese mit Hilfe einer geeigneten Transformationsmethode in die *E. coli* Zellen eingebracht werden (s. Ablaufschema unter 3.1, Abbildung 12, Schritt 3). Zwar besitzen einige Bakterien die Fähigkeit (Kompetenz) unter natürlichen Bedingungen genetisches Material aus ihrer Umgebung aufzunehmen, doch ist diese zumeist nur gering ausgeprägt (Stewart & Carlson, 1986). Es existieren daher verschiedene molekularbiologische Methoden, wie bspw. die Behandlung mit zweiwertigen Ionen (u.a. Calciumchlorid-Methode) und Hitzeschock, die Protoplastentransformation und die Elektroporation, die die Permeabilität der Zellmembranen kurzzeitig erhöhen und somit die Effizienz der DNA-Aufnahme steigern können (Bibb et al., 1978; Hanahan, 1983; Mandel & Higa, 1970; Taketo, 1988). Die Elektrotransformation (Transformation durch Elektroporation) weist dabei den Vorteil auf, dass die Herstellung von kompetenten Zellen deutlich weniger zeit- und arbeitsintensiv ist als die Herstellung von Protoplasten und elektrokompente Zellen eine bis zu zehnfach höhere Transformationsrate im Vergleich zu chemisch kompetenten Zellen aufweisen (Dower et al., 1988; Taketo, 1988).

Zudem sollten in dieser Arbeit, neben der zirkulären Plasmid-DNA von pTargetF und pCas, auch die *Donor-Templates* in Form linearer dsDNA-Fragmente in *E. coli*-Zellen transformiert werden. Da die Transformationseffizienz von linearer DNA im Vergleich zu zirkulärer dsDNA oder ssDNA in *E. coli* etwa um den Faktor 100 niedriger ist (Bergmans et al., 1980; Cohen et al., 1972), wurde die Elektroporation als Transformationsmethode bevorzugt.

Die Herstellung der elektrokompententen *E. coli* BL21(DE3)-Zellen und die anschließende Transformation erfolgten nach einer modifizierten Methode von Dower et al. (1988) (s. 7.1.2). Unter Anwendung dieser Methode konnten Transformationsraten von 10^9 - 10^{10} Transformanten/ μg Plasmid-DNA erreicht werden.

Analog zu der Vorgehensweise von Y. Jiang et al. (2015) wurden unter Anwendung der oben beschriebenen Methode zunächst elektrokompentente Zellen des *E. coli* BL21(DE3)-Stammes hergestellt. Anschließend wurde in diese Zellen das Plasmid pCas transformiert und eine der Transformanten in einer Kultur vermehrt (s. 7.1.2 und 7.1.1). Der Hauptkultur wurde nach dem Erreichen einer bestimmten Zelldichte *L*-Arabinose-Lösung hinzugegeben, um die Induktion des Promotors *P_{araB}* und somit die Expression der Lambda Red Gene (*exo*, *beta* und *gam*) auf dem Plasmid pCas zu bewirken (s. 7.1.2 und Vektorkarte in Anhang 2, Abbildung 39). Die *E. coli* (pCas)-Zellen mussten im nächsten Schritt erneut auf die Elektroporation vorbereitet werden, um diese später mit den jeweiligen pTargetF-Plasmiden und den linearen *Donor-Templates* transformieren zu können (s. 4.1.5). Diese konsekutive Vorgehensweise bei der Transformation der zur Genome Editierung benötigten DNA-Komponenten stellte sicher, dass die Zellen bereits vor der Komplementierung des CRISPR-Cas9 Systems durch die Transformation der pTargetF-Plasmide eine ausreichende Konzentration der zur Rekombination mit dem *Donor-Template* benötigten Phagen-Proteine aufwiesen. Da *E. coli* in Rekombinationsversuchen unter Anwendung der Elektroporation lediglich über eine sehr geringe natürliche Rekombinationsrate von ca. 10^{-8} Rekombinanten pro überlebenden Zellen verfügt (Murphy, 1998; Murphy et al., 2000) und sowohl die Cas9-Nuklease, als auch die crRNA/tracrRNA auf den Plasmiden pCas und pTargetF konstitutiv exprimiert werden, würde es ohne eine vorherige Expression der Rekombinationsgene dazu kommen, dass ein Großteil der Zellen bereits vor der Rekombination durch die starke Selektion der CRISPR-Cas9 vermittelten chromosomalen Doppelstrangbrüche getötet würde. Die Rekombinasen Exo, Beta und Gam aus dem Bakteriophagen Lambda sind in der Lage die ortsgerichtete Integration linearer DNA in das Bakterienchromosom deutlich zu erhöhen (Murphy, 1998). Während das Protein Gam lineare DNA-Fragmente vor dem Abbau durch die endogenen *E. coli*-Nukleasen RecBCD und SbcCD schützt und dadurch eine effiziente Transformation linearer DNA in die Zelle ermöglicht (Karu et al., 1975), fungiert Exo als dsDNA-abhängige 5'-3'-Exonuklease, die 3'-Überhänge an beiden Enden des DNA-Fragmentes generiert (Little, 1967) bzw. einem aktuelleren Modell zu Folge, einen der Stränge vollständig abbaut, sodass ein ssDNA-Intermediat in voller Länge

entsteht (Mosberg et al., 2010). Beiden Modellen entsprechend können die 3'-Überhänge bzw. die ssDNA-Intermediate anschließend von dem Einzelstrang-bindenden Protein Beta erkannt werden, welches die Bindung an homologe ssDNA-Bereiche der chromosomalen DNA vermittelt (Karakousis et al., 1998; Kmiec & Holloman, 1981). Solche genomischen ssDNA-Bereiche können bspw. in Form beschädigter DNA-Abschnitte oder als Einzelstränge einer Replikationsgabel vorliegen (Court et al., 2002; Ellis et al., 2001). Das Modell nach Mosberg et al. (2010) geht auf Grundlage von mehreren Forschungsergebnissen davon aus, dass die ssDNA-Intermediate an ihr homologes Ziel am Folgestrang der Replikationsgabel binden und dort, ähnlich wie ein Okazaki-Fragment, als Teil des neu synthetisierten Strangs eingebaut werden.

4.1.5 Genom Editierung mittels CRISPR-Cas9 und Selektion der Mutanten

In diesem Abschnitt sollten die zuvor hergestellten elektrokompententen *E. coli* (pCas)-Zellen verwendet werden, um mittels einer weiteren Elektroporation die für die spezifischen crRNA-Sequenzen codierenden pTargetF-Plasmide (s. Abschnitt 4.1.2) zusammen mit den unter 4.1.3 hergestellten *Donor-Templates* in die Zellen zu transformieren und somit die CRISPR-Cas9 vermittelte genetische Modifizierung der Zellen zu bewirken. Im Anschluss an die CRISPR-Cas9-Events sollten mit Hilfe von Selektiv-Agarplatten und der Kolonie-PCR die Zellen auf die gewünschten Mutationen untersucht werden (s. Ablaufschema unter 3.1, Abbildung 12, Schritte 4-6).

Die Elektroporation erfolgte unter den in den Abschnitten 7.2.9.1 und 7.1.2 beschriebenen Bedingungen. Für die *Gen-Knockouts* wurden in dieser Arbeit analog zu Y. Jiang et al. (2015) Konzentrationen in einem Verhältnis von 1:4 von Plasmid-DNA zu *Donor-Template*-DNA eingesetzt. Mit Hilfe eines vier bis zehnfachen Überschusses der *Donor-Template*-DNA bei der parallelen Transformation mit einem Plasmid zur CRISPR-Cas9 vermittelten Genom Editierung konnten in mehreren Studien gute Rekombinationseffizienzen in *E. coli*-Bakterien erzielt werden (Chung et al., 2017; Y. Jiang et al., 2015; Zerbini et al., 2017). Da die lineare *Donor-Template*-DNA in den meisten Bakterien eine wesentlich geringere Transformationseffizienz aufweist als Plasmid-DNA (s. auch Abschnitt 4.1.4) und diese vermutlich trotz des Schutzes durch das Phagen-Protein Gam zu einem geringen Teil durch die zelleigenen Exonukleasen abgebaut wird, kann der Einsatz höherer Konzentrationen an *Donor-Template*-DNA diese Einflüsse evtl. nivellieren.

4.1.5.1 Optimierung des CRISPR-Cas9-Events in *E. coli* BL21(DE3) anhand des *Knockouts* der GTP-Cyclohydrolase II (RibA)

Zunächst wurden elektrokompentente *E. coli* (pCas)-Zellen für den *Knockout* des Gens *ribA* mit dem Plasmid pTargetF-*ribA* und der entsprechenden *Donor-Template*-DNA (D*RibA*) transformiert. Die Zellen wurden nach der Elektroporation in 1 mL *Recovery*-Medium aufgenommen

und analog zu Y. Jiang et al. (2015) für eine Stunde im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Selektiv-Agarplatten mit Riboflavin ausplattiert und im Brutschrank inkubiert (s. 7.2.9.1). Am nächsten Tag wurden etwa 80 Kolonien der erhaltenen Transformanten mit Hilfe eines Wachstumstests auf LB-Agarplatten mit und ohne den Zusatz von Riboflavin auf eine Riboflavin-Auxotrophie und somit eine erfolgreiche Deletion im *ribA*-Gen überprüft (s. 7.1.5). Alle getesteten Kolonien zeigten auch auf den Agarplatten ohne Riboflavin-Supplementierung ein eindeutiges Wachstum, was darauf hindeutete, dass es sich hierbei um keine *ribA*-Mutanten handelte. Da *E. coli* über keinen Riboflavin-Transporter verfügt, kann das Bakterium dieses lediglich über Diffusion aufnehmen und wenn es in hohen Konzentrationen (2,5-720 μM) im Nährmedium enthalten ist (Bacher et al., 2000; Brutinel et al., 2013; Burgess et al., 2006; Gutiérrez-Preciado et al., 2015). Die Konzentrationen an Riboflavin, die im nicht sublimierten LB-Agar aufgrund des enthaltenen Hefeextrakts vorhanden sind (ca. 0,2 μM ; eigene ELISA-Bestimmungen) liegen etwa um den Faktor 13-3600 niedriger und sollten bei einem erfolgreichen *Knockout* der essenziellen GTP-Cyclohydrolase II kein weiteres Wachstum der Mutanten zulassen.

Zur weiteren Absicherung des Ergebnisses wurden 20 der Kolonien zusätzlich mittels einer Kolonie-PCR (s. 7.2.7.1) auf die zu erwartende Mutation getestet. Bei einer erfolgreichen Rekombination des bakteriellen Genoms mit dem *Donor-Template* von *DTribA* wäre das PCR-Produkt der *ribA*-Gensequenz einer Wildtyp-Kolonie lediglich um acht Basen länger als das DNA-Fragment einer *ribA*-Mutante (s. Tabelle 5 *ribA*: 23-bp große Deletion und 15-bp Insertion von Überlappungsbereich) und somit wären diese mittels einer AGE nur schwer differenzierbar. Daher wurde für die Kolonie-PCR ein zusätzlicher Primer designt (*ribA-mutfw*), der ausschließlich komplementär zur Überlappungssequenz ist und nur im Falle einer erfolgreichen Mutation zusammen mit dem Rückwärtsprimer (AmRr) ein DNA-Fragment amplifiziert (Primersequenzen s. Anhang 3). Als Positiv-Kontrolle für die PCR wurde die *Donor-Template*-DNA von *DTribA* verwendet. Während für die Positiv-Kontrolle ein DNA-Fragment der erwarteten Größe (411 bp) erhalten wurde, zeigten keine der getesteten Kolonien im Elektropherogramm des Agarosegels eine DNA-Bande (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis stimmte mit dem zuvor durchgeführten Wachstumstest überein, in dem keine der 80 getesteten Kolonien ein Riboflavin-abhängiges Wachstum zeigte.

In einer Studie von Chung et al. (2017) konnte gezeigt werden, dass die Rekombinationseffizienz und die Rekombinationsrate verschiedener *E. coli*-Stämme teilweise stark variieren. Sie führten verschiedene Rekombinationsversuche mit MG1655 und BL21(DE3)-Zellen durch und erzielten unter Induktion des CRISPR-Cas9 Systems in den BL21-Zellen signifikant geringere Rekombinationseffizienzen (62% vs. 89%). Noch größer waren die Unterschiede ohne die Induktion des CRISPR-Cas9 Systems: Während für die MG1655-Zellen Rekombinationseffizienzen von bis zu 39% ermittelt wurden, konnte keine einzige BL21-Mutante erhalten werden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen zum einen die Schwierigkeiten der HR in BL21(DE3)-Zellen und zum anderen die getriggerte Rekombination durch die Induktion des CRISPR-Cas9 Systems in beiden *E. coli*-Stämmen. Die Autoren berichteten zudem, dass sie erst durch eine Verlängerung der Erholungsphase nach der Elektroporation (von 1 h auf 2,5 h) und eine Erhöhung des Sauerstoff- und Nährstoffangebots rekombinante BL21-Zellen erhalten hatten (Chung et al., 2017).

Um sicherzustellen, dass den Zellen ausreichend Zeit bzw. Sauerstoff und Nährstoffe zur Verfügung stehen, um die DNA-Reparatur und die Rekombination abzuschließen, wurden die entsprechenden Parameter angepasst (s. 7.2.9.1) und ein weiteres CRISPR-Cas9-Event durchgeführt. Es konnten jedoch erneut weder im Wachstumstest noch mittels der Kolonie-PCR *ribA*-Mutanten identifiziert werden.

Auffällig war, dass nach beiden Transformationsversuchen mit pTargetF-*ribA* und dem *Donor-Template* relativ viele Transformanten auf den Agarplatten wuchsen, sich jedoch unter den getesteten Kolonien keine einzige *ribA*-Mutante befand. Theoretisch sollten sich aufgrund der durch das CRISPR-Cas9 System induzierten letalen Doppelstrangbrüche unter den Transformanten keine bzw. nur wenige Wildtyp-Zellen befinden, da *E. coli* über kein ausreichend ausgeprägtes NHEJ-Reparatursystem verfügt (Shuman & Glickman, 2007). Zwar war bereits bekannt, dass auch einige nicht rekombinierte Zellen der Selektion „entkommen“ bzw. diese überleben können (Cui & Bikard, 2016; Jiang et al., 2013), jedoch lag bei der hohen Anzahl an überlebenden Wildtyp-Zellen die Vermutung nahe, dass die CRISPR-Cas9 induzierte Selektion evtl. nicht oder nur unzureichend funktioniert hat. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine erneute Elektroporation mit kompetenten *E. coli* (pCas)-Zellen unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Diesmal wurde zur Kontrolle parallel ein weiteres Aliquot kompetenter *E. coli* (pCas)-Zellen mit der Plasmid-DNA von pTargetF-*ribA* und ohne das zur Rekombination bzw. Reparatur notwendige *Donor-Template* transformiert. Es wurden für beide Ansätze Transformationsraten von ca. 10^7 - 10^8 Transformanten/ μ g Plasmid-DNA erhalten. Trotz eventueller Überlebensmechanismen, die einigen Wildtyp-Zellen ein weiteres Wachstum ermöglichen können, sollte die Anzahl der nach einer effizienten CRISPR-Cas9-Selektion erhaltenen Transformanten bei der Kontrolle deutlich geringer sein als bei den Zellen, die mit dem *Donor-Template* cotransformiert wurden.

Mögliche Gründe für ein nicht effizient ablaufendes CRISPR-Cas9 induziertes chromosomales *Targeting* könnten darin liegen, dass bspw. die crRNA-Sequenz größere Ähnlichkeiten zu einem Abschnitt auf der Plasmid-DNA von pTargetF-*ribA* oder pCas aufweist und das entsprechende Plasmid in Form eines *Off-Target*-Effektes ebenfalls restriktiert wird. In diesem Falle würden die Zellen jedoch zusammen mit dem jeweiligen Plasmid auch die Resistenz gegen das Antibiotikum verlieren und ein Wachstum auf den verwendeten Selektiv-Agarplatten sollte nicht mehr möglich sein. Umfangreiche PCR-Screenings (s. 7.2.7.1) mit den Primern ribAfw2

und pTargetF-Screenr (Nachweis von pTargetF-*ribA*) sowie pCasKanfw und pCasKanr (Nachweis von pCas) bestätigten zudem das Vorhandensein der beiden Plasmide in den Transformanten (s. Elektropherogramme in Anhang 7, Abbildungen 42 und 43). Lediglich 2 von 20 Kolonien (K4 und K8) zeigten im Elektropherogramm keine für das Plasmid pCas spezifische Bande. Jedoch muss dies nicht zwingend auf die Abwesenheit des Plasmids in den jeweiligen Kolonien zurückzuführen sein, da es aufgrund der inhibierenden Wirkung des Zellmaterials bei der Kolonie-PCR zu falsch-negativen Ergebnissen kommen kann (Müller & Prange, 2016). Da bei der Mehrheit der Transformanten nach dem CRISPR-Cas9-Event weiterhin beide Plasmide nachgewiesen werden konnten, wurde ein „*Self-Targeting*“ der Plasmide ausgeschlossen. Mittels SANGER-Sequenzierung (s. 7.2.10) des Cas9-Genabschnitts von pCas, konnte des Weiteren die korrekte, unveränderte DNA-Sequenz der Cas9-Nuklease verifiziert werden. Aufgrund dieser Ausschlussmöglichkeiten stellte sich bei der weiteren Ursachenanalyse die Frage, ob die unter 4.1.1 ausgewählte crRNA-Sequenz evtl. nicht oder nur unzureichend an die entsprechende *Target*-Sequenz bindet und diese daher nicht von der Cas9-Nuklease geschnitten werden kann. Zwar wurden bei der Auswahl der crRNA-Sequenzen bereits einige Effizienz-Kriterien berücksichtigt, jedoch beschränkten sich diese auf zu diesem Zeitpunkt verfügbare, allgemeingültige Erkenntnisse, die auch für das Design effizienter PCR-Primer gelten (z. B. ein moderater GC-Gehalt s. 4.1.1), da Effizienzmerkmale von crRNA-Sequenzen im Gegensatz zu Spezifitätsmerkmalen erst in wenigen Studien charakterisiert wurden. Auch die *Target*-Sequenzen einschließlich ihrer PAM-Regionen könnten aufgrund von Sequenz- bzw. Strukturmerkmalen unterschiedliche Effizienzen beim *Targeting* und/oder der anschließenden Reparatur/Rekombination aufweisen. Auffällige Merkmale in der Zielsequenz bzw. crRNA von *ribA*, zeigten sich an Position 14-17 in Form vier repetitiver Guanin- bzw. Cytosin-Nukleotide und im Bereich der PAM-Region (s. Abbildung 17). Sowohl die PAM-Region als auch das unmittelbar proximal zur PAM-Region liegende Nukleotid, wiesen eine Cytosin-Base auf, wodurch eine Art „erweiterte PAM-Region“ entstand.

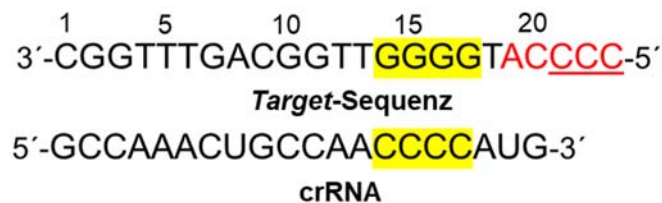


Abbildung 17: Target-Sequenz und resultierende crRNA für den *Knockout* von *ribA*. Die vier repetitiven Guanin- bzw. Cytosin-Nukleotide sind gelb hinterlegt. Die PAM-Region (CCC) sowie die Nukleotide (19-20), welche eine erweiterte PAM-Region bilden, sind in Rot dargestellt.

In einer Studie von Wong et al. (2015) wurde mittels einer erneuten bioinformatischen Analyse eines von Doench et al. (2014) publizierten Datensatzes bestehend aus 1841 getesteten crRNA-Sequenzen ein Vorhersagemodel aufgebaut, um das Design von crRNAs hinsichtlich

ihrer Effizienz zu optimieren. Die zuvor veröffentlichten Studienergebnisse beruhen auf experimentellen Versuchen an Säugetierzellen (Doench et al., 2014). Die Autoren analysierten den Datensatz der crRNA-Sequenzen in Anlehnung an bereits vorhandene Erkenntnisse über das Design funktioneller siRNAs (engl. *small interfering RNAs*) und konnten zeigen, dass die Effizienz des CRISPR-Cas9 Systems in ähnlicher Weise von den Sequenz- und Strukturmerkmalen der crRNA beeinflusst wird. So konnten sie bspw. nachweisen, dass nicht nur crRNAs mit *Poly-U*-Sequenzen eine geringere *On-Target*-Aktivität aufweisen, sondern crRNAs mit repetitiven Basen (vier bis fünf Wiederholungen) im Allgemeinen mit einer signifikant geringeren CRISPR-Cas-Aktivität korrelieren (Wong et al., 2015). Malina et al. (2015) konnten anhand verschiedener *Target*-Sequenzen zeigen, dass nicht per se ein hoher GC-Gehalt, sondern vielmehr das Auftreten mehrerer PAM-Motive (5'-NGG-3' bzw. 3'-NCC-5') innerhalb einer *Target*-Sequenz, die intrinsische Affinität von Cas9 inhibieren können. Um die vier repetitiven Nukleotide in der crRNA- bzw. *Target*-Sequenz zu vermeiden, wäre es notwendig gewesen, eine neue *Target*-Sequenz auszuwählen. Dies hätte sowohl eine Neukonstruktion des Plasmids pTargetF-*ribA* als auch des entsprechenden *Donor*-Templates zur Folge gehabt. Daher sollte zunächst geprüft werden, ob durch eine Reduktion der PAM-Motive innerhalb der *Target*-Sequenz die Effizienz des *Targetings* erhöht werden kann.

Mit Hilfe der SDM-PCR (s. 4.1.2 und 7.2.7.4) und den entsprechenden Primer-Paaren (Primersequenzen s. Anhang 3, Tabelle 45) wurde das letzte Guanin-Nukleotid in der crRNA-Sequenz (s. Abbildung 17, Position 20) von dem Plasmid pTargetF-*ribA* deletiert, so dass die PAM-Region (CCC) um eine Base verschoben wurde und sich nur noch drei repetitive Cytosin-Basen innerhalb der *Target*-Sequenz befanden. Die neue *Target*-Sequenz bzw. crRNA von pTargetF-*ribA*-G, ist unter Abschnitt 6.7, Tabelle 14 aufgeführt. Analog zur oben beschriebenen Durchführung des CRISPR-Cas9-Events wurden elektrokompetente *E. coli* (pCas)-Zellen mit dem Plasmid pTargetF-*ribA*-G bzw. pTargetF-*ribA* und der entsprechenden *Donor-Template*-DNA (D*TribA*) bzw. ohne das *Donor-Template* transformiert.

Während zwischen den beiden pTargetF-*ribA*-Ansätzen erneut keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Überlebensrate der Zellen beobachtet werden konnten, zeigte der Kontrollansatz von pTargetF-*ribA*-G eine verminderte Zellwachstumsrate (etwa um den Faktor 1,5) gegenüber dem Ansatz, der mit dem *Donor-Template* cotransformiert wurde. Wesentlich auffälliger war jedoch, dass die beiden Ansätze, die das Plasmid mit der modifizierten crRNA-Sequenz (pTargetF-*ribA*-G) erhalten hatten, im Allgemeinen ein deutlich geringeres Zellwachstum zeigten, als die Zellen die mit pTargetF-*ribA* transformiert wurden. In Abbildung 18 sind die Agarplatten der entsprechenden Kontrollen im Vergleich zu sehen. Bildabschnitt A zeigt die pTargetF-*ribA*-G Kontrolle, die etwa um den Faktor 10^3 geringere Wachstumsraten aufweist, als die Kontrolle von pTargetF-*ribA* (s. Bildabschnitt B). Aufgrund der deutlich reduzierten Anzahl von Kolonien bei den pTargetF-*ribA*-G Ansätzen trotz nahezu identischer zur

Transformation verwendeter DNA-Konzentrationen, lag die Vermutung nahe, dass die Modifizierung der crRNA-Sequenz und die damit einhergegangene Reduktion von Poly-PAM-Motiven (NCC-Motiven) innerhalb der *Target*-Sequenz, zu einer Optimierung des CRISPR-Cas9 vermittelten *Targetings* von *ribA* geführt hatte.

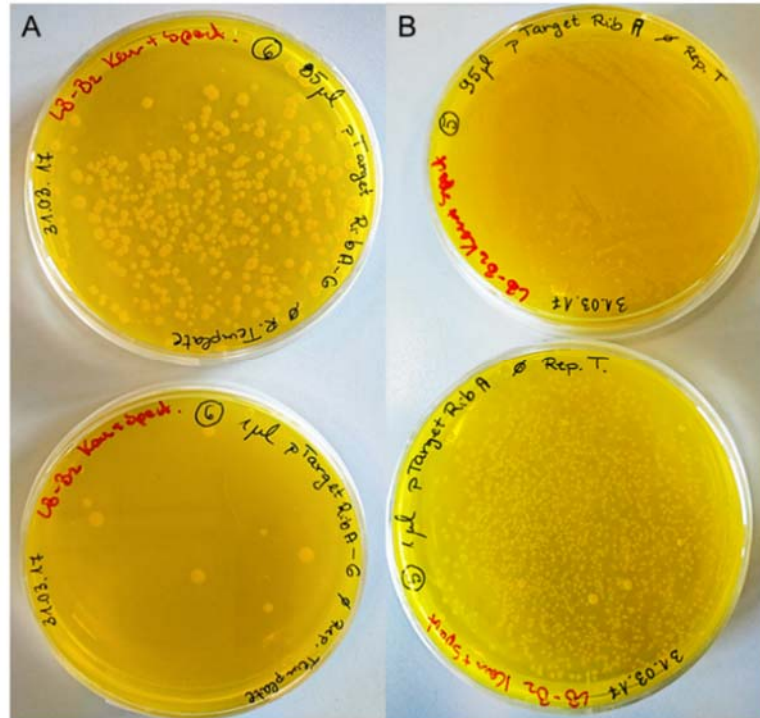


Abbildung 18: Überlebende Transformanten nach dem CRISPR-Cas9-Event zum *Knockout* von *ribA*. Das Bild zeigt die jeweiligen Kontrollansätze von pTargetF-*ribA*-G (A) und pTargetF-*ribA* (B), welche ohne das *Donor-Template* transformiert wurden. Auf den Agarplatten im oberen Abschnitt wurden jeweils 95 µL der Zellsuspensionen und auf den unteren 1 µL ausplattiert.

Von den CRISPR-Cas9-Ansätzen die mit pTargetF-*ribA*-G sowie dem *Donor-Template* transformiert wurden, wurden analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise einige Kolonien mit Hilfe eines Wachstumstests auf LB-Nährböden mit und ohne den Zusatz von Riboflavin auf ein Riboflavin-abhängiges Wachstum überprüft (s. 7.1.5). Von 25 Kolonien, die auf dem mit Riboflavin supplementierten LB-Agar wuchsen, zeigten 17 Kolonien auf dem LB-Nährboden ohne Riboflavin keinerlei Wachstum, was auf einen erfolgreichen *Knockout* der Cyclohydrolyase II (RibA) in diesen Zellen hindeutete (s. Abbildung 19A). Zur Bestätigung dieses initialen Ergebnisses wurden 14 der Riboflavin-auxotrophen Kolonien mittels Kolonie-PCR (s. oben und 7.2.7.1) auf das Vorhandensein der Überlappungssequenz des *Donor-Templates* im *ribA*-Gen getestet. Als Positiv-Kontrolle für die PCR wurde erneut die *Donor-Template*-DNA (D*TribA*) verwendet. Als Negativ-Kontrollen dienen BL21-Kolonien des Kontroll-Ansatzes sowie zwei der Kolonien (K6- und K21-), die im Wachstumstest kein Riboflavin-abhängiges Wachstum gezeigt hatten. Während keine der Negativ-Kontrollen im Elektropherogramm des Agarosegels eine DNA-Bande zeigte, konnten sowohl für die Positiv-Kontrolle als auch für alle 14 Riboflavin-auxotrophen Kolonien, DNA-Fragmente der erwarteten Größe (411 bp) erhalten

werden (s. Abbildung 19B). Die modifizierte crRNA von pTargetF-*ribA*-G war demnach in der Lage ein effizientes *Targeting* der Zielsequenz zu induzieren und somit die Rekombination bzw. Reparatur der *Target*-Sequenz mit dem entsprechenden *Donor-Template* zu triggern. Die Mutationsrate der BL21-Zellen lag in Bezug auf das Ergebnis des Wachstumstests bei etwa 68% (17 von 25 Kolonien) und somit in einem ähnlichen Bereich wie in der Studie von Chung et al. (2017).

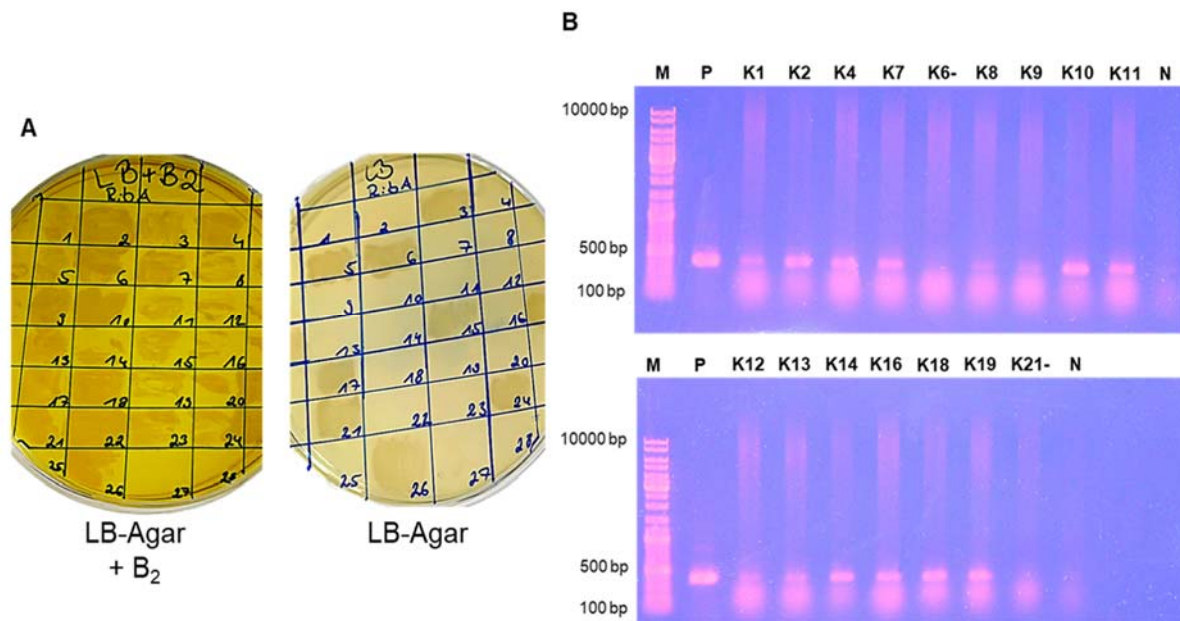


Abbildung 19: Wachstumstest einiger Kolonien nach dem CRISPR-Cas9-Event mit pTargetF-*ribA*-G (A) und anschließende Untersuchung der Riboflavin-auxotrophen Kolonien in der Kolonie-PCR (B). DNA-Marker (M), getestete Riboflavin-auxotrophe Kolonien (K1, K2, K4, K7-K14, K16, K18, K19), getestete Kolonien, die ohne B₂-Supplementierung wuchsen (K6-, K21-), Negativ-Kontrolle (N), Positiv-Kontrolle (P).

Zwei der in der Kolonie-PCR bestätigten *ribA*-Mutanten wurden schrittweise zunächst einem Plasmid-*Curing* von pTargetF und anschließend von pCas unterzogen (s. 7.2.9.1). Von den Plasmid-freien Zellen wurden wie unter 7.1.1 beschrieben Dauerkulturen hergestellt. Anschließend wurde mit Hilfe von zwei, die Mutation im Genbereich von *ribA* flankierenden Primern (AmLfw und AmRr) und einer präparativen PCR (s. 7.2.7.2) der DNA-Abschnitt einer der resultierenden Plasmid-freien Kolonien amplifiziert. Das erhaltene DNA-Fragment wurde aufgereinigt und mittels SANGER-Sequenzierung und dem Sequenzierungsprimer Cycfw (Primer-Sequenzen s. Anhang 3) sequenziert. Das Elektropherogramm und die resultierende DNA-Sequenz wurden mit Hilfe des Genome Compilers abgebildet und unter Anwendung der *Alignment*-Funktion wurde der entsprechende Sequenzabschnitt mit der *ribA*-DNA-Sequenz des Wildtyp-Stammes verglichen (s. Abbildung 20A).

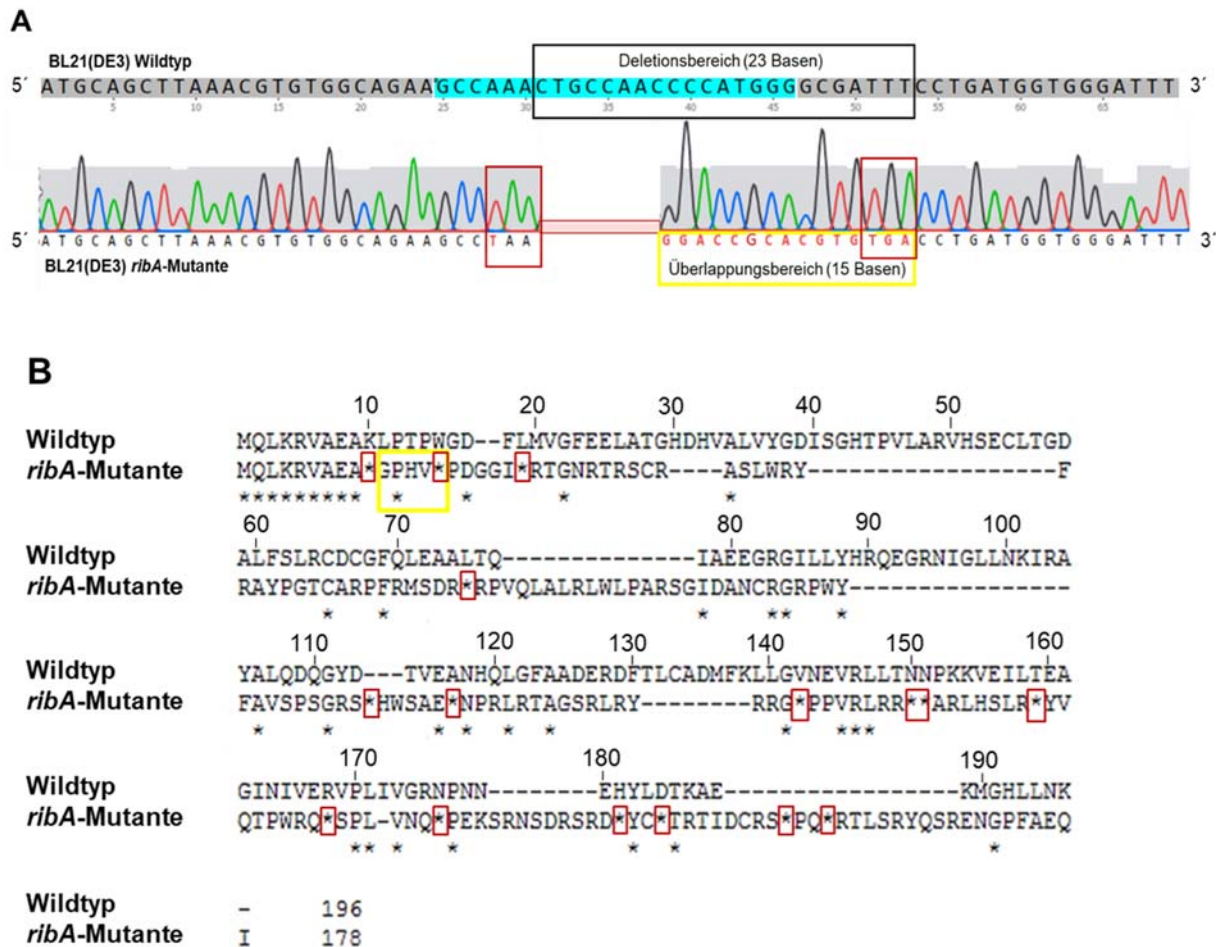


Abbildung 20: Alignments der *ribA*-Gensequenzen (A) sowie der Aminosäuresequenzen (B) des BL21(DE3)-Wildtyp-Stammes (Annotationsnummer: ACT43142.1) und der *ribA*-Mutante. Die *Target*-Sequenz (hier: Darstellung des 5'-3'-Strangs) von *ribA*-G ist in der Gensequenz türkis hinterlegt. Die in der *ribA*-Mutante deletierten 23 Basen (Abbildung A) sind in der ursprünglichen Sequenz durch einen schwarzen Rahmen hervorgehoben. Rekombinante Basen sind in Rot dargestellt. Die roten Rahmen kennzeichnen in beiden Abbildungen die Positionen der in der *ribA*-Mutante eingeführten bzw. durch die Leserasterverschiebung entstandenen Stopcodone. Die in Folge der Rekombination/Reparatur mit dem *Donor-Template* eingebrachte Insertion des Überlappungsbereichs wurde jeweils gelb hervorgehoben (angefertigt mit der Genome Compiler-Software (A) und dem Alignment-tool Clustal Omega (B)).

Das Elektropherogramm der *ribA*-Mutante zeigte eine, in Übereinstimmung mit dem Design des *Donor-Template*s modifizierte DNA-Sequenz (vgl. Anhang 5, Tabelle 46). Es wurde an Position 28 innerhalb der *Target*-Sequenz eine Punktmutation eingeführt, die zur Entstehung eines Stopcodons (TAA) führte. Die PAM-Region (5'-GGG-3') und ein großer Teil der *Target*-Sequenz von *ribA*-G (13 von 20 bp) sowie sieben weitere Basen wurden deletiert und durch die 15-bp Sequenz des Überlappungsbereichs ersetzt, welcher am Ende ein weiteres Stopcodon (TGA) enthielt. Die aus den entsprechenden Genmutationen resultierende Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins wird in Abbildung 20B dargestellt.

Neben den oben genannten Stopcodonen an Position 10 und 15 der Aminosäuresequenz kam es durch die Deletion bzw. Insertion mehrerer Basen im Bereich der ursprünglichen *Target*-Region zu einer Verschiebung des Leserasters und zur Entstehung von 14 weiteren Stopcodonen. Diese mehrstufigen Mutationen in der Gensequenz führten wie eingangs geplant zu

dem Verlust eines großen Anteils der Aminosäuresequenzidentität von RibA (ca. 11% verbleibende Sequenzidentität). Das größte Peptid mit einer bestehenden Sequenzidentität zu RibA umfasste lediglich neun Aminosäuren (s. Abbildung 20B, Position 1-9).

4.1.5.2 CRISPR-Cas9 induzierte *Knockouts* der Riboflavinsynthase (RibC) und der Riboflavin-Mutase (RibB)

Aufgrund der Feststellung, dass einige crRNAs möglicherweise nicht effizient an ihre *Target*-Sequenzen binden bzw. keinen Doppelstrangbruch induzieren, wurden wie unter 4.1.1 beschrieben, für die weiteren *Knockouts* von *ribB* und *ribC* jeweils zwei, in unmittelbarer Nähe zueinander liegende *Target*-Sequenzen ausgewählt. Wie im Abschnitt unter 4.1.5.1 erläutert, konnte festgestellt werden, dass crRNAs mit repetitiven Basen (insbesondere Guanin-Nukleotide) mit einer signifikant geringeren CRISPR-Cas-Aktivität korrelieren (Wang et al., 2015). Daher wurde bei dem Design nachfolgender crRNA-Sequenzen (s. 4.1.1) darauf geachtet, dass diese nicht mehr als drei (im Falle von Adenin, Cytosin und Thymin) bzw. zwei (im Falle von Guanin) hintereinanderliegende Basen aufweisen. Zudem wurden *Target*-Sequenzen, welche eine erweiterte PAM-Region aufwiesen, von der Auswahl ausgeschlossen. Die parallele Modifikation der entsprechenden Plasmide pTargetF-*ribB1/B2* bzw. pTargetF-*ribC1/C2* (s. 4.1.2) und die universell für die jeweiligen CRISPR-Cas9-Versuche konstruierten *Donor-Templates* (s. 4.1.3: D*TriB* und D*TriB*C) sollten einem größeren zeitlichen und labortechnischen Mehraufwand in Folge evtl. ineffizienter crRNA-Sequenzen vorbeugen bzw. weitere Merkmale/Gemeinsamkeiten von effizienten crRNA-Sequenzen aufzeigen.

Nachdem für den *Knockout* von *ribA*, erfolgreich ein genomischer Bereich von insgesamt 23 bp deletiert werden konnte, wurde dieser für *ribC* (-87 bp) und *ribB* (-176 bp) schrittweise erhöht, um zu evaluieren, bis zu welcher Größe Deletionen effizient induziert werden können. Die Durchführung der CRISPR-Cas9-Events für die *Knockouts* von RibC und RibB erfolgte analog zu den unter 4.1.5.1 genannten, optimierten Bedingungen. Die CRISPR-Cas9-Events wurden parallel mit den jeweiligen pTargetF-Plasmiden (pTargetF-*ribC1/C2* bzw. pTargetF-*ribB1/B2*) durchgeführt. Zusätzlich zu den CRISPR-Cas-Ansätzen, wurden erneut Kontrollansätze ohne die *Donor-Template*-DNA durchgeführt. Wie bereits bei den CRISPR-Cas9-Events mit pTargetF-*ribA* und pTargetF-*ribA-G* beobachtet, zeigten sich auch bei den *Knockout*-Versuchen von *ribC* und *ribB* teilweise große Unterschiede bezüglich der Überlebensraten der Zellen. Eine deutlich verminderte Zellwachstumsrate, sollte wie eingangs vermutet, ein Hinweis auf eine effiziente crRNA sein. Diese zeigte sich bei den CRISPR-Cas9-Events, die mit den Plasmiden pTargetF-*ribB1* bzw. pTargetF-*ribC2* durchgeführt wurden. Die Zellen, welche mit pTargetF-*ribB2* bzw. pTargetF-*ribC1* transformiert wurden, zeigten eine im Vergleich deutlich höhere Überlebensrate. In Abbildung 21 sind zur weiteren Veranschaulichung die Agarplatten der Kontrollansätze von pTargetF-*ribC1* (A) und pTargetF-*ribC2* (B) sowie die des CRISPR-Cas-Ansatzes mit pTargetF-*ribC2* und dem *Donor-Template* (C) zu sehen.

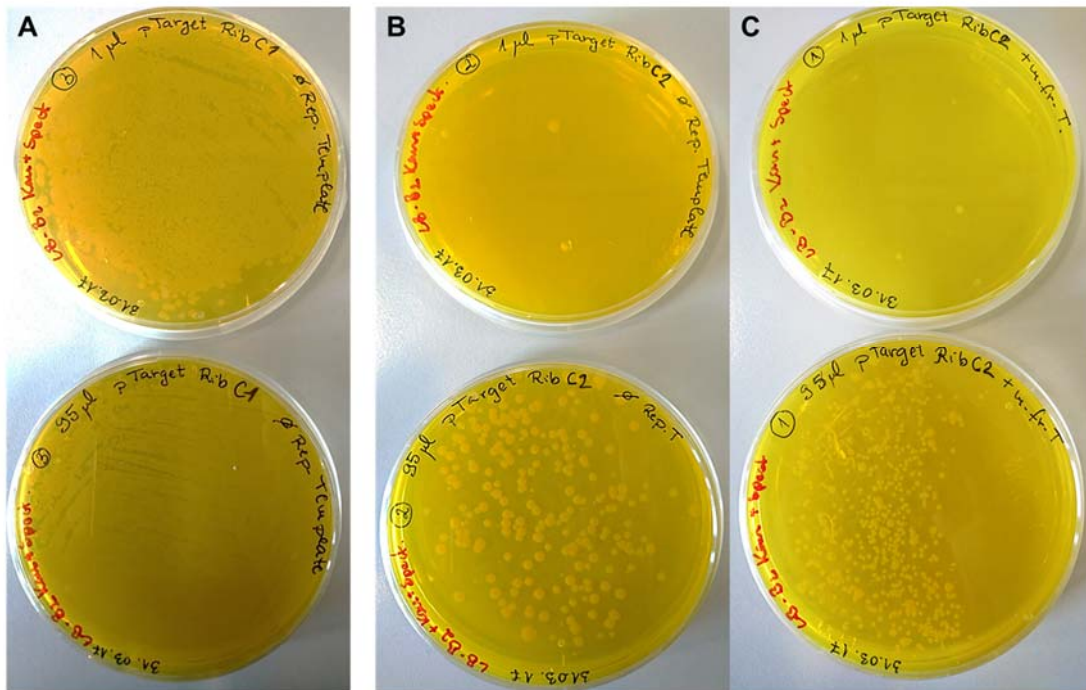


Abbildung 21: Überlebende Transformanten nach dem CRISPR-Cas9-Event zum *Knockout* von *ribC*. Das Bild zeigt die Kontrollansätze (Transformation ohne *Donor-Template*) mit pTargetF-*ribC1* (A) und pTargetF-*ribC2* (B) sowie den CRISPR-Cas-Ansatz mit pTargetF-*ribC2* (C). Auf den Agarplatten im oberen Abschnitt wurden jeweils 1 µL der Zellsuspensionen und auf den unteren 95 µL ausplattiert.

Wie bereits bei den CRISPR-Cas-Events zum *Knockout* von *ribA* beobachtet, zeigte der Kontrollansatz von pTargetF-*ribC2* gegenüber dem Ansatz, der mit dem *Donor-Template* cotransformiert wurde, eine verminderte Zellwachstumsrate (etwa um den Faktor 2-3). Auffälligkeiten zeigten sich jedoch auch in der unterschiedlichen Größe der einzelnen Kolonien. Der Kontrollansatz (B) wies vorwiegend große Kolonien auf, während auf den Agarplatten des CRISPR-Cas-Events (C) eine deutlich höhere Anzahl an kleinen Kolonien wuchsen. Es wurde vermutet, dass es sich bei den auffallend großen Kolonien um so genannte *Escaper-Zellen* handelt, die durch unbekannte Mechanismen, der Selektion durch das CRISPR-Cas9 System entkommen sind, während die kleinen Kolonien die Zellen abbilden, welche mit Hilfe des *Donor-Templates* rekombiniert bzw. anhand eines intakten Genomäquivalents repariert wurden.

Von den CRISPR-Cas9-Ansätzen die mit pTargetF-*ribC1* bzw. *C2* oder pTargetF-*ribB1* bzw. *B2* sowie dem entsprechenden *Donor-Template* transformiert wurden, wurden erneut einige Kolonien mit Hilfe eines Wachstumstests auf LB-Nährböden mit und ohne den Zusatz von Riboflavin auf ein Riboflavin-abhängiges Wachstum überprüft (s. 7.1.5). Entsprechend der aufgestellten Hypothese und der deutlich höheren Überlebensrate der Zellen, die mit pTargetF-*ribB2* bzw. pTargetF-*ribC1* transformiert wurden, zeigte keine der getesteten Kolonien (jeweils 25, zufällig ausgewählt) ein Riboflavin-abhängiges Wachstum, während von den CRISPR-Cas9-Events, die mit den Plasmiden pTargetF-*ribC2* bzw. pTargetF-*ribB1* durchgeführt wurden, mehrere Riboflavin-abhängige Kolonien erhalten wurden (etwa 60-70% der getesteten Kolonien). Im nächsten Schritt wurden von den erfolgreichen CRISPR-Cas9-Events (*ribC2* und

anschließend *ribB1*) erneut einige Kolonien im Wachstumstest überprüft, diesmal wurden jedoch kleine und große Kolonien separat getestet und markiert. Von den auffallend großen Kolonien (jeweils 7 von *ribC2* und *ribB1*), zeigte entsprechend der Annahme, dass es sich hierbei um Zellen handelt, welche der CRISPR-Cas-Selektion entkommen konnten, keine Kolonie ein Riboflavin-abhängiges Wachstum (Ergebnisse nicht gezeigt). Von den kleinen Kolonien (*ribC1*: 27 Kolonien; *ribB1*: 6 Kolonien) zeigten hingegen ca. 89% bzw. 83% der Kolonien eine Riboflavin-Defizienz (s. Abbildung 22). Einige der im Wachstumstest überprüften Kolonien wurden anschließend in der Kolonie-PCR (s. 7.2.7.1) mit Hilfe der jeweiligen flankierenden Primer der *Donor*-Templates (CmLfw und CmRr bzw. BmLfw und BmRr, Primer-Sequenzen s. Anhang 3) auf die zu erwartenden Mutationen getestet. Alle in der Kolonie-PCR getesteten Riboflavin-auxotrophen Kolonien wiesen ein entsprechend der geplanten Mutationen (vgl. Tabelle 5: *ribC* = -71 bp bzw. *ribB* = -161 bp) verkürztes Fragment gegenüber den getesteten Negativ-Kontrollen auf (s. Abbildung 22). Demzufolge konnten in dieser Arbeit auch größere Abschnitte des *E. coli*-Genoms mit Hilfe des CRISPR-Cas9 Systems deletiert werden.

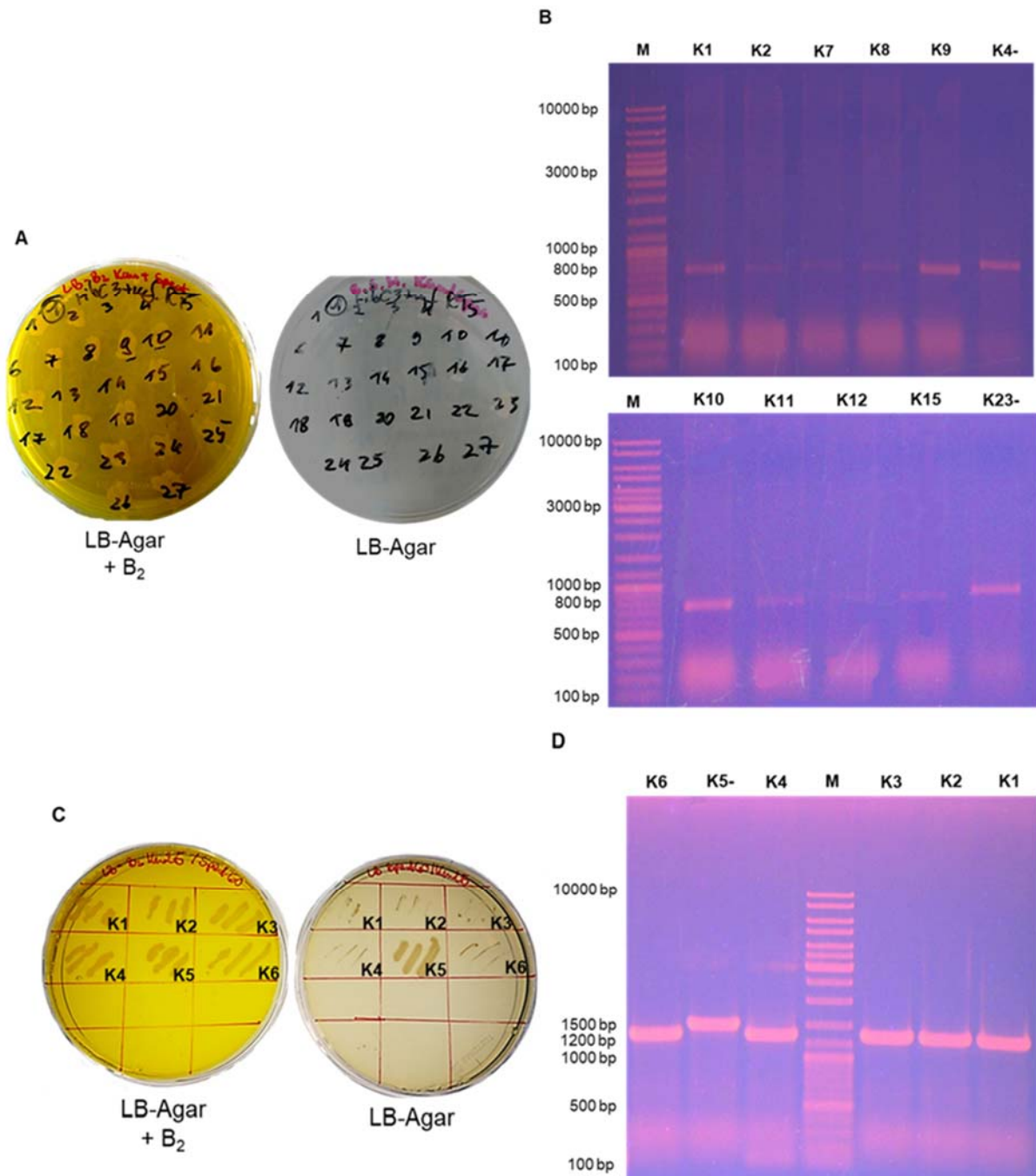


Abbildung 22: Wachstumstests einiger Kolonien nach den CRISPR-Cas9-Events mit pTargetF-*ribC2* (A) und pTargetF-*ribB1* und anschließende Untersuchung der Riboflavin-auxotrophen Kolonien in der Kolonie-PCR (B und D). DNA-Marker (M), getestete Riboflavin-auxotrophe Kolonien von *ribC2* (K1, K2, K7-K12, K15) und *ribB1* (K1-K4), getestete Kolonie, die ohne B₂-Supplementierung wuchsen (*ribC2*: K4-, K23-; *ribB1*: K5-).

Zudem konnte gezeigt werden, dass durch eine Diskriminierung auffallend großer Kolonien, die keine Mutationen aufweisen, der *Screening*-Umfang nach einem CRISPR-Cas9-Event weiter reduziert werden kann. Das Auftreten solcher "Escaper-Zellen" wurde bereits beschrieben und wird auf eventuelle Deletionen oder Mutationen der Cas9- bzw. crRNA-Sequenz oder auf eine DNA-Reparatur mit Hilfe des alternativen *End-Joinings* und/oder des *Mismatch-Repair*-Systems (MMR) zurückgeführt (Jiang et al., 2013; Sharan et al., 2009; Y. Jiang et al., 2015).

Den hier dargestellten Ergebnissen zur Folge lassen sich ineffiziente crRNAs zudem nicht nur an einer hohen Zellüberlebensrate (s. Abbildungen 21A und 18B: Kontrollansätze pTargetF-*ribC1* und pTargetF-*ribA*), sondern auch an einer geringen Anzahl von *Escaper*-Zellen erkennen (vgl. Abbildung 18B mit Abbildungen 18A/21B: Kontrollansätze von pTargetF-*ribA*, pTargetF-*ribA-G* und pTargetF-*ribC2*). Das verminderte Auftreten von *Escaper*-Zellen bei CRISPR-Cas9-Events mit ineffizienten crRNAs ließe sich dadurch erklären, dass in diesem Falle auch der Selektionsdruck deutlich geringer ausfällt.

Jeweils zwei der in der Kolonie-PCR bestätigten *ribB*- bzw. *ribC*-Mutanten wurden einem Plasmid-*Curing* unterzogen (s. 7.2.9.1). Von den Plasmid-freien Zellen wurden wie unter 7.1.1 beschrieben Dauerkulturen hergestellt. Anschließend wurde erneut mit Hilfe der jeweiligen flankierenden Primer der *Donor*-Templates (CmLfw und CmRr bzw. BmLfw und BmRr, Primer-Sequenzen s. Anhang 3) und einer präparativen PCR (s. 7.2.7.2) der DNA-Abschnitt einer der jeweiligen Plasmid-freien Kolonien amplifiziert. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden aufgereinigt und mittels SANGER-Sequenzierung (s. 7.2.10) und den Primern CmLfw bzw. BmRr sequenziert.

Die Elektropherogramme und die resultierenden DNA-Sequenzen wurden mittels der Benchling Software abgebildet und unter Anwendung der *Alignment*-Funktion wurden die entsprechenden Sequenzabschnitte mit der *ribC*- bzw. *ribB*-DNA-Sequenz des Wildtyp-Stammes verglichen (s. Abbildungen 23A und 24A). Beide Elektropherogramme zeigten eine, in Übereinstimmung mit dem Design des jeweiligen *Donor-Templates* modifizierte DNA-Sequenz (vgl. Anhang 5, Tabelle 46). Bei der *ribC*-Mutante wurden die gesamte *Target*-Sequenz inkl. der PAM-Region (5'-AGG-3') sowie 64 weitere Basen deletiert und durch eine 16-bp Sequenz des Überlappungsbereichs ersetzt, welche am Ende ein Stopcodon (TGA) einbrachte. Die aus den entsprechenden Genmutationen resultierende Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins wird in Abbildung 23B dargestellt. Neben dem oben genannten Stopcodon an Position 79 der Aminosäuresequenz kam es durch die Deletion bzw. Insertion mehrerer Basen im Bereich der ursprünglichen *Target*-Region zu einer Verschiebung des Leserasters und zur Entstehung von insgesamt sechs weiteren Stopcodonen. Diese mehrstufigen Mutationen in der Gensequenz führten zu einem großen Verlust der Aminosäuresequenzidentität von RibC (ca. 45% verbleibende Sequenzidentität).

Das größte Peptid mit einer bestehenden Sequenzidentität zu RibC befand sich am N-Terminus des Proteins und umfasste 74 Aminosäuren (s. Abbildung 23B, Position 1-74).



Abbildung 23: Alignments der *ribC*-Gensequenzen (A) sowie der Aminosäuresequenzen (B) des BL21(DE3)-Wildtyp-Stammes (Annotationsnummer: ACT43491.1) und der *ribC*-Mutante. Die *Target*-Sequenz (hier: Darstellung des 5'-3'-Strangs) von *ribC* ist in der Gensequenz türkis hinterlegt. Die in der *ribC*-Mutante deletierten 87 Basen (Abbildung A) sind in der ursprünglichen Sequenz durch einen schwarzen Rahmen hervorgehoben und im Elektropherogramm der *ribC*-Mutante durch die rot hinterlegte gestrichelte Linie bzw. die rot hinterlegten Basen gekennzeichnet. Die roten Rahmen kennzeichnen in beiden Abbildungen die Positionen der in der *ribC*-Mutante eingeführten bzw. durch die Leserasterverschiebung entstandenen Stopcodone. Die in Folge der Rekombination/Reparatur mit dem *Donor-Template* eingebrachte 16-bp Insertion des Überlappungsbereiches wurde jeweils gelb hervorgehoben (angefertigt mit der Benchling Software (A) und dem Alignmenttool Clustal Omega (B)).

Das Alignment des Elektropherogramms der *ribB*-Mutante mit der *ribB*-DNA-Sequenz des Wildtyp-Stammes ist in Abbildung 24A dargestellt. Der Deletionsbereich umfasste für die *ribB*-Mutante insgesamt 176 bp und beinhaltete die gesamte *Target*-Sequenz inkl. der PAM-Region (5'-AGG-3'). Durch die erfolgreiche Rekombination mit dem *Donor-Template* wurde außerdem, wie bereits bei den anderen CRISPR-Cas9 induzierten Mutationen beschrieben, eine 15-bp umfassende Sequenz (Überlappungsbereich) eingebracht, welche am Ende ein Stopcodon (TGA) enthält. Die resultierende Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins wird in Abbildung 24B dargestellt. Neben dem oben genannten Stopcodon an Position 152 der Aminosäuresequenz kam es durch die Deletion bzw. Insertion mehrerer Basen im Bereich der ursprünglichen *Target*-Region zu einer Verschiebung des Leserasters und zur Entstehung von

zwei weiteren Stopcodonen (Position 158 und 160 in der Aminosäuresequenz). Aufgrund dessen, dass für das Gen *ribB* keine geeignete *Target*-Sequenz gefunden werden konnte, die sich in der unmittelbaren Nähe der TSS befand (s. 4.1.1) und aufgrund des Designs des *Donor-Templates* (DTribB), blieb ein größerer Aminosäuresequenzabschnitt im Bereich des N-Terminus von RibB erhalten (s. Abbildung 24B, Position 1-147). Die eingebrachten Mutationen führten zu einem Sequenzidentitätsverlust bzw. einer Deletion von insgesamt 70 von 217 Aminosäuren am C-Terminus des Proteins.

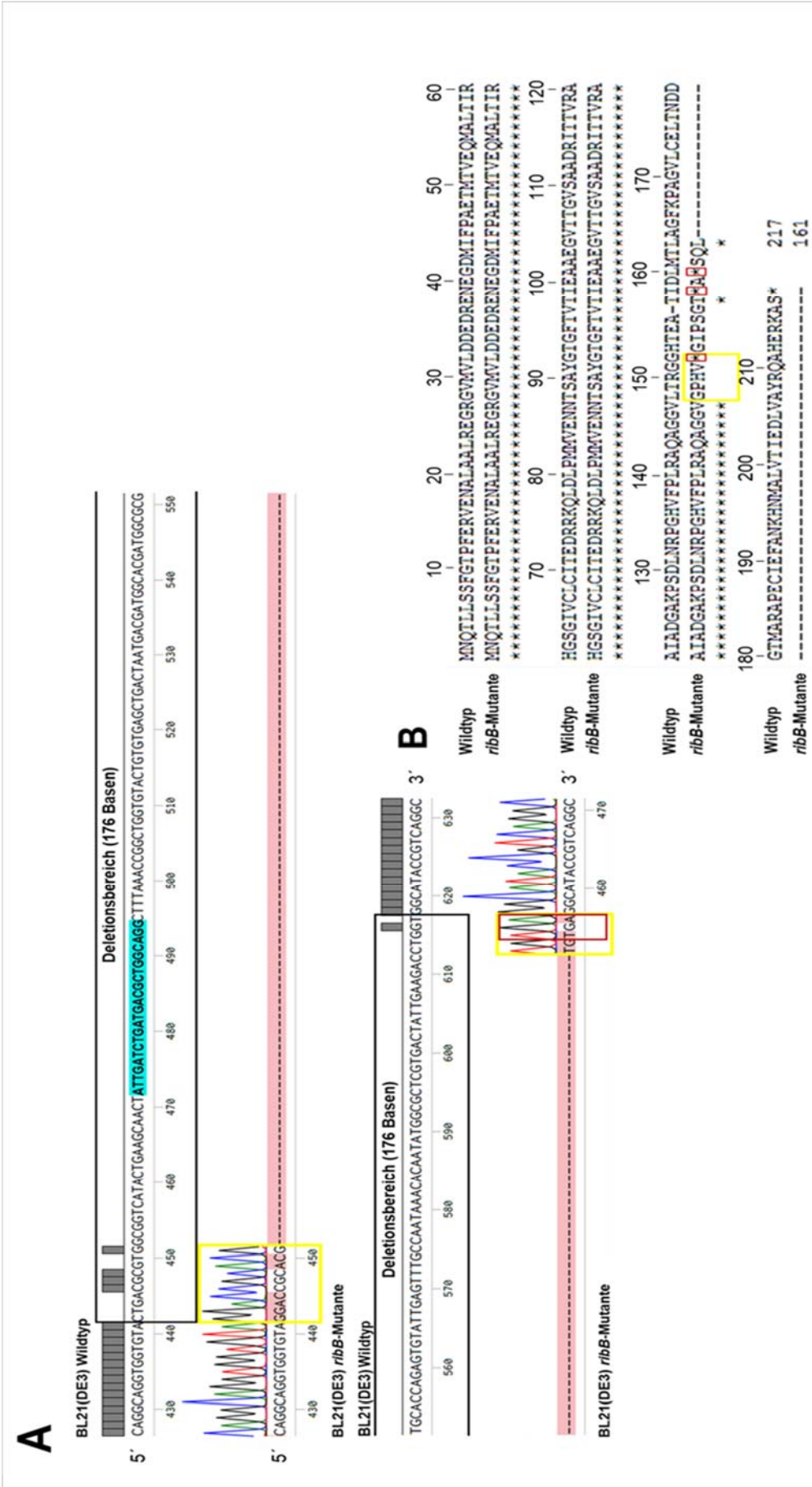


Abbildung 24: Alignments der *ribB*-Gensequenzen (A) sowie der Aminosäuresequenzen (B) des BL21(DE3)-Wildtyp-Stammes (Annotationsnummer: ACT44717.1) und der *ribB*-Mutante. Die Target-Sequenz (hier: Darstellung des 5'-3'-Strangs) von *ribB* ist in der Gensequenz türkis hinterlegt. Die in der *ribB*-Mutante durch die rot hinterlegte gestrichelte Linie sind in der ursprünglichen Sequenz durch einen schwarzen Rahmen hervorgehoben und im Elektroferogramm der *ribB*-Mutante der *ribB*-Mutante eingeführten bzw. durch die Leserasterverschiebung entstandenen Stopcodone. Die in Folge der Rekombination/Reparatur mit dem Donor-Templat eingebrachte 15-bp Insertion des Überlappungsbereiches wurde jeweils gelb hervorgehoben (angefertigt mit der Benchling-Software (A) und dem Alignmenttool Clustal Omega (B)).



4.1.6 Diskussion der Bedeutung effizienter crRNAs für die CRISPR-Cas9 vermittelte Genom Editierung in Prokaryoten

In den letzten Jahren wurde zunehmend festgestellt, dass crRNAs deutliche Unterschiede in ihrer Effizienz aufweisen, die Cas9-Nuklease zu ihrem jeweiligen Zielort zu bringen und/oder einen Cas9-vermittelten Doppelstrangbruch zu induzieren (Doench et al., 2014; Doench et al., 2016; Wong et al., 2015). Wie eingangs erwähnt, beschränkten sich diese Beobachtungen zunächst auf die Genom Editierung in Eukaryoten, weshalb auch die bioinformatischen Methoden, welche für die Ermittlung effizienter crRNAs entwickelt wurden, ausschließlich auf eine eukaryotische Anwendung ausgerichtet waren. Guo et al. (2018) vermuten das dieser Umstand der herkömmlichen Auffassung geschuldet sei, dass die DNA in prokaryotischen Zellen aufgrund des Mangels an komplexen Chromatinstrukturen weniger geschützt wäre, als in eukaryotischen Zellen, weshalb vielfach angenommen wurde, dass die Genom Editierung in prokaryotischen Organismen gut funktionieren müsse.

Mittlerweile wurden Effizienzunterschiede von crRNA-Sequenzen jedoch auch bei der Genom Editierung von Prokaryoten festgestellt. Zwei umfangreiche Studien konnten zeigen, dass von zufällig ausgewählten crRNAs, die verschiedene genomische Loci zum Ziel hatten, zwischen 10% und 60% nicht in der Lage waren einen CRISPR-Cas9 induzierten Zelltod auszulösen (Cui & Bikard, 2016; Zerbini et al., 2017). Eine weitere Studie untersuchte insgesamt 70 000 crRNAs und fand heraus, dass eine hohe Anzahl der crRNAs (ca. 35%) das Wachstum von *E. coli* lediglich um das 10-fache oder weniger hemmen konnte, was in einer hohen Anzahl überlebender Wildtyp-Zellen resultierte (Guo et al., 2018). Zudem konnten sie nachweisen, dass es trotz der leichten Zugänglichkeit der DNA in Bakterien, einige Bereiche auf dem Genom gibt, die in Bezug auf die Aktivität des CRISPR-Cas9 Systems vollständig resistent sind. Cui und Bikard (2016) konnten zudem zeigen, dass auch die weniger effizienten crRNAs, Cas9-induzierte Doppelstrangbrüche auslösen, diese jedoch in Anwesenheit des Reparaturproteins RecA und verbleibender intakter Kopien der Genabschnitte (Genomäquivalente) über den HR-Mechanismus wieder repariert werden. Nur besonders aktive crRNAs, die in der Lage sind gleichzeitig alle vorhandenen Kopien zu schneiden, können demnach in Anwesenheit von RecA einen Zelltod induzieren. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in dieser Arbeit gemacht: Bei 50% (drei von sechs) der zur Genome Editierung von *E. coli* verwendeten crRNAs kam es nach der Aktivierung des CRISPR-Cas9 Systems zu keiner signifikant reduzierten Zellviabilität und es wurden in den nachfolgenden *Screenings* keine Mutanten selektiert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die sorgfältige Auswahl von effizienten crRNAs nicht nur für eine Anwendung in Eukaryoten, sondern auch für eine erfolgreiche prokaryotische Genom Editierung von entscheidender Bedeutung ist.

Merkmale effizienter crRNAs und Eignung von Vorhersagealgorithmen zur Auswahl von crRNAs für die prokaryotische Anwendung

Mittlerweile gibt es zahlreiche Online-Tools zur Vorhersage von spezifischen und teilweise auch von effizienten crRNAs, welche auf verschiedene Genome (z. B. Menschen, Pflanzen, Fliegen, Hefen, Zebrafische und Mäuse) bzw. Zelltypen spezialisiert sind (s. Review: Liu et al., 2020). Eine Anwendung, welche die Vorhersage von effizienten crRNAs in Prokaryoten ermöglicht und dessen Algorithmen ebenfalls auf den Ergebnissen prokaryotischer Studien basieren, war zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit jedoch nicht verfügbar.

Die in dieser Arbeit verwendeten crRNAs wurden mit Hilfe des Online-Tools CRISPR-ERA ausgewählt. Es handelte sich dabei um eine der wenigen Anwendungen, welche neben der Suche nach eukaryotischen *Target*-Sequenzen auch die Auswahl von spezifischen *Target*-Sequenzen in einigen Bakterien ermöglichte. Auch einige Effizienzkriterien wurden vom Vorhersagealgorithmus der Anwendung bereits berücksichtigt, diese beschränkten sich jedoch auf allgemeingültige Erkenntnisse, welche auch für das Design effizienter PCR-Primer gelten (bspw. moderater GC-Gehalt, Vermeidung von *Poly-T*-Sequenzen; s. auch 4.1.1).

Zahlreiche Studien konnten in den letzten Jahren weitere Faktoren für die Effizienz von crRNA-Sequenzen aufzeigen: Neben Sequenzmerkmalen wie bspw. einzelner Nukleotidpositionen, oder dem GC-Gehalt sowie genetischen und epigenetischen Merkmalen (Chromatin-Zugänglichkeit, Genexpression), scheinen auch energetische Eigenschaften (RNA-Sekundärstruktur, Schmelztemperatur, freie Energie) die Effizienz von crRNAs zu beeinflussen (s. Review: Liu et al., 2020). Einige Sequenzmerkmale wie bspw. das Vorhandensein von mehreren PAM-Motiven innerhalb der *Target*-Sequenz wurden bereits in dieser Arbeit als mögliche Ursache von ineffizienten crRNAs diskutiert (s. 4.1.5.1 und 4.1.5.2). Bisher konnte jedoch nur bei einigen wenigen der identifizierten Effizienz-Merkmale eine Spezies-übergreifende Gültigkeit gefunden werden. Daher ist es fraglich, ob Merkmale aus eukaryotischen Studien auf die Domäne der Prokaryoten übertragbar sind, zumal sich die CRISPR-Cas9-basierte Genom Editierung aufgrund des dort dominierenden NHEJ-Reparatursystems (Lieber, 2008) und der komplexen Chromatinstruktur der chromosomalen DNA (Chang et al., 2016) wesentlich von der in Prokaryoten unterscheidet.

Cui und Bikard (2016) verwendeten bspw. das auf Erkenntnissen von Säugetierzellen basierende Modell von Doench et al. (2016) und berichteten über sehr schlechte Vorhersagen bezogen auf die Aktivität von 13 ausgewählten *Targets* in *E. coli*. Guo et al. (2018) fanden eine sehr geringe Korrelation zwischen dem prokaryotischen Datenset aus ihrer Studie und den Vorhersagen von zwei eukaryotischen Modellen des maschinellen Lernens.

Wang&Zhang (2019) verwendeten elf unabhängige eukaryotische Datensets, um die Validität ihrer mit Prokaryoten trainierten Modelle zu untersuchen und konnten zeigen, dass ihre Mo-

delle zwar innerhalb der Domäne der Prokaryoten valide sind, jedoch nicht zwischen den verschiedenen Domänen. Zusätzlich untersuchten sie die Basenpräferenzen an verschiedenen Positionen im Bereich der *Target*-DNA von Prokaryoten und Eukaryoten und fanden auch hier große Unterschiede zwischen den beiden Domänen.

Trotz der teilweise großen Differenzen zwischen den einzelnen Vorhersagen der entsprechenden Modelle, scheinen einige Merkmale wie bspw. der GC-Gehalt, die Bedeutung der *Seed-Region* und das Potenzial zur Ausbildung von Sekundärstrukturen, Spezies- und evtl. auch Domänen-übergreifend gültig zu sein (Guo et al., 2018; Liu et al., 2020; Wang & Zhang, 2019).

Die in dieser Arbeit für die Genom Editierung von *E. coli* verwendeten crRNA-Sequenzen wiesen alle einen moderaten GC-Gehalt (45-60%) auf (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Merkmale der für die Genom Editierung in *E. coli* verwendeten crRNA-Sequenzen. Die crRNA-Sequenzen, welche sich als ineffizient erwiesen haben, wurden rot hinterlegt. Die Base, die sich unmittelbar vor der PAM-Region befindet (Position 20 bzw. 19 der crRNAs) wurde Fett hervorgehoben.

<i>Knockout</i>	crRNA (5' → 3')	GC-Gehalt [%]	Minimale freie Energie [kcal/mol]
<i>ribA</i>	GCCAAACUGCCAACCCCAUG	60	0,00
<i>ribA-G</i>	GCCAAACUGCCAACCCCAU	58	0,00
<i>ribB1</i>	AUUGAUCUGAUGACGCUGGC	50	0,00
<i>ribB2</i>	GACUAAUGACCAUGGCACGA	50	0,00
<i>ribC1</i>	GGUGCUUCCGUGGCGCAUAA	55	-6,00
<i>ribC2</i>	AUUGGCGGACACUUAUGUC	45	-1,10

Wang und Zhang (2019) berichten in einer aktuellen Studie davon, dass die Base unmittelbar vor der PAM-Region (Position 20) einen großen Einfluss auf die Effizienz der crRNA aufweist und in Prokaryoten eine eindeutige Präferenz für Adenin und Thymin zeigt, während sich die in Eukaryoten präferierten Basen Guanin und Cytosin negativ auf die Effizienz auswirken sollen. In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der genannten Basenpräferenz und der Effizienz der jeweiligen crRNAs festgestellt werden: Während zwei erfolgreich eingesetzte crRNA-Sequenzen eine Cytosin-Base vor der PAM-Region aufweisen, zeigen zwei weitere, nicht effiziente crRNAs die präferierte Thymin-Base. Ein weiteres, in Eukaryoten identifiziertes Merkmal, ist das Potential der crRNAs Sekundärstrukturen auszubilden. Es zeigte sich, dass ineffiziente crRNAs ein deutlich höheres Potenzial zeigen Sekundärstrukturen auszubilden, als gut funktionierende crRNAs (Wong et al., 2015). Ein Zusammenhang zwischen der Wahrscheinlichkeit der Ausbildung einer Sekundärstruktur (hier durch die Berechnung der Minimalen Freien Energie (MFE) charakterisiert und der Effizienz der jeweiligen crRNA, konnte auch in der prokaryotischen Studie von Wang und Zhang (2019) gefunden werden. Die nachträgliche Berechnung der MFEs mittels des Vienna RNA Web-Servers (Gruber et al., 2008) zeigte für fast alle crRNA-Sequenzen keine bzw. geringe (*ribC2* = -1,10 kcal/mol) negative Faltungs-

energien. Ausschließlich die crRNA-Sequenz *ribC1* wies eine auffällig hohe negative Faltungsenergie von -6,00 kcal/mol mit der starken Neigung zur Bildung einer Haarnadel-Struktur auf (s. Anhang 10, Abbildung 48). Es ist davon auszugehen, dass crRNA-Sequenzen, ähnlich wie es bereits in Studien zur Untersuchung der Effizienz von siRNAs gezeigt wurde (Singh et al., 2012), eine möglichst geringe freie Faltungsenergie aufweisen sollten, da Moleküle mit negativen Faltungsenergien eine geringere Zugänglichkeit für die *Target*-Sequenz haben. Die höhere negative Faltungsenergie der crRNA-Sequenz von *ribC1* ist daher möglicherweise eine Ursache für ihre Ineffizienz bei der Genom Editierung von *E. coli*. Aufgrund des geringen Umfangs der verwendeten crRNAs, können hier jedoch lediglich die aktuellen Erkenntnisse effizienter crRNAs für eine Anwendung des CRISPR-Cas9 Systems in Bakterien diskutiert und mit den Daten dieser Arbeit verglichen werden und keine generellen Aussagen über Merkmale von effizienten crRNAs getroffen werden.

Aufgrund der in *E. coli* beobachteten Problematik von ineffizienten crRNAs und im Hinblick darauf, dass ein großer Vorteil des CRISPR-Cas Systems in seiner Anwendung als Multiplex-Methode liegen soll, wird es notwendig sein, dass – wie bereits für zahlreiche eukaryotische Lebewesen vorhanden – geeignete Algorithmen zur Vorhersage gut funktionierender crRNAs entwickelt werden.

4.2 Einzelne und kombinatorische *Knockouts* von putativen Phosphatasen der Riboflavinbiosynthese in *B. subtilis*

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit sollte das CRISPR-Cas9 System auf die Anwendung in dem wirtschaftlich und technologisch bedeutsamen Riboflavinproduzenten *B. subtilis* adaptiert werden. Unmittelbar vor Beginn der Arbeiten erschien erstmals eine wissenschaftliche Veröffentlichung, welche über eine erfolgreiche Anwendung des CRISPR-Cas9 Systems in *B. subtilis* berichtete. Der Autor hatte ein *Shuttle*-Plasmid konstruiert, welches die Modifikation und Vervielfältigung eines CRISPR-Cas9-Plasmids im leicht zu handhabenden Bakterium *E. coli* und die anschließende Transformation und Replikation des CRISPR-Cas9-Plasmids in *B. subtilis* ermöglichte (Altenbuchner, 2016). Das Plasmid pJOE8999 (Vektorkarte s. Anhang 2, Abbildung 41) wurde unserer Forschungsgruppe freundlicherweise von Dr. Josef Altenbuchner (Institut für industrielle Genetik, Universität Stuttgart) zur Verfügung gestellt und sollte genutzt werden, um die drei für die HAD-Phosphatasen codierenden Gene *ycsE*, *yitU* und *ywtE* einzeln und kombinatorisch auszuschalten (s. Ablauf unter 4.2.5.2).

4.2.1 Auswahl der CRISPR-Cas9 *Target*-Sequenzen

Die Auswahl geeigneter *Target*-Sequenzen bzw. crRNA-Sequenzen für die Genom Editierung in *B. subtilis* erfolgte größtenteils analog zu der für *E. coli* beschriebenen Vorgehensweise. Zur Vorhersage spezifischer und effizienter crRNA-Sequenzen wurde ebenfalls das Online-Tool CRISPR-ERA (s. 4.1.1) verwendet und es wurden ausschließlich crRNA-Sequenzen berücksichtigt, die einen maximalen Score von 20 aufwiesen. Die Sequenzen wiesen dementsprechend einen mittleren GC-Gehalt (25-75%), eine geringe Entfernung zur TSS des Zielgens (maximal +300 bp) und eine hohe Spezifität auf (keine identischen genomischen Sequenzen unter Berücksichtigung der PAM-Region (5'-NRG-3', R = A oder G und 1-3 Basen-*Mismatches*). Zusätzlich wurde bei der Auswahl der crRNAs darauf geachtet, dass diese nicht mehr als drei (im Falle von Adenin, Cytosin und Thymin) bzw. zwei (im Falle von Guanin) hintereinanderliegende Basen enthielten. *Target*-Sequenzen, welche eine erweiterte PAM-Region aufwiesen, wurden aufgrund der in *E. coli* festgestellten Schwierigkeiten von der Auswahl ausgeschlossen.

In Abbildung 25 ist ein Ausschnitt der mit Hilfe des Online-Tools CRISPR-ERA ermittelten crRNA-Sequenzen (hier: sgRNA *sequence*) für die *Knockouts* von *ycsE*, *yitU* und *ywtE* dargestellt. Die entsprechenden *Target*-Sequenzen mit den dahinterliegenden PAM-Regionen sind unter 6.7 aufgeführt.

ID	sgRNA sequence	Target Gene	Distance to TSS	Location	Strand	E score	S score	E+S score
18	GGACCATATTCAAATGATGT	ycsE	+277	456345	-	20	0	20
13	TCATCCGCAAGACGACAGCT	yitU	+241	1191061	+	20	0	20
4	ACATTAATGGATCAGGAAGC	ywtE	+230	3695593	-	20	0	20

Abbildung 25: crRNA-Sequenzen (hier sgRNA sequence) für die Knockouts der Enzyme YcsE, YitU und YwtE, die mit Hilfe des CRISPR-ERA Online-Tools und unter den oben aufgeführten Bedingungen ausgewählt wurden. Anmerkung: Die Orientierung der Target-Stränge (hier: Strand) wurde für YcsE und YwtE von der Software nicht korrekt angegeben. Alle crRNA-Sequenzen lagen auf einem 5'-3'-DNA-Strangabschnitt und sollten später mittels komplementärer Basenpaarung an den jeweiligen 3'-5'-DNA-Strangabschnitt (+) binden.

Die in der Anwendung hinterlegte Genomsequenz (*B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168, NCBI-Zugangsnummer: NC_000964) stammte von einem nahen Verwandten des in dieser Arbeit zur Genom Editierung verwendeten Stammes (*B. subtilis* NIG1121). Da die Genomsequenz von *B. subtilis* NIG1121 jedoch bisher nicht veröffentlicht wurde, mussten die jeweiligen Gensequenzen zunächst mittels einer präparativen PCR vervielfältigt (s. 7.2.7.2; für Primer-Sequenzen s. Anhang 3) und sequenziert werden (s. 7.2.10), um diese anschließend mittels BLAST-Algorithmus vergleichen zu können. Die DNA-Sequenzen der beiden Stämme waren im Bereich der ausgewählten Target-Sequenzen zu 100% identisch.

4.2.2 Einbringung der ausgewählten crRNA-Sequenzen zur Herstellung der Plasmide pJOE8999-ycsE, pJOE8999-yitU und pJOE8999-ywtE und Optimierung der SDM-PCR

Analog zur Konstruktion der pTargetF-Plasmide (s. 4.1.2) sollte die SDM-PCR verwendet werden, um die unter 4.2.1 ausgewählten crRNA-Sequenzen sowie zwei SpeI-Restriktionsschnittstellen in das Plasmid pJOE8999 (Vektorkarte s. Anhang 2) einzubringen. Der Ablauf der zweistufigen SDM-PCR ist in Anhang 8, Abbildung 46 schematisch dargestellt. Die SDM-PCR wurde zunächst wie unter 7.2.7.4 beschrieben, durchgeführt (Primersequenzen s. Anhang 3, Tabelle 45).

Die aufgereinigten PCR-Produkte der zweiten SDM-Reaktionen wurden mittels 0,8%iger Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt (s. 7.2.8) und mit Hilfe des DNA-Größenmarkers und den erwarteten Fragmentlängen verglichen. Während für pJOE8999-ycsE ein PCR-Produkt mit der erwarteten Fragmentgröße von ca. 7000 bp erhalten wurde (s. Abbildung 26A), konnten für pJOE8999-yitU und pJOE8999-ywtE keine sichtbaren PCR-Produkte nachgewiesen werden.

Das Plasmid pJOE8999 enthält alle zur Genom Editierung notwendigen Gen-Sequenzen und ist daher wesentlich größer (modifizierte Form ohne *lacZ*-Gen etwa 7,4 kbp) als das Plasmid pTargetF (ca. 2,1 kbp), welches im ersten Teil der Arbeit erfolgreich mittels SDM-PCR modifiziert wurde. Bisher sind nur wenige SDM-PCR-Methoden bekannt, die auch für größere Plasmide entwickelt wurden (Nadin-Davis & Chang, 1998; Watkins et al., 1993). Schwierigkeiten bei der Anwendung der SDM-PCR unter Verwendung großer Plasmid-*Templates* (> 6 kbp) wurden insbesondere im Zusammenhang mit Primern, welche Sekundärstrukturen ausbilden, berichtet (Ling & Robinson, 1997; Wang & Wilkinson, 2000). Zwar wurden die für die SDM-PCR designten Primerpaare zuvor mittels Multiple Primer Analyzer dahingehend untersucht, ob sie mit sich selbst (*Self-Dimer* Bindung) und/oder untereinander (*Cross-Dimer* Bindung) hybridisieren (s. 7.2.7.4), jedoch konnten im Falle von pJOE8999-*yitU* und pJOE8999-*ywtE* und aufgrund der gewählten crRNA-Sequenzen schwache *Self-Dimer* Bindungen der zweiten Mutagenese-Primer (fw2) nicht vermieden werden. Wang und Wilkinson (2000) konnten mit einem Zusatz von 5-10% Dimethylsulfoxid (DMSO) zu den SDM-PCR-Ansätzen gute Erfolge erzielen. Insbesondere bei der Modifizierung größerer Plasmid-*Templates* (> 6 kbp) und/oder bei Verwendung von Primern, die starke Sekundärstrukturen ausbildeten, zeigte sich die Zugabe von DMSO als entscheidend für den Erfolg der PCR. Die SDM-Reaktionen zur Herstellung von pJOE8999-*yitU* und pJOE8999-*ywtE* wurden unter Zugabe von jeweils 0%, 4% und 8% DMSO (v/v im Gesamtansatz s. auch 7.2.7.4) wiederholt.

Wie in Abbildung 26B ersichtlich, wurden unter Verwendung des herkömmlichen PCR-Ansatzes (ohne DMSO-Zusatz) für pJOE8999-*yitU* und pJOE8999-*ywtE* wiederholt keine PCR-Produkte erhalten, während für die PCR-Ansätze mit 8% DMSO, DNA-Banden der erwarteten Fragmentgröße auf den Agarosegelen sichtbar waren. Die SDM-PCR-Ansätze zur Herstellung von pJOE8999-*yitU* zeigten bereits bei Zugabe von 4% DMSO eine schwache DNA-Bande, welche sich unter der Zugabe von 8% DMSO intensivierte. Zudem war eine unspezifische Bande in Höhe von ca. 1000 bp sichtbar, welche mit steigender DMSO-Konzentration in ihrer Intensität abnahm. Diese Ergebnisse bestätigen, dass ein Zusatz von 4-8% DMSO die SDM-Reaktion hinsichtlich der DNA-Ausbeute und Spezifität deutlich verbessern kann. Die Optimierung von PCR-Reaktionen durch die Zugabe von DMSO wurde vielfach in der Literatur beschrieben. Das Additiv soll u.a. die Strangtrennung der dsDNA erleichtern, indem es das Schmelzverhalten verändert (Frackman et al., 1998; Jensen et al., 2010). Auch eine Reduktion der Schmelztemperatur der Primer konnte festgestellt werden (Chester & Marshak, 1993).

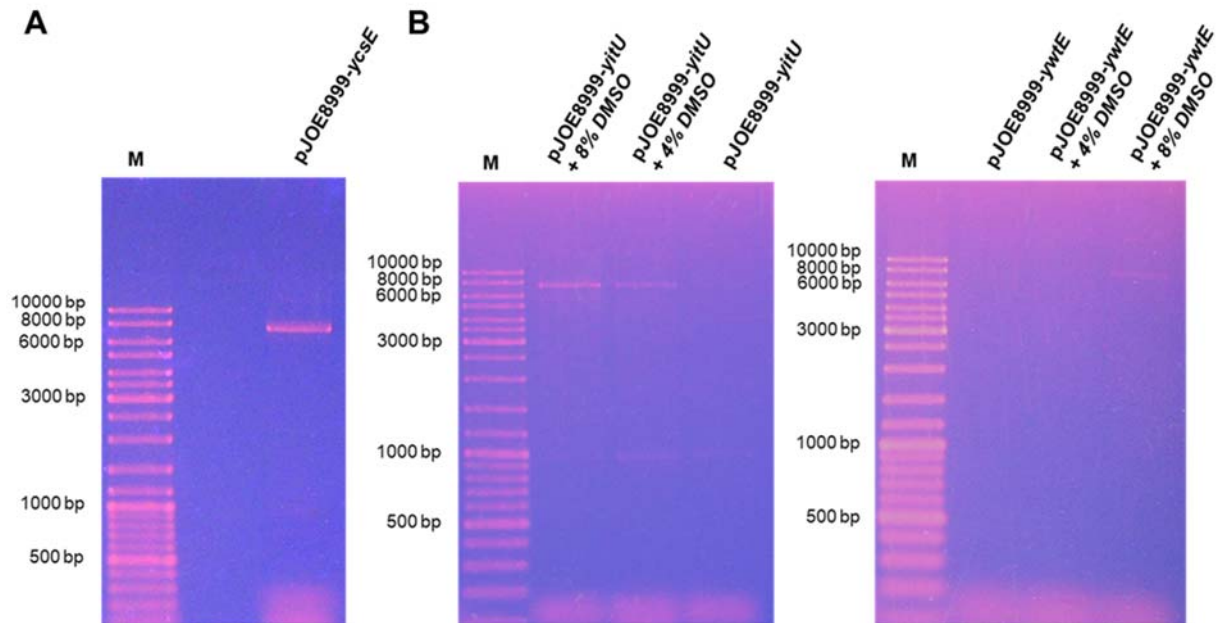


Abbildung 26: Elektropherogramme der mittels SDM-PCR generierten, linearen Plasmid-DNA von pJOE8999-ycsE (A) und der mittels modifizierter SDM-PCR erzeugten Plasmid-DNA von pJOE8999-yitU und pJOE8999-ywtE (B). DNA-Marker (M).

Die anschließende Klonierung und Vervielfältigung der Plasmide erfolgten wie unter 7.2.7.4 beschrieben. Mit Hilfe der SANGER-Sequenzierung (s. 7.2.10) und dem in Anhang 3, Tabelle 45 aufgeführten Sequenzierungs-Primer (T7r) konnten die Plasmid-Modifizierungen in den drei Plasmiden pJOE8999-ycsE, pJOE8999-yitU und pJOE8999-ywtE verifiziert werden.

4.2.3 Konstruktion der *Donor-Templates* für die *Knockouts* von YcsE, YitU und YwtE und Klonierung der *Donor-Templates* in die pJOE8999-Plasmide

Die Synthese der für die Rekombination bzw. Reparatur notwendigen *Donor-Templates* erfolgte wie bereits unter 4.1.3 für *E. coli* beschrieben unter Anwendung der OE-PCR. In Anhang 9, Abbildung 47 ist der Ablauf der unter 7.2.7.5 beschriebenen OE-PCR zur Herstellung der *Donor-Templates* schematisch dargestellt. Die zur Herstellung der *Donor-Templates* verwendeten Primerpaare sind unter 7.2.7.5, Tabelle 33 und die Sequenzen der jeweiligen Primer in Anhang 3, Tabelle 45 aufgeführt. Aufgrund der im Vergleich zu gramnegativen Bakterien deutlich geringeren zu erwartenden Transformationsraten (s. auch Abschnitt 4.2.4) sollten sich die *Donor-Templates* für die Genom-Editierung in *B. subtilis* unmittelbar auf den jeweiligen pJOE8999-Plasmiden befinden und nicht wie für die Genom-Editierung von *E. coli* vorgesehen, als dsDNA-*Templates* cotransformiert werden. Für die spätere Klonierung der *Donor-Templates* wurden mit Hilfe der in der OE-PCR verwendeten äußeren Primer (Lfw und Rr) Restriktionsschnittstellen an den äußeren Enden der Fragmente eingebracht.

Da es sich bei den von Sarge et al. (2015b) identifizierten HAD-Phosphatasen, um noch nicht umfangreich erforschte Proteine handelt, liegen bisher nur wenige Erkenntnisse darüber vor, welche Aminosäuren einen Effekt auf die enzymatische Aktivität dieser Enzyme aufweisen

könnten. Wie bereits unter 4.1.3 beschrieben, sollten die *Donor-Templates* daher so designt werden, dass durch die erzeugten Deletionen die distalen Bereiche der mutierten Gene ihr ursprüngliches Leseraster verlieren und somit möglichst große Bereiche der Aminosäurezusammensetzungen der Proteine von den eigentlichen Proteinsequenzen divergieren. Für die Konstruktion der *Donor-Templates* DTycsE, DTyitU und DTywtE wurden 115 bp der jeweiligen chromosomalen DNA-Regionen einschließlich ihrer vollständigen *Target*-Sequenzen und PAM-Regionen entfernt und durch eine Überlappungssequenz (15 bp) ersetzt. Die homologen Bereiche links und rechts der zu deletierenden genomischen DNA wiesen eine Länge von 379-521 bp auf. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die für die *Knockouts* ausgewählten Gene und das Design der entsprechenden *Donor-Templates*.

Tabelle 7: Überblick über die geplanten CRISPR-Cas9 induzierten Deletionen für die *Knockouts* der putativen Phosphatasen der Riboflavinbiosynthese in *B. subtilis* NIG1121 (NCBI-Zugangsnummer: CP010052.1) und Design der entsprechenden *Donor-Templates*.

Annotationsnummer	ORF	Enzym	<i>Donor-Template</i> Gesamtgröße [bp]	Homologe Arme [bp]*	Überlappungsbereich [bp]	Größe des deletierten Bereiches [bp]
AIY91687.1	QU35_02340 (<i>ycsE</i>)	Putative Phosphatase	848* (872)	L = 379 R = 454	15	115
AIY92396.1	QU35_06225 (<i>yitU</i>)	Putative Phosphatase	832* (856)	L = 391 R = 426	15	115
AIY94900.1	QU35_19430 (<i>ywtE</i>)	Putative Phosphatase	991* (1015)	L = 455 R = 521	15	115

* ohne Restriktionsschnittstellen; () mit Restriktionsschnittstellen

Die OE-PCR wurde zunächst wie für *E. coli* beschrieben mit chromosomaler DNA durchgeführt, welche durch die vorherige Suspension einer Kolonie in Tris-EDTA (TE)-Puffer und einem anschließenden Erhitzungsschritt freigesetzt wurde (s. 7.2.7.1). Da auf diese Weise wiederholt keine PCR-Produkte erhalten werden konnten, wurde davon ausgegangen, dass die *B. subtilis*-Zellen aufgrund ihrer wesentlich dickeren und komplexeren Zellwände (Hayhurst et al., 2008) nicht oder nur teilweise aufgeschlossen wurden. Daraufhin wurde der Zellaufschluss nach der Methode von Packeiser et al. (2013) und unter Verwendung des Y-PER® Yeast Protein Extraktionsmittels (Fa. Thermo Scientific) durchgeführt (s. 7.2.7.1). Durch diese Modifizierung konnten in allen OE-PCR-Reaktionen PCR-Produkte der erwarteten Fragmentlängen erhalten werden (s. Elektropherogramme der 1%igen Agarosegele in Abbildung 27 mit DTycsE = 872 bp, DTyitU = 856 bp und DTywtE = 1015 bp). In Anhang 5 sind die DNA-Sequenzen der mittels OE-PCR generierten *Donor-Templates* aufgeführt.

Die anschließende Klonierung der *Donor-Templates* in die jeweiligen pJOE8999-Plasmide erfolgte wie unter 7.2.5 und 7.2.6 beschrieben. Die aufgereinigten Produkte der Ligationsansätze wurden in elektrokompente *E. coli* XL1-Zellen transformiert (s. 7.1.2) und der Erfolg

der Klonierung mittels Kolonie-PCR (s. 7.2.7.1) und den in Anhang 3, Tabelle 45 aufgeführten *Screening*-Primern überprüft. Mit Hilfe der SANGER-Sequenzierung (s. 7.2.10) und dem in Anhang 3 aufgeführten Sequenzierungs-Primer (T7fw) konnte der korrekte Einbau der *Donor-Templates* in die Plasmide pJOE8999-*ycsE*-DT, pJOE8999-*yitU*-DT und pJOE8999-*ywtE*-DT verifiziert werden.

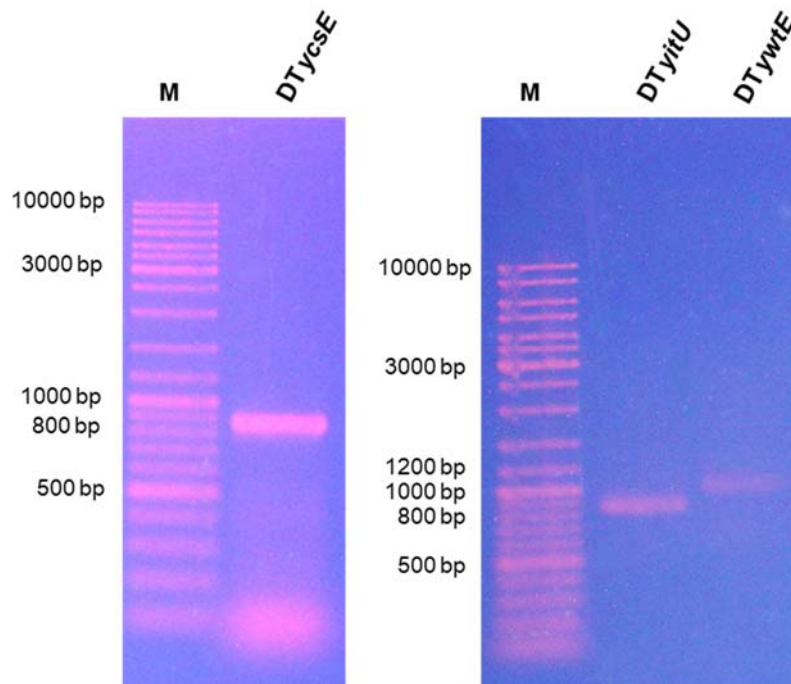


Abbildung 27: Elektropherogramme der mittels OE-PCR synthetisierten *Donor-Templates* DT_{ycsE}, DT_{yitU} und DT_{ywtE}. DNA-Marker (M).

4.2.4 Herstellung und Elektroporation kompetenter *B. subtilis*-Zellen unter optimierten Bedingungen

Die drei für die *Knockouts* von *ycsE*, *yitU* und *ywtE* konstruierten pJOE8999-Plasmide sollten im nächsten Schritt unter Anwendung einer möglichst effizienten Transformationsmethode in *B. subtilis* eingebracht werden.

B. subtilis weist aufgrund seiner dickeren Zellwand und der allgemein geringeren Elektroporationseffizienz grampositiver Bakterien eine im Vergleich zu *E. coli* wesentlich geringere Transformationsrate auf (Chassy et al., 1988). Im Allgemeinen liegt sie in der Größenordnung von etwa 10^2 - 10^4 Transformanten/ μ g Plasmid-DNA (Kusaoke et al., 1989; McDonald et al., 1995; Ohse et al., 1997). Die höchsten publizierten Transformationsraten für *B. subtilis* (ca. 10^5 - 10^7 Transformanten/ μ g Plasmid-DNA) wurden für Methoden erzielt, welche entweder die natürliche Kompetenz von *B. subtilis* zur DNA-Aufnahme nutzen oder mit Hilfe von Elektroporationsmethoden und unter Anwendung hoher elektrischer Feldstärken (Gang-Ping Xue et al., 1999; Meddeb-Mouelhi et al., 2012; Rahmer et al., 2015; You et al., 2012; Zhang et al., 2015). Da die natürliche Kompetenz der einzelnen Stämme stark variieren kann und eine effiziente DNA-

Aufnahme teilweise nur unter Hochregulierung bestimmter Kompetenz-Faktoren möglich ist, sollte in dieser Arbeit die Elektroporation genutzt werden, um die Plasmid-DNA in *B. subtilis* einzubringen.

Um eine effiziente DNA-Aufnahme im Rahmen einer Transformation zu gewährleisten, empfiehlt sich zumeist eine Ernte der Zellen innerhalb der mittleren bis späten exponentiellen Wachstumsphase, da diese ein maximales Wachstum der Zellen sowie konstante Zellteilungs-raten ermöglicht (Dower et al., 1988). Daher wurde zunächst wie unter 7.1.1 beschrieben eine Wachstumskurve für *B. subtilis* NIG1121 erstellt, um die verschiedenen Wachstumsphasen des Stammes unter den festgelegten Wachstumsbedingungen zu ermitteln. Die mittlere bis späte exponentielle Wachstumsphase von *B. subtilis* NIG1121 lag zwischen einem OD600-Wert von 0,5 – 1 (s. Wachstumskurve in Anhang 11, Abbildung 49). Davon ausgehend wurde festgelegt, dass die Zellen für die elektrokompetente Herstellung bei einem OD600-Wert von max. 0,8 – 0,9 geerntet werden sollen, da zu einem späteren Zeitpunkt bei dem Endosporenbildner bereits die Sporulation einsetzen könnte.

Die anschließende Herstellung der elektrokompetenten *B. subtilis*-Zellen erfolgte zunächst unter Anwendung des für *E. coli* verwendeten Protokolls (s. 7.1.2) um zu prüfen, ob dieses evtl. auch für die Herstellung der elektrokompetenten *B. subtilis*-Zellen geeignet ist. Vielfach wurde gezeigt, dass hohe elektrische Feldstärken (in der Regel 20–25 kV/cm) in Kombination mit Osmoprotektanten und/oder Zellwand-schwächenden Substanzen die Transformationseffizienz in *B. subtilis* deutlich erhöhen können (Gang-Ping Xue et al., 1999; Meddeb-Mouelhi et al., 2012; Zhang et al., 2015). Daher wurden für die Elektroporation sowohl elektrische Spannungen von 17 kV/cm (äquivalent zu *E. coli*) als auch 20 kV/cm getestet. Die ermittelten Transformationsraten (s. Anhang 12.1, Tabelle 48) lagen mit $2,4 \times 10^2$ cfu/ μ g (17 kV/cm) und $1,0 \times 10^2$ cfu/ μ g (20 kV/cm) in beiden Fällen in einem erwartungsgemäß niedrigen Bereich. Eine alleinige Erhöhung der elektrischen Feldstärke schien nicht ausreichend, um die Elektroporationseffizienz in *B. subtilis* zu erhöhen und führte womöglich zu einer höheren Zellsterberate. Im nächsten Schritt sollten daher verschiedene osmoprotektiv wirkende Medienzusätze eingesetzt werden, um die Zellen vor einem möglichen osmotischen Schock zu schützen. Entsprechend des Protokolls von Meddeb-Mouelhi et al. (2012) wurde das Anzuchtmedium durch LB-Sorbitol-Medium (LBS-Medium) ersetzt und dem ursprünglichen Elektroporationsmedium (10%ige Glycerin-Lösung) wurden die osmoprotektiven Substanzen Glycin-Betain, Mannitol und Sorbitol zugesetzt. Das *Recovery*-Medium wurde entsprechend Meddeb-Mouelhi et al. (2012) und Gang-Ping Xue et al. (1999) durch ein nährstoffreicheres LB-Medium ersetzt, welches ebenfalls Mannitol und Sorbitol enthielt (Medien und Medienzusätze s. 6.9, Tabelle 15). Unter Anwendung des modifizierten Protokolls (s. Anhang 12.2 in Tabelle 49) konnte die Transformationsrate um den Faktor 4-10 erhöht werden (mittlere Transformationsrate $9,7 \times 10^2$ cfu/ μ g). In Anlehnung an die Erkenntnisse von McDonald et al. (1995) und Zhang et al.

(2011) wurde die Methode durch eine Zugabe von Glycin und Tween 80 zum Wachstumsmedium weiter optimiert (s. 7.1.3).

Die Kombination des Zellwand-schwächenden Glycins, mit dem die Fluidität der Zellmembran erhöhenden Detergens Tween 80, führte zu einer maximalen Transformationseffizienz von $3,15 \times 10^4$ cfu/ μ g. Der Einfluss eines Racemats aus *D*- und *L*-Threonin wurde ebenfalls untersucht. Entgegen der Erkenntnisse von Zhang et al. (2015) konnten unter Verwendung der Zellwand-schwächenden Substanz jedoch keine Transformanten erhalten werden (s. Ergebnisse in Anhang 13.1).

Die unter 7.1.3 beschriebene, optimierte Elektroporationsmethode wurde anschließend genutzt, um die pJOE8999-Plasmide im Rahmen der Genom Editierung in die *B. subtilis*-Zellen zu transformieren.

4.2.5 CRISPR-Cas9 induzierte *Knockouts* in *B. subtilis* und Selektion der Mutanten

In diesem Abschnitt sollten die zuvor hergestellten elektrokompententen *B. subtilis*-Zellen verwendet werden, um die unter 4.2.2 und 4.2.3 konstruierten pJOE8999-Plasmide in die Zellen zu transformieren und die CRISPR-Cas9 vermittelte genetische Modifizierung der Zellen zu bewirken. Wie eingangs dargestellt, sollten neben der Herstellung der Einzeldelentionsmutanten ($\Delta ycsE$, $\Delta yitU$ und $\Delta ywtE$) auch alle möglichen kombinatorischen *Knockouts* der drei Gene erfolgen, um die gewünschten Multideletionsmutanten zu erhalten (s. Abschnitt 3.2). Ein Vorteil bei der Anwendung der CRISPR-Cas9 Methode in *B. subtilis* ist sein im Gegensatz zu *E. coli* stärker ausgeprägtes, natürliches Rekombinationsvermögen. Für die Rekombination des *Donor-Templates* mit der chromosomalen DNA kann in *B. subtilis* daher die zelleigene Rekombinationsfähigkeit ausgenutzt werden, wodurch das Einbringen von Rekombinationssystemen aus Phagen entfällt.

4.2.5.1 Einzeldelentionsmutanten

Die Genom Editierung von *B. subtilis* zum *Knockout* der Gene *ycsE*, *yitU* und *ywtE* erfolgte unter den in Abschnitt 7.2.9.2 beschriebenen Bedingungen. Bei der Genom Editierung in *E. coli* konnten mit Hilfe von Kontroll-Ansätzen (enthielten alle CRISPR-Cas9-Komponenten, jedoch keine *Donor-Template*-DNA) und durch die Bestimmung der Zellüberlebensraten, Rückschlüsse auf die Effizienz des jeweiligen CRISPR-Cas9 induzierten *Targetings* gezogen werden. Daher wurde auch bei diesen Versuchen, parallel zu jedem CRISPR-Cas9-Event, jeweils ein Aliquot kompetenter *B. subtilis*-Zellen mit einem entsprechenden Kontroll-Plasmid (pJOE8999-*ycsE*, pJOE8999-*yitU* bzw. pJOE8999-*ywtE*) transformiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 3 h bei 30 °C in *Recovery*-Medium inkubiert. Die Expression des *cas9*-Gens, welche von dem induzierbaren Promotor P_{manP} gesteuert wird, erfolgte durch die anschließende Kultivierung der Zellen auf Mannose-haltigen Agarplatten. Während für die

CRISPR-Cas9-Ansätze Zellwachstumsraten von $1,1$ bis $3,1 \times 10^2$ cfu/ μ g erhalten wurden, zeigten die Kontroll-Ansätze keine Kolonien auf den Agarplatten.

Dies war zunächst überraschend, da bei der Genom Editierung von *E. coli* selbst bei den erfolgreichen CRISPR-Cas9-Events lediglich um den Faktor 1,5 – 2 reduzierte Zellüberlebensraten festgestellt wurden.

Es muss jedoch beachtet werden, dass die Transformationsraten für *B. subtilis* im Allgemeinen wesentlich geringer sind als für *E. coli* und auch bei den CRISPR-Cas9-Ansätzen lediglich eine geringe Anzahl an überlebenden *B. subtilis*-Kolonien (ca. 10-22) erhalten wurde. Die Tatsache, dass auf den Agarplatten der drei Kontrollansätze keine Kolonien erhalten wurden, deutete des Weiteren auf eine erfolgreiche Gegenselektion der Wildtyp-Zellen und somit auf crRNAs mit einer hohen Aktivität (Effizienz) hin.

Im Anschluss an die CRISPR-Cas9-Events wurden einige der Kolonien einem Plasmid-*Curing* unterzogen und anschließend auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Kanamycin getestet (s. 7.2.9.2). Die Plasmid-freien Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (s. 7.2.7.1) und mit Hilfe der jeweiligen flankierenden Primer der *Donor-Templates* (EmLfw und EmRr, UmLfw und UmRr bzw. WmLfw und WmRr, Primer-Sequenzen s. Anhang 3) auf die zu erwartenden Mutationen geprüft. Etwa 71-75% der getesteten Kolonien wiesen ein Fragment auf, welches der Größe des für den jeweiligen *Knockout* designten *Donor-Templates* entsprach, wodurch auf eine erfolgreiche Rekombination dieser Zellen geschlossen werden konnte (s. Elektropherogramme in Anhang 7, Abbildung 44).

Im Gegensatz zur CRISPR-Cas9-Anwendung in *E. coli*, bei der die *Donor-Templates* in Form linearer dsDNA vorlagen, befand sich die *Donor-Template*-DNA für die Genom Editierung in *B. subtilis* unmittelbar auf den pJOE8999-Plasmiden. Bedingt durch die Zirkularität der Plasmid-DNA kann es in Folge eines einzigen homologen Rekombinationsereignisses (eng. *Single-Crossingover*) dazu kommen, dass das gesamte Plasmid in das Chromosom integriert wird (Heap et al., 2012). Da die Zellen in diesem Falle jedoch weiterhin die zur jeweiligen crRNA komplementäre *Target*-Sequenz aufweisen, sollten diese – zusammen mit den unveränderten Wildtyp-Zellen – von der Cas9-Nuklease eliminiert werden (s. auch Abschnitt 2.2.4). Zudem deuteten der Verlust der Kanamycin-Resistenz der Zellen nach dem Plasmid-*Curing* bzw. die Ergebnisse der Kolonie-PCR darauf hin, dass es sich bei den Zellen um die "reinen" Mutanten ohne integrierte Plasmid-DNA handelte. Zur Absicherung der initialen Ergebnisse wurde jeweils eine der positiv getesteten Kolonien erneut in einer Kolonie-PCR analysiert. Diesmal wurden die flankierenden Primer der *Donor-Templates* (s. oben) durch Primerpaare ersetzt, welche an komplementäre Bereiche binden, die 70-120 bp *upstream* bzw. *downstream* der homologen Bereiche der *Donor-Templates* liegen und somit ausschließlich die chromosomale DNA amplifizieren (Primerpaare: ycsE-mutfw + ycsEr; ywtE-mutfw + ywtEr und yitU-mutfw +

yitU; Primersequenzen s. Anhang 3). Alle Kolonien wiesen ein entsprechend der geplanten Mutationen (vgl. Tabelle 7) um 100-bp verkürztes Fragment gegenüber den Wildtyp-Zellen auf (s. Elektropherogramm in Abbildung 28).

Die gewünschten genetischen Modifizierungen konnten zudem mit Hilfe der SANGER-Sequenzierung (s. 7.2.10) und den jeweiligen Vorwärts-Primern der Kolonie-PCRs (Primersequenzen s. Anhang 3). verifiziert werden.

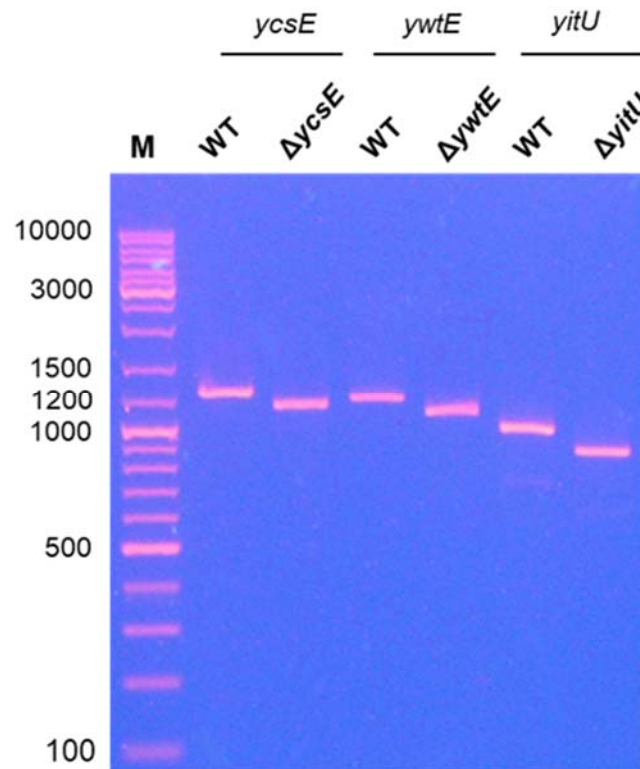


Abbildung 28: Nachweis der CRISPR-Cas9 induzierten Knockouts von *ycsE*, *yitU* und *ywtE* in *B. subtilis*. Das Elektropherogramm zeigt die jeweiligen PCR-Fragmente der gereinigten genomischen DNA des Wildtyps (WT) und der *Knockout*-Mutanten ($\Delta ycsE$, $\Delta ywtE$ und $\Delta yitU$). Die DNA-Amplifikation der erfolgreich modifizierten Stämme resultierte in PCR-Fragmenten, welche 100 bp kürzer waren als die des Wildtyps (WT). DNA-Marker (M).

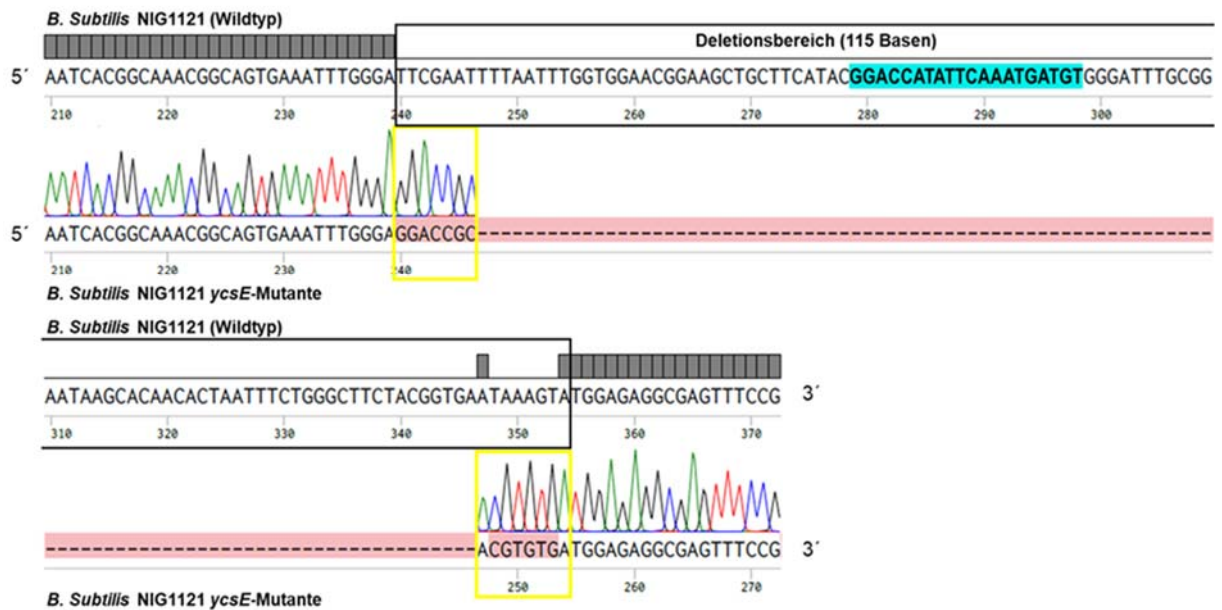
Die Elektropherogramme der SANGER-Sequenzierung und die resultierenden DNA-Sequenzen wurden mittels der Benchling Software abgebildet und unter Anwendung der *Alignment*-Funktion wurden die Sequenzabschnitte mit den jeweiligen Gen-Sequenzen des Wildtyp-Stammes verglichen (s. Abbildungen 29A, 30A und 31A). Alle Elektropherogramme zeigten eine, in Übereinstimmung mit dem Design des jeweiligen *Donor-Templates* modifizierte DNA-Sequenz (vgl. Anhang 5, Tabelle 46). Bei allen Einzeldelentionsmutanten ($\Delta ycsE$, $\Delta yitU$ und $\Delta ywtE$) wurden jeweils 115 Basen der ursprünglichen Sequenz deletiert und durch die 15-bp Sequenz der Überlappungsbereiche der *Donor-Templates* ersetzt. Die Deletionsbereiche umfassten die vollständigen *Target*-Sequenzen inkl. ihrer PAM-Regionen.

Die aus den Genmutationen resultierenden Veränderungen der Aminosäuresequenzen der Proteine sind in den Abbildungen 29B bis 31B dargestellt. In Folge der Deletionen bzw. In-

sertionen mehrerer Basen in den Bereichen der ursprünglichen *Target*-Regionen kam es in allen Aminosäuresequenzen zu den gewünschten *Frameshifts* sowie zur Entstehung von mehreren Stopcodonen. Die Mutationen in den Gensequenzen führten zu großen Verlusten der Aminosäuresequenzidentitäten von YcsE, YitU und YwtE (ca. 32-43% verbleibende Sequenzidentitäten). Die größten Peptide mit einer bestehenden Sequenzidentität befanden sich am jeweiligen N-Terminus der Proteine und umfassten 79 Aminosäuren (YcsE), 66 Aminosäuren (YitU) bzw. 65 Aminosäuren (YwtE). An den Positionen 122 (YcsE), 79 (YitU) bzw. 69 (YwtE) der Aminosäuresequenzen sollte es in Folge eines ersten Stopcodons zu einem Abbruch der Proteinbiosynthese kommen.

Wie bereits unter 4.1.3 beschrieben, sollten diese mehrstufigen Mutationen zum einen das Auftreten von „einfachen“ Rückmutationen und/oder kompensatorischen Mutationen verhindern und zum anderen sicherstellen, dass keine größeren Proteinfragmente mit einer möglichen verbleibenden enzymatischen Aktivität aus den jeweiligen mutierten Genen synthetisiert werden können. Wie eingangs beschrieben, handelt es sich bei den drei HAD-Phosphatasen YcsE, YitU und YwtE zudem um noch nicht umfangreich erforschte Proteine, weshalb auch nur wenige Erkenntnisse über eventuell vorhandene, funktionell bedeutsame Aminosäuren vorlagen. Da alle Mitglieder der HAD-Superfamilie trotz ihrer allgemein geringen Sequenzhomologie über vier hoch konservierte Sequenzmotive verfügen (Burroughs et al., 2006), liegt jedoch die Vermutung nahe, dass diese Bereiche für die katalytische Reaktion von besonderer Bedeutung sind. Das Motiv I der HAD-Superfamilie (DxDx(T/V)(L/V), x = variable Aminosäure) befindet sich am N-Terminus der Proteine und weist ebenso wie Motiv IV (DD, GDxxxD oder GDxxxxD, x = variable Aminosäure), welches am C-Terminus lokalisiert ist, mehrere hoch konservierte Aminosäuren auf (Aravind et al., 1998; Burroughs et al., 2006) (s. Abbildungen 29B bis 31B). Die Motive II und III, welche sich *downstream* zu Motiv I befinden, weisen lediglich eine hoch konservierte Aminosäure auf, weshalb eine exakte Zuordnung hier nicht möglich ist. Während Motiv II und III zur Stabilität der Reaktionszwischenprodukte der Hydrolyse beitragen, sind die hochkonservierten Aspartate (D) in den Motiven I und IV für die Koordination des für die Katalyse essenziellen Mg²⁺-Cofaktors im aktiven Zentrum verantwortlich (Burroughs et al., 2006). Das Motiv IV wurde in den Zielgenen aller Mutanten zerstört. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Lokalisation von Motiv III am C-Terminus der Proteine (Burroughs et al., 2006) und der Positionen der ersten Stopcodone, kann davon ausgegangen werden, dass dieses ebenfalls keine Funktion mehr ausüben kann.

A



B

	10	Motiv I	20	30	40	50	60	
Wildtyp	MSVQREDVDIKLIAIDMDGTLINDEQLISDENRKAIREAEDKGVVWISTGRTLMTCREL	60						
<i>ycsE</i> -Mutante	MSVQREDVDIKLIAIDMDGTLINDEQLISDENRKAIREAEDKGVVWISTGRTLMTCREL	60						
	70	80	90	100	110	120		
Wildtyp	AESLKLSSFLITANGSEIWDNFNLVERKLLHTDHIQMMWDLRNKHNTHFASTVNKVMR	120						
<i>ycsE</i> -Mutante	AESLKLSSFLITANGSEI EDRTCD GEASFRKTLR--IMNGSNSALTSRMTIS-ETKCLR	117						
	130	140	150	160	170	180		
Wildtyp	GEFPENITDHEWLKFGFDIEDDIR--NEVLEELRKNKELEITNSSPTNIEVNALGINK	177						
<i>ycsE</i> -Mutante	S EKT-KSSKSQIQVRQTLKSTRLASTKLOPLRLRNKNSALQWRM R WRATALMTLR S SK	173						
	190	200	210	Motiv IV	220	230		
Wildtyp	AAAL-----AKVTEKLGFTMENVMAMGDSLNDIAMIKEAGLGVAMGNAQDIVKETADYI	231						
<i>ycsE</i> -Mutante	KRVLASQWAMRKTS R KKRLIISRI-----QILRMVSLKRFAIGY-----	212						
	240							
Wildtyp	TDTNIEDGVAKAIRHWL*	249						
<i>ycsE</i> -Mutante	-----	212						

Abbildung 29: Alignments der *ycsE*-Gensequenzen (A) sowie der Aminosäuresequenzen (B) des *B. subtilis* NIG1121-Wildtyp-Stammes (Annotationsnummer: AIY91687.1) und der *ycsE*-Mutante. Die Target-Sequenz (hier: Darstellung des 5'-3'-Strangs) von *ycsE* ist in der Gensequenz türkis hinterlegt. Die in der *ycsE*-Mutante deletierten 115 Basen (Abbildung A) sind in der ursprünglichen Sequenz durch einen schwarzen Rahmen hervorgehoben und im Elektropherogramm der *ycsE*-Mutante durch die rot hinterlegte gestrichelte Linie bzw. die rot hinterlegten Basen gekennzeichnet. Die roten Rahmen kennzeichnen die in der *ycsE*-Mutante durch die Leserasterverschiebung entstandenen Stopcodone. Die in Folge der Rekombination/Reparatur mit dem Donor-Template eingebrachte 15-bp Insertion des Überlappungsbereiches wurde jeweils gelb hervorgehoben (angefertigt mit der Benchling Software (A) und dem Alignmenttool Clustal Omega (B)).

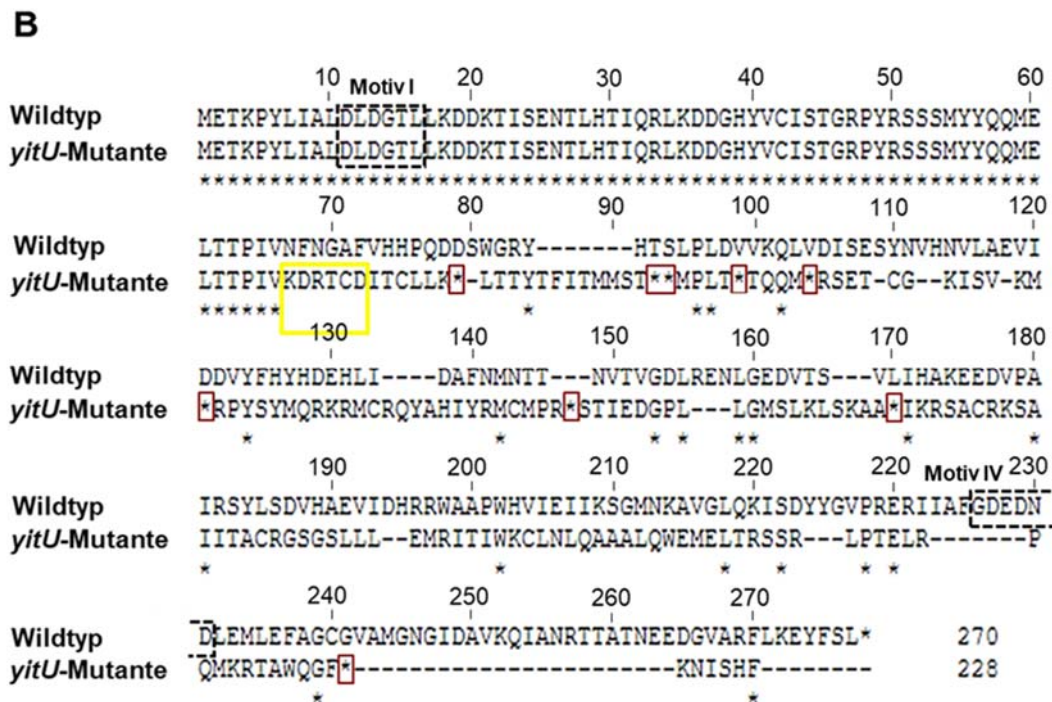
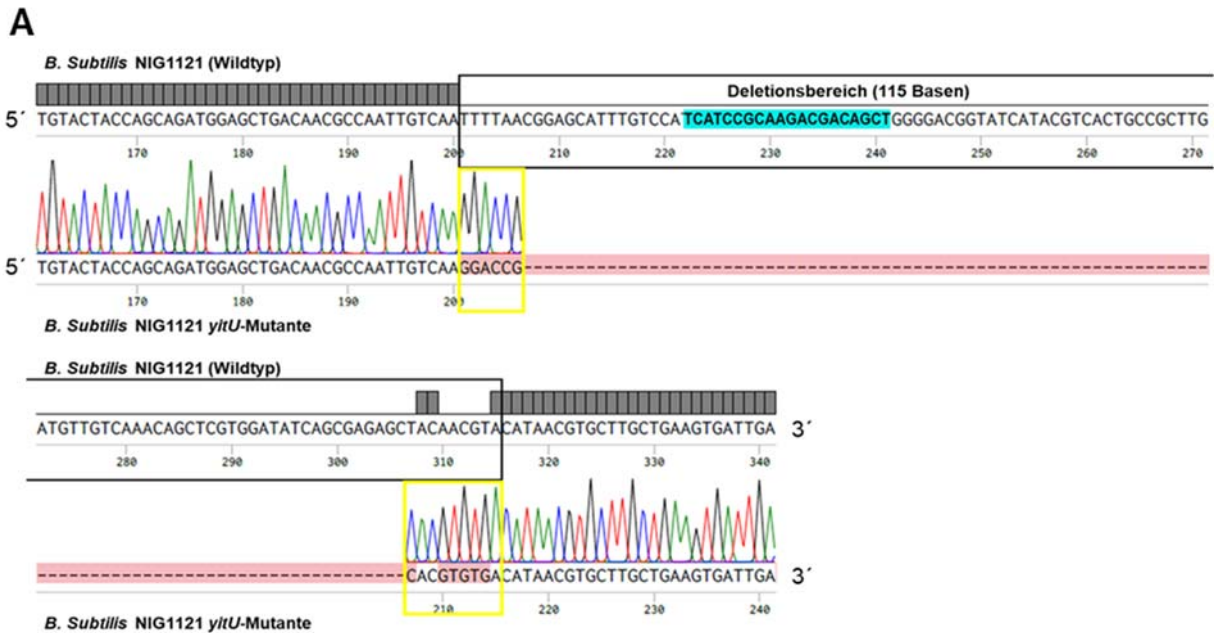
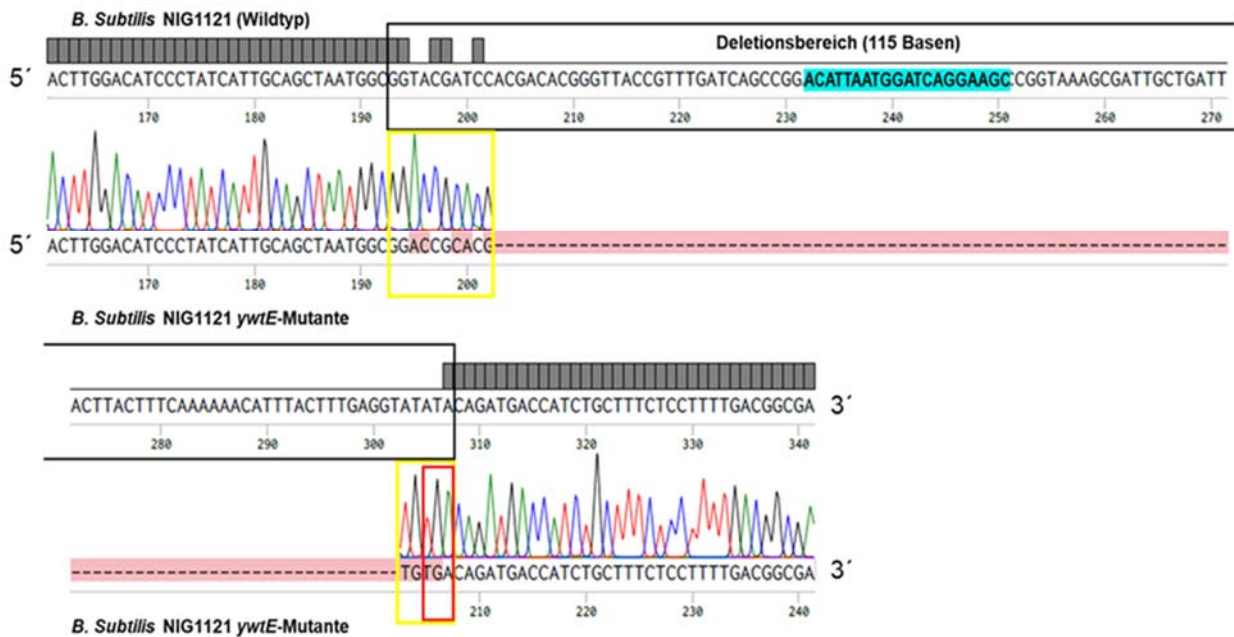


Abbildung 30: Alignments der *yitU*-Gensequenzen (A) sowie der Aminosäuresequenzen (B) des *B. subtilis* NIG1121-Wildtyp-Stammes (Annotationsnummer: AIY92396.1) und der *yitU*-Mutante. Die *Target*-Sequenz (hier: Darstellung des 5'-3'-Strangs) von *yitU* ist in der Gensequenz türkis hinterlegt. Die in der *yitU*-Mutante deletierten 115 Basen (Abbildung A) sind in der ursprünglichen Sequenz durch einen schwarzen Rahmen hervorgehoben und im Elektropherogramm der *yitU*-Mutante durch die rot hinterlegte gestrichelte Linie bzw. die rot hinterlegten Basen gekennzeichnet. Die roten Rahmen kennzeichnen die in der *yitU*-Mutante durch die Leserasterverschiebung entstandenen Stopcodone. Die in Folge der Rekombination/Reparatur mit dem *Donor-Template* eingebrachte 15-bp Insertion des Überlappungsbereiches wurde jeweils gelb hervorgehoben (angefertigt mit der Benchling Software (A) und dem Alignmenttool Clustal Omega (B)).

A



B

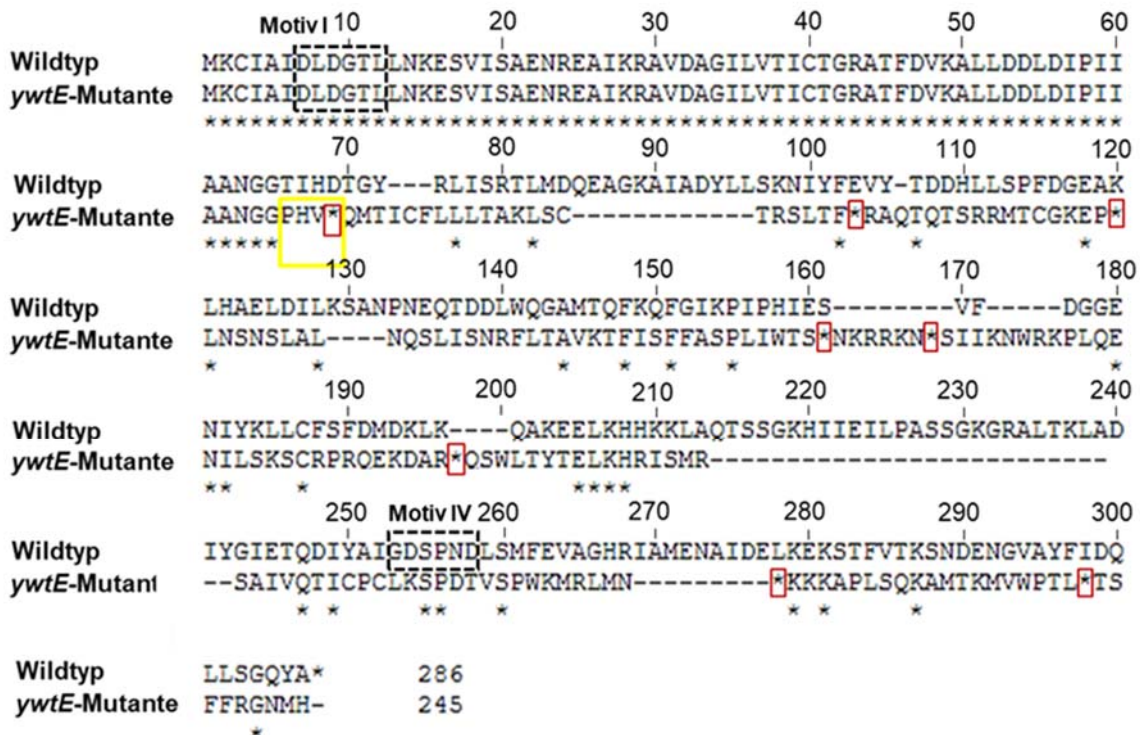


Abbildung 31: Alignments der *ywtE*-Gensequenzen (A) sowie der Aminosäuresequenzen (B) des *B. subtilis* NIG1121-Wildtyp-Stammes (Annotationsnummer: AIY94900.1) und der *ywtE*-Mutante. Die *Target*-Sequenz (hier: Darstellung des 5'-3'-Strangs) von *ywtE* ist in der Gensequenz türkis hinterlegt. Die in der *ywtE*-Mutante deletierten 115 Basen (Abbildung A) sind in der ursprünglichen Sequenz durch einen schwarzen Rahmen hervorgehoben und im Elektropherogramm der *ywtE*-Mutante durch die rot hinterlegte gestrichelte Linie bzw. die rot hinterlegten Basen gekennzeichnet. Die roten Rahmen kennzeichnen in beiden Abbildungen die Positionen der in der *ywtE*-Mutante eingeführten bzw. durch die Leserasterverschiebung entstandenen Stopcodone. Die in Folge der Rekombination/Reparatur mit dem *Donor-Template* eingebrachte 15-bp Insertion des Überlappungsbereiches wurde jeweils gelb hervorgehoben (angefertigt mit der Benchling Software (A) und dem Alignmenttool Clustal Omega (B)).

4.2.5.2 Multideletionsmutanten

Im nächsten Schritt sollten aus den drei Einzeldelentionsmutanten die möglichen Kombinationen der Doppeldelentionsmutanten ($\Delta ycsE/\Delta ywtE$, $\Delta ycsE/\Delta yitU$ und $\Delta ywtE/\Delta yitU$) generiert werden. Abschließend sollte eine der drei Doppeldelentionsmutanten verwendet werden, um die Tripledeletionsmutante ($\Delta ycsE/\Delta ywtE/\Delta yitU$) zu generieren. In Abbildung 32 ist das Ablaufschema zur kombinatorischen Erzeugung der Multideletionsmutanten dargestellt.

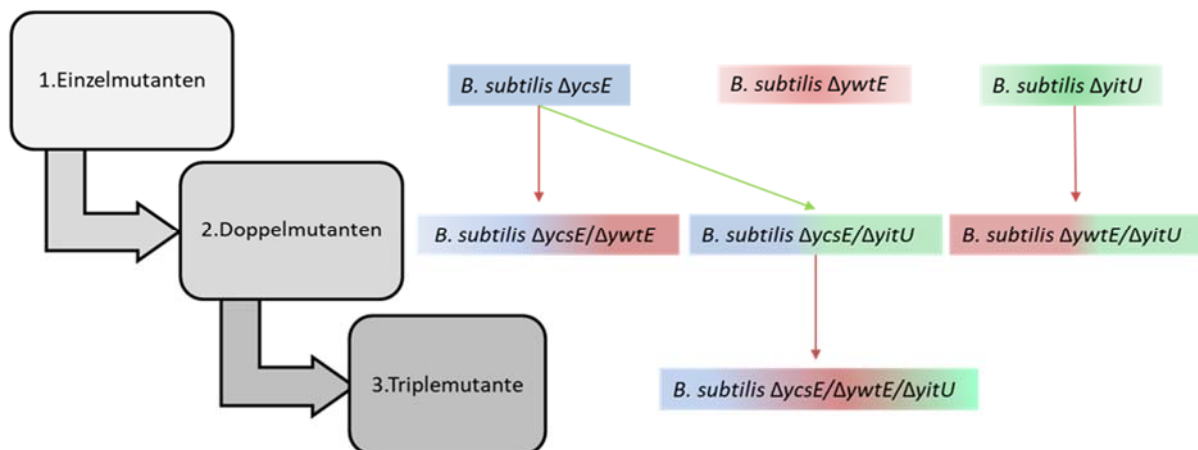


Abbildung 32: Ablaufschema zur kombinatorischen Erzeugung der Multideletionsmutanten. Die Doppeldelentionsmutanten $\Delta ycsE/\Delta ywtE$ und $\Delta ycsE/\Delta yitU$ wurden durch Mutationen in den Genen *ywtE* bzw. *yitU* in der Einzeldelentionsmutante $\Delta ycsE$ erhalten. Die Doppeldelentionsmutante $\Delta ywtE/\Delta yitU$ wurde aus der $\Delta yitU$ -Mutante gewonnen. Durch eine *ywtE*-Mutation in der Doppeldelentionsmutante $\Delta ycsE/\Delta yitU$ wurde anschließend die Tripledeletionsmutante erhalten.

Die CRISPR-Cas9 induzierten *Knockouts* zur Generierung der oben genannten Multideletionsmutanten erfolgten analog zu den in den Abschnitten 4.2.5.1 und 7.2.9.2 beschriebenen Bedingungen. Nach dem erfolgten Plasmid-*Curing* wurden die Plasmid-freien Kolonien zunächst in der Kolonie-PCR (s. 7.2.7.1) und mit Hilfe der flankierenden Primer der *Donor*-Templates auf die zu erwartenden Mutationen geprüft (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde jeweils eine der positiv getesteten Kolonien erneut in der Kolonie-PCR untersucht, diesmal mit Hilfe der Primerpaare welche 70-120 bp *upstream* bzw. *downstream* der homologen Bereiche der *Donor*-Templates liegen und somit keine komplementären Bereiche zur Plasmid-DNA aufweisen (s. 4.2.5.1). Alle Doppeldelentionsmutanten ($\Delta ycsE/\Delta ywtE$, $\Delta ycsE/\Delta yitU$ und $\Delta ywtE/\Delta yitU$) sowie die Tripledeletionsmutante wiesen entsprechend der geplanten Mutationen um 100-bp verkürzte PCR-Fragmente gegenüber den Wildtyp-Zellen auf (s. Elektropherogramme in Abbildung 33). Mit Hilfe der SANGER-Sequenzierung (s. 7.2.10) und den jeweiligen Vorwärts-Primern der Kolonie-PCRs (Primersequenzen s. Anhang 3) wurden die neu eingebrachten Mutationen verifiziert.

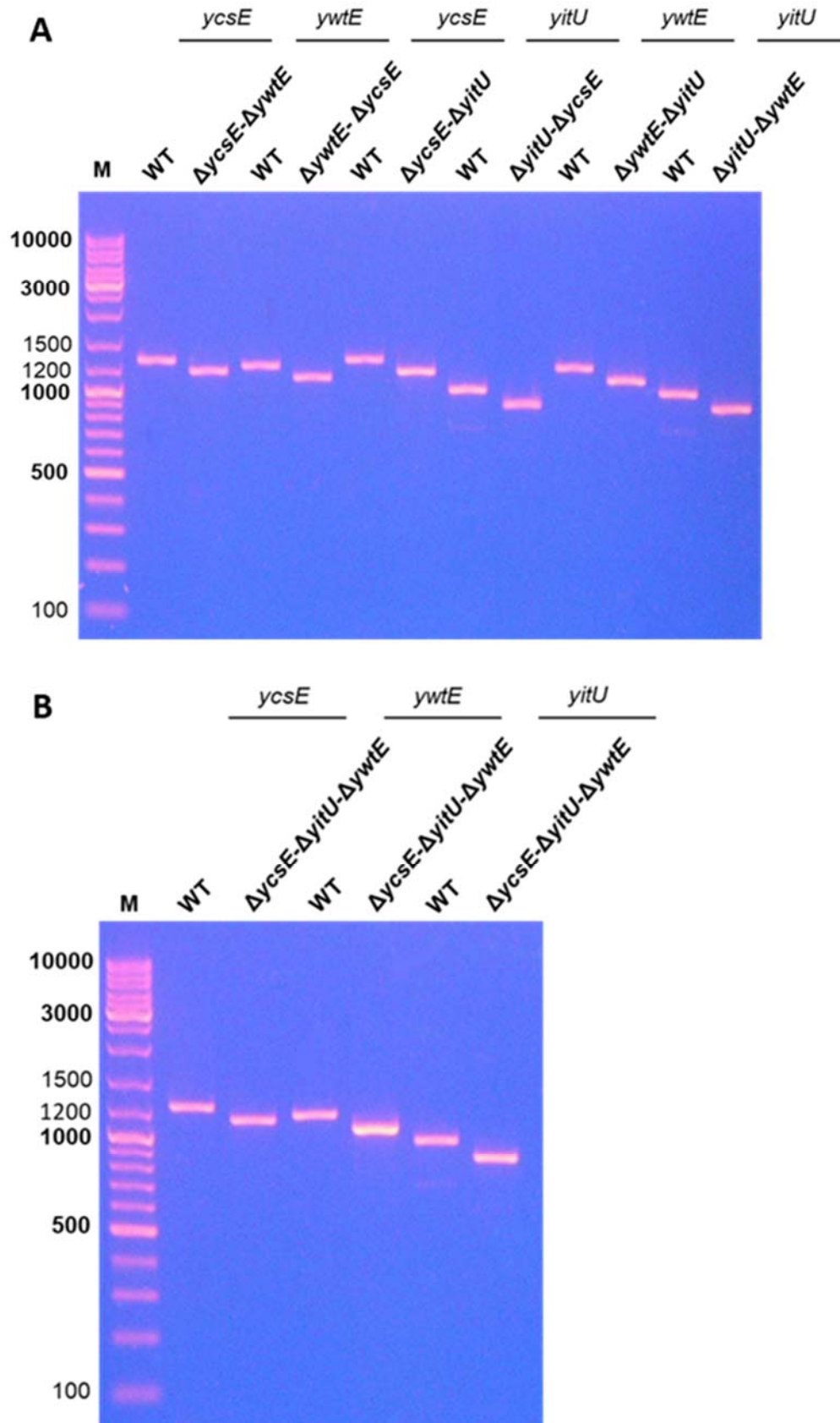


Abbildung 33: Nachweis der CRISPR-Cas9 induzierten *Knockouts* in *B. subtilis* zur Herstellung der Doppeldeletionsmutanten $\Delta ycsE\text{-}\Delta ywtE$, $\Delta ycsE\text{-}\Delta yitU$ und $\Delta ywtE\text{-}\Delta yitU$ (A) sowie der Tripledeletionsmutante $\Delta ycsE\text{-}\Delta ywtE\text{-}\Delta yitU$ (B). Die Elektropherogramme zeigen die jeweiligen PCR-Fragmente der gereinigten genomischen DNA des Wildtyps (WT) und der *Knockout*-Mutanten. Die DNA-Amplifikation der erfolgreich modifizierten Stämme resultierte in PCR-Fragmenten, welche 100 bp kürzer waren als die des Wildtyps (WT). DNA-Marker (M).

4.2.6 Vergleich der Erfolgsquoten der angewandten CRISPR-Cas9 Methoden in *B. subtilis* und in *E. coli*

Während viele wissenschaftliche Studien im Rahmen der Methodenentwicklung die Mutationseffizienz (Anzahl der mutierten Kolonien/Gesamtzahl der analysierten Kolonien) des neu etablierten CRISPR-Cas Systems bestimmen, fehlen häufig Angaben zur Erfolgsquote (Anzahl der mutierten Gen-Loci/Gesamtzahl der Zielloci) der Methoden. Die wenigen Studien, welche Angaben zur Erfolgsquote der Methoden machen, wurden zudem fast ausschließlich im Modellorganismus *E. coli* durchgeführt (s. auch 4.1.6), weshalb wichtige Vergleichsdaten zu anderen Stämmen, wie bspw. *B. subtilis* derzeit noch fehlen.

Während sich die in dieser Arbeit für *E. coli* und *B. subtilis* ermittelten Mutationseffizienzen nur geringfügig voneinander unterschieden (*E. coli*: 60-70%; *B. subtilis*: 71-75%), wurden in Bezug auf die Resultate der CRISPR-Cas9-basierten Genom Editierung größere Unterschiede festgestellt: Wie bereits unter 4.1.6 diskutiert, konnten bei der Genom Editierung von *E. coli* in 50% (drei von sechs) der durchgeführten CRISPR-Cas9-Events keine Mutanten selektiert werden. Auf der Grundlage von eigenen Beobachtungen und Kontrollversuchen sowie einer umfangreichen Literaturrecherche, wurde geschlussfolgert, dass nicht jede crRNA-Sequenz gleichermaßen aktiv ist und nur die besonders aktiven crRNAs in der Lage sind gleichzeitig alle Genomäquivalente zu schneiden und somit die Anzahl an Wildtyp-Zellen signifikant zu reduzieren. Überraschenderweise ermöglichten alle drei crRNA-Sequenzen, welche für die Genom Editierung in *B. subtilis* ausgewählt wurden, eine effiziente Gegenselektion der Wildtyp-Zellen und es konnten nach der Durchführung eines jeden CRISPR-Cas9-Events mehrere Mutanten mittels Kolonie-PCR bestätigt werden.

Die für die Genom Editierung von *B. subtilis* verwendeten crRNA-Sequenzen wiesen alle einen moderaten GC-Gehalt von 35-55% auf. Durch die nachträgliche Berechnung der MFEs der crRNA-Sequenzen mittels des Vienna RNA-Servers (Gruber et al., 2008) konnten zudem keine negativen Faltungsenergien und somit keine höheren Wahrscheinlichkeiten für die Ausbildung von Sekundärstrukturen festgestellt werden. Zwei der crRNA-Sequenzen (*ycsE* und *yitU*) wiesen an Position 20 die möglicherweise in Prokaryoten präferierte Thymin-Base auf, während die crRNA für den *Knockout* von *ywtE* die negativ assoziierte Guanin-Base zeigte (s. Tabelle 8). Bereits bei der Auswahl der crRNA-Sequenzen für die Anwendung in *B. subtilis* wurde berücksichtigt, dass diese nicht mehr als drei (im Falle von Adenin, Cytosin und Thymin) bzw. zwei (im Falle von Guanin) hintereinanderliegende Basen enthielten. Zudem wurden *Target*-Sequenzen, welche eine erweiterte PAM-Region aufwiesen, aufgrund der in *E. coli* festgestellten Schwierigkeiten im Vorfeld von der Auswahl ausgeschlossen (s. 4.2.1).

Tabelle 8: Merkmale der für die Genom Editierung in *B. subtilis* verwendeten crRNA-Sequenzen. Die Base, die sich unmittelbar vor der PAM-Region befindet (Position 20 der crRNAs), wurde Fett hervorgehoben.

<i>Knockout</i>	crRNA (5' → 3')	GC-Gehalt [%]	Minimale freie Energie [kcal/mol]
<i>ycsE</i>	GGACCAUAUUCAAAUGAUG U	35	0,00
<i>yitU</i>	UCAUCCGCAAGACGACAG U	55	0,00
<i>ywtE</i>	UGUAAUUACCUAGICCU U CG	40	0,00

Wie bereits unter 4.1.6.1 diskutiert, sind jedoch speziell für die Anwendung in Prokaryoten bisher nur wenige Merkmale von effizienten crRNA-Sequenzen in der Literatur beschrieben worden, weshalb eine abschließende Bewertung der hier verwendeten crRNAs nicht möglich ist.

Aufgrund der ungleichen Ergebnisse in Bezug auf die Erfolgsquote der in dieser Arbeit verwendeten CRISPR-Cas9 Methoden stellt sich daher weiterhin die Frage, ob die drei für *B. subtilis* ausgewählten crRNAs (zufällig) alle eine hohe Aktivität aufwiesen und/oder ob weitere Aspekte in Frage kommen, welche die Erfolgsquote der CRISPR-Cas9 Methoden wesentlich beeinflussen. Denkbare Einflussfaktoren wären bspw. die zwischen den Bakterienarten und einzelnen Stämmen stark variierende Transformationseffizienz, das unterschiedliche Rekombinationsvermögen sowie die unterschiedlich ausgeprägte Aktivität von DNA-Reparatursystemen (Leenay et al., 2019). So ließe sich die höhere Erfolgsquote der CRISPR-Cas9 Methode in *B. subtilis* evtl. durch seine im Vergleich zu *E. coli* wesentlich höhere Rekombinationsrate erklären (Michel & Ehrlich, 1984). Während für die CRISPR-Cas9 getriggerte, Lambda-Red vermittelte Rekombination in *E. coli* lediglich Rekombinationsraten von ca. 10^{-6} (*E. coli* W und *E. coli* MG1655) bzw. 10^{-8} Rekombinanten pro überlebenden Zellen (*E. coli* BL21 (DE3)) beschrieben werden, liegt bereits die natürliche Rekombinationsfrequenz von *B. subtilis* (ca. 10^{-4} bis 10^{-5} Rekombinanten pro überlebenden Zellen) um den Faktor 10 bis 10 000 höher (Bruand et al., 2001; Chung et al., 2017; Michel & Ehrlich, 1984; Vagner & Ehrlich, 1988). Zudem ist davon auszugehen, dass das CRISPR-Cas9 System auch in *B. subtilis* als Rekombinations-Induktor fungiert und eine Erhöhung der natürlichen Rekombinationsfrequenz bewirkt.

Unabhängig von genetischen Faktoren, könnten des Weiteren Unterschiede in der methodischen Durchführung (Verwendung eines Ein- versus Zwei-Plasmid-Systems, lineare *Donor-Template* DNA versus Plasmid-assoziiertes *Donor-Template* und/oder Ausnutzung der natürlichen Rekombinationsmaschinerie versus Einsatz von Rekombinationssystemen aus Phagen) einen Einfluss auf die Erfolgsquote der Systeme haben.

Eine aktuelle Studie nutzte zwei unterschiedliche CRISPR-Cas9 Methoden (Plasmid-kodiertes *Donor-Template* und endogenes HR-System bzw. Cotransformation eines linearen *Donor-*

Templates und Rekombinationsgene aus Bakteriophagen), um in drei verschiedene *Lactobacillus plantarum* Stämme identische genetische Veränderungen einzuführen. Durch diesen direkten Vergleich, konnten sie feststellen, dass der Erfolg der Genom Editierung sowohl zwischen den nah verwandten Stämmen als auch zwischen den beiden Methoden stark variierte (Leenay et al., 2019). Diese Forschungsergebnisse legen nahe, dass sich die Erfolgsquote von CRISPR-Cas Methoden – wie in dieser Arbeit beobachtet – auch bzw. insbesondere zwischen weiter entfernten Bakterienstämmen bzw. -Arten deutlich unterscheiden kann.

4.2.7 Gesamtgenomsequenzierungen zur Analyse von *On-Target*- und *Off-Target* Mutationen

Bevor die unter 4.2.5 generierten Deletionsmutanten biochemisch charakterisiert wurden, sollte zunächst die Gesamtgenomsequenzierung (engl. *Whole Genome Sequencing*, WGS) der mittels CRISPR-Cas9 erzeugten Tripledeletionsmutante sowie des Wildtypstammes (*B. subtilis* NIG1121) erfolgen, um zum einen die gezielt eingebrachten genomischen Modifikationen nachzuweisen und zum anderen Aufschluss über möglicherweise aufgetretene *Off-Target* Mutationen zu erhalten. Insbesondere wenn der Einfluss noch nicht vollständig aufgeklärter Gene untersucht werden soll, ist es von zentraler Bedeutung, ob im Zuge der eingeführten genetischen Veränderungen weitere Genabschnitte unbeabsichtigt modifiziert wurden, da diese *Off-Target* Mutationen (ebenfalls) biochemische Veränderungen mit sich bringen könnten.

Die Anzucht und Ernte der Stämme erfolgten analog zu der unter 7.2.11 beschriebenen Vorgehensweise. Die Extraktion der genomischen DNA sowie die Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung mittels *Next Generation Sequencing* (NGS-) Technik wurden von einem externen Dienstleister durchgeführt. Die anschließende Qualitätskontrolle der *reads* und das *Mapping* gegen das Referenzgenom des nächsten verwandten Stammes (*B. subtilis* subsp. *subtilis* 168, NCBI-Zugangsnummer: CP010052.1) erfolgten mittels der CLC Genomics Workbench 11 Software wie unter 7.2.11 weiter beschrieben. Die resultierenden 17.370.968 (Wildtyp) und 18.358.400 (Tripledeletionsmutante) 2 x 150-bp *paired-end reads* wiesen eine durchschnittliche Abdeckung (engl. *coverage*) von 605 bzw. 641 auf, wobei bereits Sequenzabdeckungen > 20 als *high coverage* Sequenzierungen einzuordnen sind (Xu et al., 2017). Für die automatisierte Identifizierung von Variationen (engl. *variant calls*) in Form von SNPs, Insertionen und Deletionen wurde die Software BCFtools eingesetzt (Li, 2011). Zusätzlich wurden die gemappten *reads* des Wildtypen und der Tripledeletionsmutante manuell, mit Hilfe des Integrative Genomics Viewers (IGV), auf das Vorhandensein weiterer Variationen untersucht (Robinson et al., 2011; Thorvaldsdóttir et al., 2013).

4.2.7.1 Nachweis der *On-Target* Mutationen

Im Vergleich zur SANGER-Sequenzierung, welche einen geringeren Datenumfang aufweist, stützt sich die Analyse von NGS-Sequenzierungsdaten vorwiegend auf bioinformatische Algorithmen zum automatisierten *variant calling*. Aufgrund der Komplexität der vorliegenden CRISPR-Cas9 vermittelten Indel-Mutationen (15-bp umfassende Insertionen der Überlappungsbereiche zwischen 115-bp Deletionsbereichen) und der relativ kurzen Leselänge von 150 bp stellte es sich jedoch heraus, dass die eingeführten Mutationen in der Tripledeletionsmutante mittels des *variant-callers* BCFtool nicht korrekt nachgewiesen werden konnten. Jüngste Studien haben die Unzulänglichkeiten der derzeit verfügbaren *variant-caller*, welche Indel-Mutationen > 50 bp häufig nicht erkennen, bereits aufgedeckt (Au et al., 2017; Cameron et al., 2019; Hasan et al., 2015; Mali et al., 2013; Wang et al., 2022; Yang et al., 2015).

Die Deletionen in den entsprechenden Genregionen von *ycsE*, *yitU* und *ywtE* wurden daraufhin mit Hilfe der IGV-Software in Form von Sequenzabdeckungslücken (engl. *sequence coverage gaps*) manuell identifiziert (s. Abbildungen 34 und 35A/B sowie Abbildung 50: *Genome Coverage Plot* in Anhang 13). Im Gegensatz zum Nachweis mittels SANGER-Sequenzierung (s. 4.2.5.1), kann jedoch auch mit dieser Software weder die exakte Größe der Deletionen noch das Vorhandensein der aus der Konstruktion der *Donor-Templates* resultierenden Überlappungssequenzen überprüft werden.

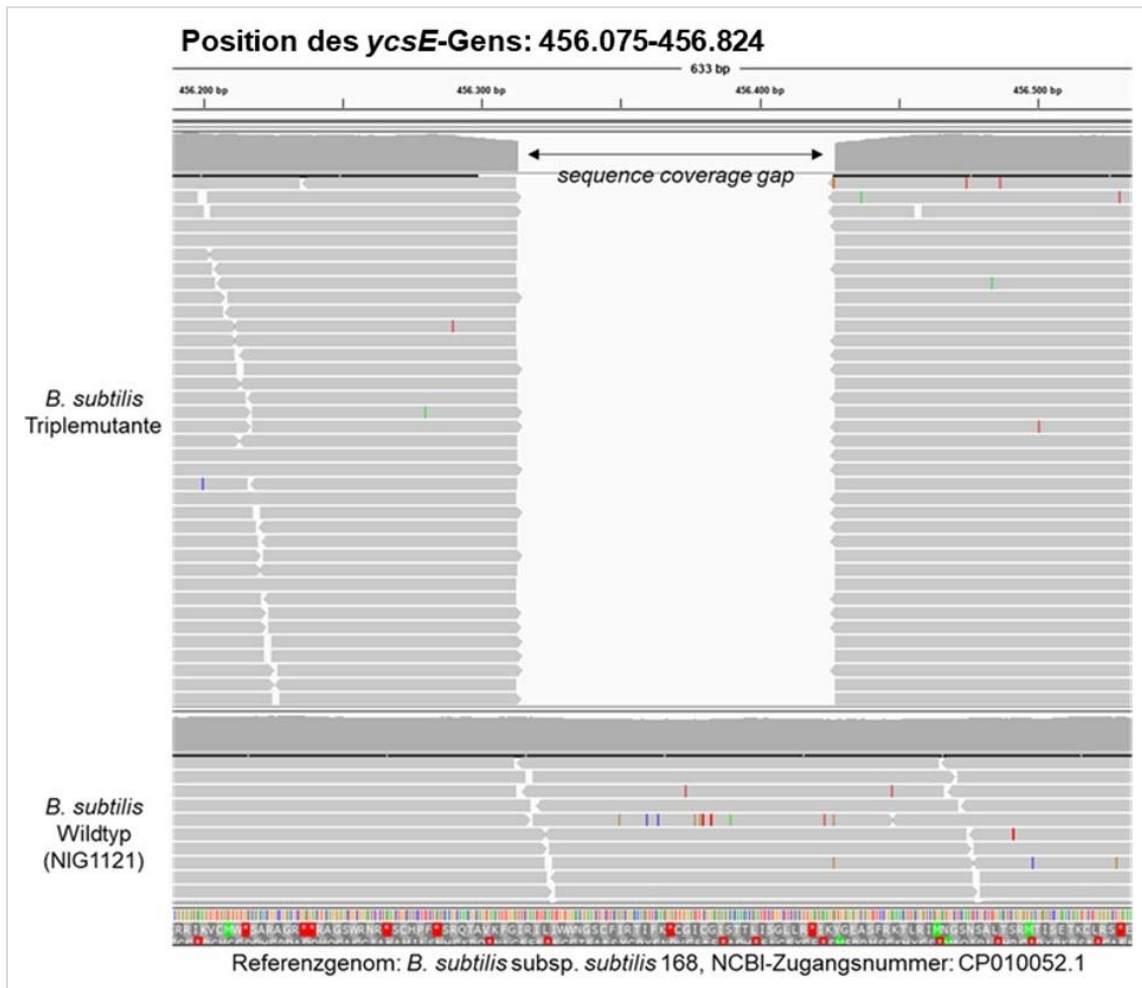


Abbildung 34: Visualisierung der CRISPR-Cas9 induzierten *On-Target* Mutation im *ycaE*-Gen der Triplemutante mittels IGV-Software. Der Nachweis der Deletion erfolgte durch die manuelle Identifizierung einer etwa 100-bp umfassenden Lücke in der Sequenzabdeckung der gemapten *reads* im Bereich der *ycaE*-Gensequenz. Die Abbildung zeigt, dass sich die Sequenzabdeckungslücke ausschließlich in den prozessierten Daten der Triplemutante, nicht jedoch in denen des Wildtyps befindet.

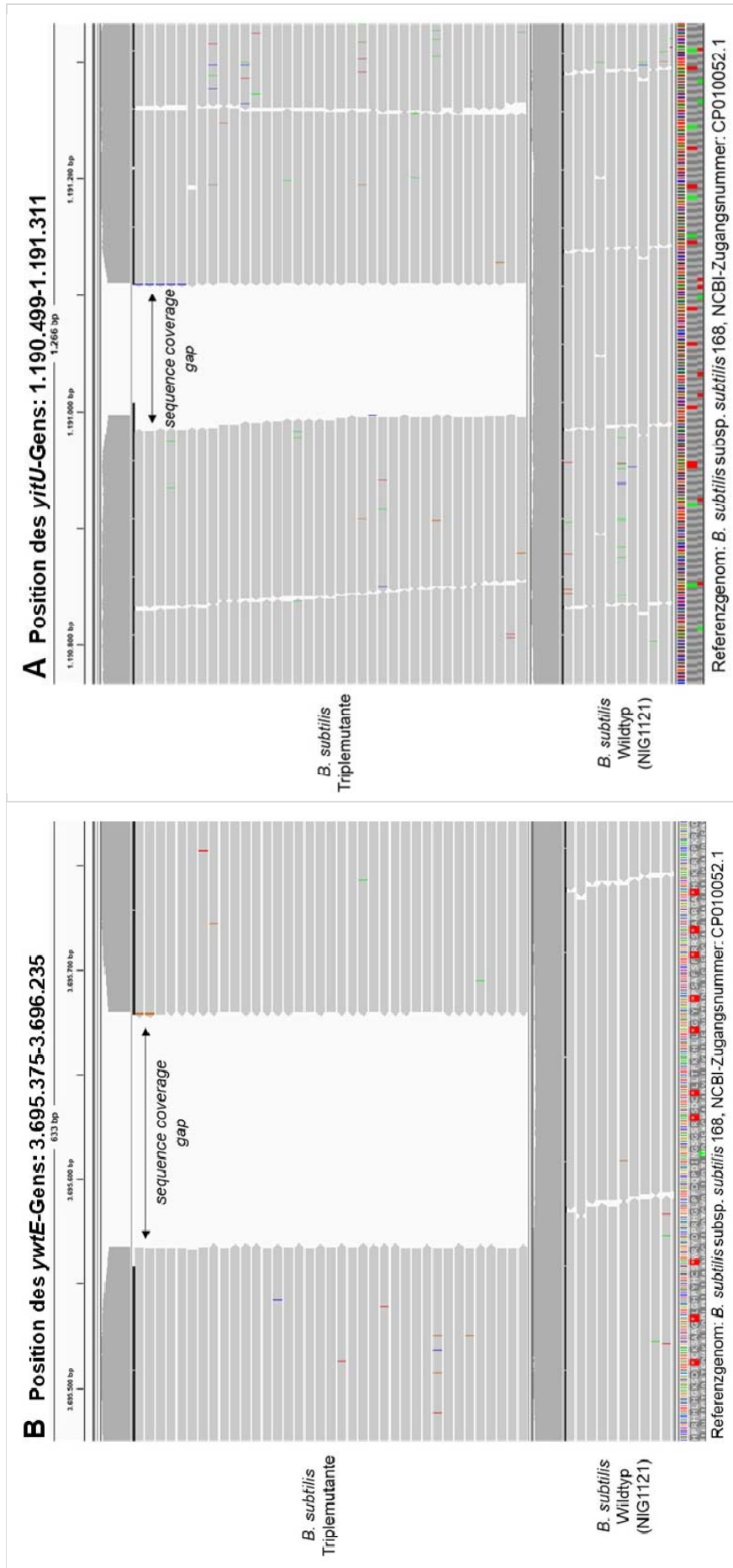


Abbildung 35: Visualisierung der CRISPR-Cas9 induzierten On-Target Mutationen im *yitU*-Gen (A) und im *ywtE*-Gen (B) der Triplemutante mittels IGV-Software. Der Nachweis der Deletionen erfolgte durch die manuelle Identifizierung der etwa 100-bp umfassenden Lücken in den Sequenzabdeckungen der gemappten *reads* im Bereich der *yitU*- bzw. *ywtE*-Gensequenz. Die Abbildungen A und B zeigen, dass sich die Sequenzabdeckungs-lücken ausschließlich in den prozessierten Daten der Triplemutante, nicht jedoch in denen des Wildtyps befinden.

4.2.7.2 Identifizierung möglicher *Off-Target* Mutationen

Im Gegensatz zu Eukaryonten fehlt den meisten Bakterien der NHEJ-Reparaturmechanismus, welcher Doppelstrangbrüche in Abwesenheit einer Reparaturvorlage reparieren kann und in einigen Fällen zu Indel-Mutationen führt (Ayora et al., 2011). Zwar verfügen einige Bakterien wie auch *B. subtilis* über ein solches *Low-Fidelity*-Reparatursystem, doch ist es oft nur während der Sporulationsphase aktiv (s. auch Kapitel 2.2.3). Aufgrund dieser Tatsache und des ohnehin relativ kleinen Genoms dürfte das Risiko von *Off-Target*-Effekten beim Einsatz von zielgerichteten Technologien wie dem CRISPR-Cas9 System in Bakterien relativ gering sein. Auf der anderen Seite existieren neben dem dominierenden HR-Reparatursystem in Bakterien noch zahlreiche weitere Mechanismen, welche die Genomreplikation und -reparatur regulieren und teilweise auch noch nicht vollständig aufgeklärt sind (s. Review: Lenhart et al., 2012). Wissenschaftliche Studien, welche das Auftreten von *Off-Target*-Effekten bei CRISPR-Cas9-modifizierten Bakterien untersucht haben, wurden zudem noch nicht veröffentlicht. Im nächsten Schritt wurden daher die unter 4.2.7 prozessierten NGS-Daten der Tripledeletionsmutante und des Wildtyps genutzt, um diese mit Hilfe der Software BCFtools auf das Vorhandensein weiterer genomischer Variationen zu untersuchen.

Ein Vergleich der beiden Variationsanalysen identifizierte einen zusätzlichen SNP in der Triplemutante (s. Anhang 14, Abbildung 51). Weitere Untersuchungen zeigten, dass der SNP in einem Gensegment liegt, welches für ein noch nicht charakterisiertes Protein (YjaZ) kodiert und zu einer *Missense*-Mutation mit veränderter Peptidsequenz führt. Die Auswirkungen der veränderten Aminosäuresequenz des Proteins auf seine Funktion sind nicht bekannt, jedoch wurde bereits nachgewiesen, dass es sich bei dem Gen *yjaZ* um kein essenzielles Gen handelt (Kobayashi et al., 2003). Ein Alignment der Aminosäuresequenz mit den Sequenzen von YcsE, YitU und YwtE zeigte, dass YjaZ nicht über die für HAD-Phosphatasen spezifischen hoch konservierten Motive I und IV verfügt (s. auch 4.2.5.1) und es sich daher höchstwahrscheinlich um keine weitere HAD-Phosphatase handelt.

Aufgrund der sequenziellen Generierung der Triplemutante aus dem Wildtyp (s. Abbildung 32) wurden PCR-Fragmente des *yjaZ*-Gensegments, der Einzel- und Doppeldeletionsmutanten hergestellt (s. 6.2.7.2 und für Primersequenzen s. Anhang 3, Tabelle 45), um diese mittels SANGER-Sequenzierung ebenfalls auf das Vorhandensein des entsprechenden SNPs zu überprüfen. Es zeigte sich, dass der SNP bereits in der Doppeldeletionsmutante $\Delta ycsE/\Delta yitU$ auftrat, welcher der unmittelbare Vorläufer der Triplemutante war. Die Doppelmutante selbst wurde wiederum aus der Einzelmutante *ycsE* durch die Deletion im Genbereich von *yitU* gewonnen.

Da sowohl die Einzelmutante als auch die daraus resultierende Doppelmutante $\Delta ycsE/\Delta ywtE$ keinen SNP im *yjaZ*-Gen aufwies, muss dieser bei der Generierung der Doppeldelentionsmutante $\Delta ycsE/\Delta yitU$ entstanden sein. Ein Alignment der *Target*-Sequenzen von *ycsE* und *yitU* (Sequenzen s. 6.7, Tabelle 14) mit der Gensequenz von *yjaZ* mittels des Genome Compilers ergab eine geringe Komplementarität für *ycsE* (max. 12 von 20 Basen, 60%) und *yitU* (max. 10 von 20 Basen, 50%) und keine PAM-Region an der entsprechenden Position.

Es ist daher unklar, ob die Entstehung des SNPs im *yjaZ*-Gen mit der Anwendung der CRISPR-Cas9 Methode im Zusammenhang steht oder dieser bspw. im Rahmen einer spontanen Mutation aufgetreten ist.

4.2.8 Phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutanten

4.2.8.1 Untersuchung der Deletionsmutanten auf eine Riboflavin-Auxotrophie

Alle bestätigten *B. subtilis*-Deletionsmutanten wurden im nächsten Schritt auf eine Riboflavin-Auxotrophie untersucht. Zu diesem Zweck wurden frisch hergestellte Kulturen des Wildtyps und der Deletionsmutanten seriell in steriler Saline verdünnt, die Suspensionen jeweils auf synthetischem Minimalagar und auf LB-Agarplatten ausgestrichen und die Agarplatten bei 37 °C bebrütet (s. 7.1.5). Da das LB-Medium aufgrund des Hefeextraktes und möglicherweise durch das aus Algen gewonnene Agar-Agar natürlicherweise geringe Mengen an Riboflavin enthält und *B. subtilis* über einen potenten Riboflavin-Transporter verfügt, wurden für den negativen Wachstumstest M9-Agarplatten verwendet, welche mit Hilfe von hoch reiner Agarose hergestellt wurden, um sicherzustellen, dass kein Riboflavin auf den Nährböden enthalten ist.

Alle Deletionsmutanten waren in der Lage in Abwesenheit von Riboflavin zu wachsen. Lediglich die Triplemutante zeigte auf dem Minimal-Agar leichte Wachstumsveränderungen in Bezug auf die Anzahl und die Größe der Kolonien (s. Abbildung 36). Die Ergebnisse des Wachstumstests der Einzelmutanten stehen in Übereinstimmung mit den von Koo et al. (2017) veröffentlichten Daten, welche zeigen, dass *B. subtilis* Einzeldelentionsmutanten von *ycsE*, *yitU* bzw. *ywtE* in der Lage sind in einem Glucose-Ammonium Minimalmedium (ohne Riboflavin) zu wachsen. Ebenso publizierten Yusupova et al. (2020), dass die Inaktivierung des Gens *yitU* auf dem Chromosom eines *B. subtilis* Wildtypstammes 168 *trpC*⁺ während der Kultivierung in Minimalmedium keinen Effekt auf das Wachstum und den Glucoseverbrauch der Zellen hatte.

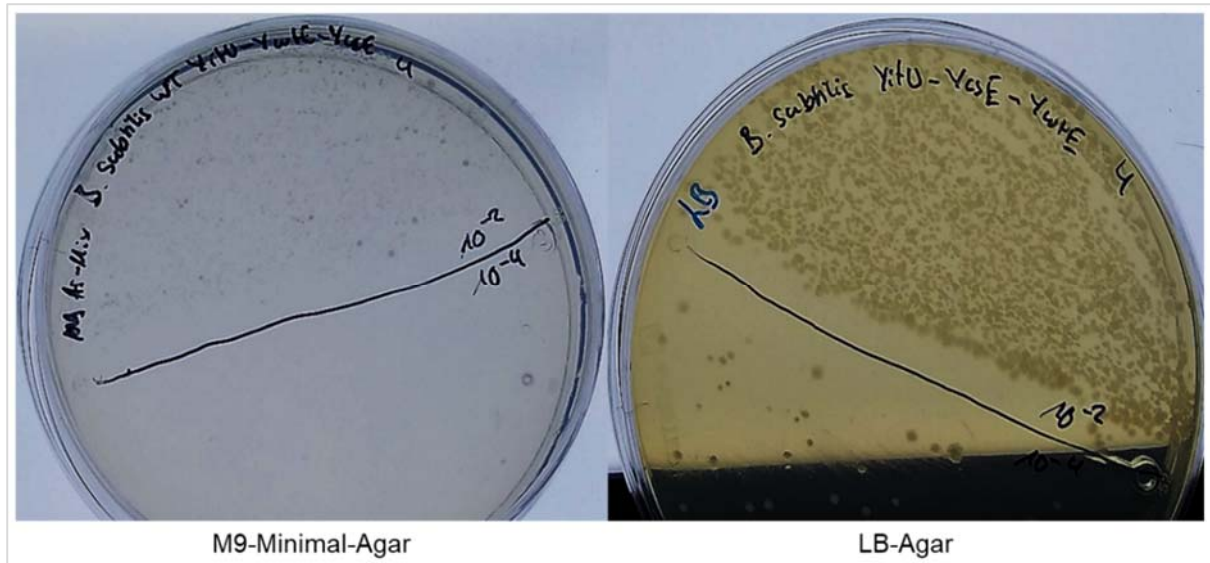


Abbildung 36: Wachstumstest der Triplemutante auf M9-Minimal-Agar (links) und LB-Agar (rechts). Auf beiden Nährböden wurden jeweils 90 μL einer Zellsuspension der Verdünnungsstufen 10^{-2} (obere Hälfte der Agarplatten) bzw. 10^{-4} (untere Hälfte der Agarplatten) ausplattiert. Die Anzahl und Größe der Bakterienkolonien sind auf dem Minimal-Agar (links), im Vergleich zum LB-Agar (rechts), bei beiden Verdünnungsstufen vermindert.

Bei dem Wildtypen, den Einzelmutanten sowie den Doppelmutanten zeigten sich keine bis kaum signifikante Wachstumsunterschiede zwischen den M9-Minimal-Nährböden und den LB-Nährböden, was darauf hindeutet, dass das verminderte Wachstum der Triplemutante im unmittelbaren Zusammenhang mit der Verfügbarkeit bzw. Biosynthese von Riboflavin steht und nicht (allein) in Folge eines verminderten Nährstoffgehalts im Minimal-Agar aufgetreten ist.

Da jedoch auch alle Multideletionsmutanten in Abwesenheit von exogenem Riboflavin weiterhin ein eindeutiges Wachstum zeigten, scheinen – entgegen den bisherigen Annahmen – eine oder mehrere weitere Phosphatasen in der Lage zu sein, die notwendige Dephosphorylierung des Riboflavin-Vorläufers ARPP in nennenswerten Raten zu katalysieren bzw. den Verlust der Enzymaktivitäten der drei HAD-Phosphatasen in Folge epistatischer Effekte zu kompensieren.

Dabei könnte es sich um eine oder mehrere der weiteren HAD-Phosphatasen handeln, die innerhalb unserer Forschungsgruppe von Sarge et al. (2015b) charakterisiert wurden (s. weitere Diskussion der Ergebnisse unter 4.3).

4.2.8.2 Bestimmung der Wachstumszeiten in Flüssigmedium

Neben den Wachstumstests auf M9-Minimal-Agar kann eine Kultivierung der Mutanten in flüssigem Minimal-Medium ebenfalls Rückschlüsse auf das Wachstum der Bakterien zulassen. Hierfür wurden der Wildtyp sowie alle Deletionsmutanten analog zu den unter 7.1.4 beschriebenen Bedingungen bis zu einem OD600-Wert von 0,4 in M9-Minimal-Medium kultiviert. Um weitere Einflüsse auf die Kultivierungsdauer der einzelnen Stämme möglichst gering zu halten, wurden alle Kulturen aus einer Stocklösung eines M9-Minimalmediums angesetzt und es wurde darauf geachtet, dass sich die Zeitpunkte des Animpfens der Kulturen im Bereich einiger weniger Minuten (ca. 1-2 min) befinden. Die durchschnittliche Wachstumszeit der Stämme

sowie die jeweiligen Einzelwerte der Doppelbestimmungen können Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 9: Wachstumszeiten [h:min] der *B. subtilis*-Stämme in M9-Minimal-Medium. Die Stämme wurden bis zum Erreichen eines OD600-Wertes von 0,4 kultiviert.

Kultivierungs- dauer [h:min]	Wildtyp	$\Delta ycsE$	$\Delta yitU$	$\Delta ywtE$	$\Delta ycsE/\Delta yitU$	$\Delta ycsE/\Delta ywtE$	$\Delta yitU/\Delta ywtE$	$\Delta ycsE/\Delta yitU/\Delta ywtE$
1. Bestimmung	5:35	5:05	5:20	5:30	6:00	5:40	6:00	6:00
2. Bestimmung	5:30	5:15	5:20	5:20	5:58	5:42	5:45	5:45
Mittelwert	5:32	5:10	5:20	5:25	5:59	5:41	5:52	5:52

Es sind kleine Abweichungen in der Kultivierungsdauer der Stämme zu erkennen. Alle Doppelmutanten sowie die Triplemutante wiesen eine im Vergleich zum Wildtypen und den Einzelmutanten längere Kultivierungsdauer auf. Die kombinatorischen *Knockouts* der HAD-Phosphatasen YcsE, YitU und YwtE führten demnach zu einer verminderten Wachstumsgeschwindigkeit bei den Multideletionsmutanten. Die längere Kultivierungsdauer der Triplemutante, im Vergleich zum Wildtypen und den Einzeldelentionsmutanten, steht in Übereinstimmung mit den zuvor beobachteten Wachstumsveränderungen der Triplemutante auf Minimal-Agar (s. 4.2.8.1). Die Doppeldelentionsmutanten, welche in diesem Test ebenfalls längere Wachstumszeiten aufwiesen, hatten hingegen auf den Minimal-Agarplatten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der Wildtyp gezeigt. Auffällig war des Weiteren, dass die Einzelmutanten und insbesondere $\Delta ycsE$ ein geringfügig schnelleres Wachstum zeigten als der Wildtyp. Dies könnte evtl. darauf zurückzuführen sein, dass es durch den Verlust der FMN-Phosphatase Aktivität in den Einzeldelentionsmutanten zu einer verminderten Umwandlung von FMN zu Riboflavin kommt, wodurch die Verfügbarkeit der Koenzyme für die verschiedenen Redoxreaktionen kurzfristig gesteigert wird. Bei den Multideletionsmutanten nimmt dieser Effekt möglicherweise aufgrund der zunehmend reduzierten Synthese von Riboflavin wieder ab.

In Bezug auf diese Beobachtungen wäre es interessant, die Bakterien-Stämme über die frühe exponentielle Wachstumsphase (s. Wachstumskurve in Anhang 11) hinaus zu kultivieren, um zu prüfen, ob sich die Unterschiede in der Kultivierungsdauer der Mutanten weiter fortsetzen.

Aufgrund der Substratpromiskuität der drei HAD-Phosphatasen (s. auch 2.1.4) kann nicht sicher differenziert werden, ob die festgestellten Wachstumsunterschiede (allein) aufgrund einer verminderten Dephosphorylierung von ARPP und der damit verbundenen reduzierten Verfügbarkeit von Riboflavin aufgetreten sind oder ob diese die Folge eines Verlustes (weiterer) enzymatischer Aktivitäten wie bspw. gegenüber FMN, Deoxinukleotiden und Nukleotiden sind.

4.2.8.3 Morphologische Untersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskopie

Um den Einfluss der Gen-*Knockouts* auf die Morphologie der Bakterien zu untersuchen, wurden wie unter 7.1.1 beschrieben, Übernachtkulturen der *B. subtilis* Wildtyp-Zellen und der *B. subtilis*-Deletionsmutanten kultiviert, die Zellen mittels Zentrifugation geerntet und die Zellpellets auf Eis gelagert. Die weitere Vorbereitung der Proben (Trocknung der Präparate und Bedampfung mit Kohlenstoff) erfolgte in Kooperation mit dem Institut für Biologie in Klein Flottbek, Hamburg. Die Mikroskopie der Zellpräparate wurde im Institut für Zoologie der Universität Hamburg unter Verwendung des Rasterelektronenmikroskops (REM) LEO 1525 Gemini durchgeführt. Die Aufnahmen des Wildtypstammes und der Deletionsmutanten zeigten alle die für *Bacillus* typische Stäbchenform und es konnten keine morphologischen Auffälligkeiten am Mureinsacculus festgestellt werden (s. Aufnahmen in Anhang 15). Die mikroskopische Vermessung der Bakterienzellen ergab keine signifikanten Größenunterschiede zwischen den Zellen des Wildtypen und denen der Deletionsmutanten (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.2.9 Bestimmung der bakteriellen Riboflavin-Produktionsraten mittels ELISA

Da entgegen der bisherigen Hypothese keiner der Deletionsstämme eine vollständige Riboflavin-Auxotrophie zeigte, sollten im nächsten Schritt die Riboflavin-Syntheseraten der *B. subtilis*-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtypen bestimmt werden. Hierzu sollte der Riboflavinegehalt in den Zellpellets (intrazelluläres Riboflavin) und in den aufkonzentrierten Zellüberständen (extrazelluläres Riboflavin) quantifiziert werden. Die Anzucht der Stämme und die Gewinnung der Zellüberstände sowie Ernte und Aufschluss der Zellpellets erfolgten analog zu der unter 7.1.4 beschriebenen Durchführung. Die Bestimmung der Riboflavin-Gehalte in den Proben wurde zunächst mit Hilfe einer von Nielsen et al. (1986) entwickelten HPLC-FLD- (engl. *high performance liquid chromatography with fluorescence detection*) Methode durchgeführt. Da mit Hilfe dieser Methode (abgeschätzte Nachweisgrenze ca. 500 ng/mL) kein Riboflavin in den Proben nachgewiesen werden konnte, wurde angenommen, dass diese nicht sensitiv genug ist, um die geringen Gehalte an Riboflavin in den Zellen bzw. dem Zellmedium nachzuweisen. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *B. subtilis*-Stamm handelt es sich um keinen Riboflavin-Überproduzenten und dementsprechend wird dieser auch nur geringe Mengen an Riboflavin ins Medium sekretieren. So wurden bspw. für den *B. subtilis* Wildtyp-Stamm ATCC 6051 innerhalb einer Kultivierungsdauer von drei Tagen und unter Verwendung von kohlenstoffreichen Nährmedien, lediglich Riboflavin-Produktionsraten von 1-3 mg/L ermittelt (Oraei et al., 2018). Auch der intrazelluläre Gehalt an Riboflavin sollte erwartungsgemäß gering sein, da *B. subtilis* das in den Zellen vorliegende freie Riboflavin innerhalb von wenigen Minuten in seine physiologisch aktiven Derivate FMN und FAD umwandelt (Cecchini et al., 1979).

Für die weiteren Riboflavin-Bestimmungen wurde daher das sensitivere (modifizierte Bestimmungsgrenze (BG): 0,16 ng/mL Riboflavin) ELISA-Testkit des Herstellers Elabscience Biotechnology (s. Anhang 1.3, Tabelle 42) verwendet. Bei dem Riboflavin-ELISA handelt es sich um ein kompetitives Testsystem, bei dem das an der Mikrotiterplatte gebundene Hapten (Riboflavin) mit dem Riboflavin aus der Probe bzw. dem Standard um die Bindung an einen spezifischen, Biotin-markierten Antikörper konkurriert. Je weniger Riboflavin in der Probe bzw. dem Standard enthalten ist, desto mehr markierter Antikörper bindet an das an der Festphase immobilisierte Riboflavin und desto mehr Substrat wird im letzten Reaktionsschritt umgesetzt. Das Signal in Form der optischen Dichte ist somit umgekehrt proportional zur Riboflavin-Konzentration. Da Riboflavin in den Zellen auch in Form seiner Derivate vorliegt und der ELISA eine Kreuzreaktivität von ca. 5,3% (FMN) bzw. 4,5% (FAD) aufweist (persönliche Mitteilung des Testkit-Herstellers), kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den ermittelten Riboflavin-Konzentrationen anteilig auch um FMN und FAD handelt. Der ELISA wurde wie unter 7.2.12 beschrieben durchgeführt.

Die Konzentration an Riboflavin in den Zellüberständen konnte wiederholt nicht bestimmt werden, da diese bei einer erforderlichen Probenverdünnung von 1:5 bis 1:10 in Probenverdünnungspuffer bei allen Proben unterhalb der Bestimmungsgrenze lag. Eine geringere Probenverdünnung wurde getestet, zeigte jedoch Matrix-Effekte.

Die Messwerte der Zellpellets (intrazelluläres Riboflavin) sowie die Standard-Kurve des Riboflavin-ELISAs sind in Anhang 16 abgebildet. Die für den Wildtypen gemessene Konzentration an Riboflavin wurde auf 100% normiert. Bei allen *B. subtilis* Deletionsmutanten konnte eine Abnahme der intrazellulären Riboflavinkonzentration im Vergleich zum Wildtypen festgestellt werden. Bei der Doppeldeletionsmutante $\Delta ycsE/\Delta yitU$ und der Tripledeletionsmutante lagen die gemessenen Riboflavinkonzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze von 25% (s. Abbildung 37).

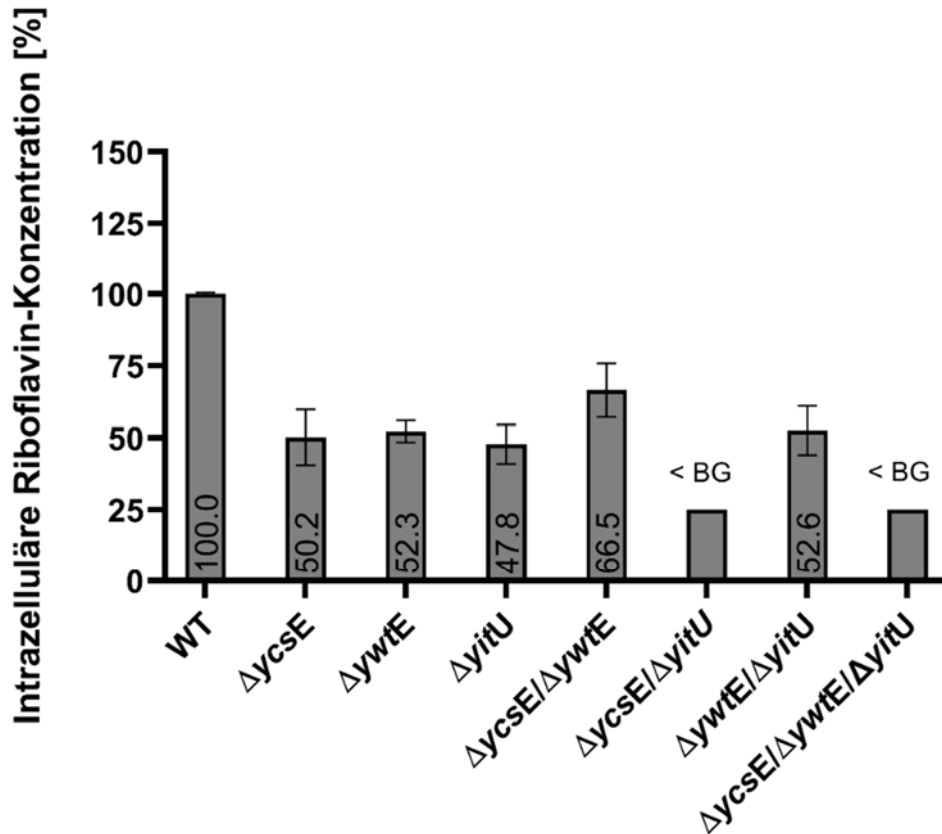


Abbildung 37: Bestimmung der intrazellulären Riboflavinkonzentrationen des *B. subtilis* Wildtypen und der Deletionsmutanten mittels ELISA. Die Riboflavinkonzentration des Wildtyp-Stammes wurde auf 100% normiert. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichungen dar, welche von jeweils zwei Zellpellets stammen. Die BG lag bei < 25%, bezogen auf den niedrigsten Standard von 0,16 ng/mL Riboflavin.

Der *B. subtilis* *ycsE*-Deletionsklon zeigte eine um etwa 50% verringerte intrazelluläre Riboflavinkonzentration, was mit den von Sarge et al. (2015b) veröffentlichten Ergebnissen übereinstimmt, bei denen ein roher Zellextrakt einer *B. subtilis* *ycsE*-Deletionsmutante die Dephosphorylierung von ARPP mit einer um den Faktor zwei verringerten spezifischen Aktivität im Vergleich zum Elternstamm katalysierte. Auch die anderen Einzeldelentionsmutanten ($\Delta yitU$ und $\Delta ywtE$) wiesen eine etwa 50%ige Abnahme der Riboflavin-Konzentration in den Zellen auf. Analog zu diesen Ergebnissen zeigte eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2020, dass ein *Knockout* des *yitU*-Gens auf dem Chromosom des Riboflavin-Produktionsstammes *B. subtilis* Y25 zu einer reduzierten Akkumulation von Riboflavin führte. Im Umkehrschluss konnte beobachtet werden, dass die Überexpression von *yitU* sowohl in dem Produktionsstamm als auch in einem *B. subtilis* Wildtyp-Stamm eine erhöhte Riboflavin Produktion zur Folge hatte (Yusupova et al., 2020).

Die Doppeldelentionsmutante $\Delta ycsE/\Delta yitU$ sowie die Triplemutante wiesen eine entsprechend der spezifischen enzymatischen Aktivitäten der drei HAD-Phosphatasen (*ycsE* = 12 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$; *yitU* = 1,7 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$; *ywtE* = 0,69 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$) stärkere Abnahme der intrazellulären Riboflavinkonzentration auf als die Doppelmутanten $\Delta ycsE/\Delta ywtE$ und $\Delta ywtE/\Delta yitU$.

Sie zeigten den stärksten Abfall der intrazellulären Riboflavin-Konzentration mit Werten unterhalb der BG (25%).

Auffällig war, dass die reduzierten Riboflavin-Syntheseraten der Einzelmutanten in den Doppelmutanten $\Delta ycsE/\Delta ywtE$ und $\Delta ywtE/\Delta yitU$ nicht wie erwartet zu einem multiplikativen Effekt führten, sondern für die beiden Doppelmutanten gleiche bzw. sogar geringfügig höhere Syntheseraten ermittelt wurden. In weiterführenden Arbeiten wurden in unserer Arbeitsgruppe mittels HPLC-FLD die intrazellulären Gehalte an FMN und FAD in den Deletionsmutanten und dem Wildtyp-Stamm bestimmt. Auch hier zeigte sich, dass die Multideletionsmutanten zum Teil höhere Flavin-Syntheseraten aufwiesen als die Einzelmutanten (unveröffentlichte Ergebnisse von F. Rostami). Sowohl die Beobachtung, dass die Triplemutante im Wachstumstest keine vollständige Riboflavin-Auxotrophie zeigte (s. 4.2.8.1), als auch die im Vergleich zu den Einzelmutanten teilweise höheren Flavin-Syntheseraten der Multideletionsmutanten, könnten möglicherweise durch positive, d.h. antagonistische oder kompensierende epistatische Wechselwirkungen zwischen den Genen begründet sein. Als Epistasie bezeichnet man das Phänomen, dass Gene auf unterschiedliche Weise miteinander wechselwirken können, indem die Aktivitäten oder auch Inaktivitäten ein oder mehrerer Gene die Expression eines oder mehrerer anderer Gene verstärken (positive Epistasie) oder unterdrücken (negative Epistasie) (Fisher, 1918; Segrè et al., 2005). Umfangreiche Studien konnten feststellen, dass positive epistatische Effekte in Prokaryoten weit verbreitet sind und insbesondere zwischen Genen desselben Signalweges auftreten (Babu et al., 2011; Cohan et al., 1994; MacLean, 2010; Typas et al., 2008). Zudem wurde gezeigt, dass die Stärke der Epistasie mit der Mutationsschwere korreliert, was bedeutet, dass bei einer starken Störung stark antagonistische Effekte zu erwarten sind, während schwache Störungen leichte bis gar keine epistatischen Effekte bewirken (Gros et al., 2009; MacLean, 2010).

Die Tatsache, dass die beiden Doppelmutanten $\Delta ycsE/\Delta ywtE$ und $\Delta ywtE/\Delta yitU$ die fehlenden enzymatischen Funktionen der HAD-Phosphatasen besser kompensieren konnten als die Doppelmutante $\Delta ycsE/\Delta yitU$ sowie die Tripledeletionsmutante, kann evtl. darauf zurückgeführt werden, dass YcsE und YitU die höchsten enzymatischen Aktivitäten gegenüber ARPP aufweisen und das Enzym mit der jeweils nächst höheren enzymatischen Aktivität (YwtE bzw. in Bezug auf die Triplemutante mögliche weitere Phosphatasen), trotz einer erhöhten Expression, diese nicht mehr vollständig kompensieren können.

Die Annahme der positiven Epistasie wird von der Beobachtung unterstützt, dass es sich bei den von Sarge et al. (2015b) identifizierten HAD-Phosphatasen um eine Gruppe von mehreren promiskuen Enzymen handelt, welche neben der Dephosphorylierung von ARPP noch weitere Substratspezifitäten aufweisen (s. auch Abschnitt 2.1.4). Auch wenn der evolutionäre Nutzen

der Enzympromiskuität noch nicht vollständig geklärt ist, ist es naheliegend, das zuvor irrelevante Nebenaktivitäten von promiskuen Enzymen besonders leicht und ohne größere Folgen für die Zelle adaptiert werden können, sollte dieses aufgrund eines veränderten biologischen Kontextes erforderlich sein (O'Brien & Herschlag, 1999).

Weitere Analysen wie z. B. die direkte quantitative Bestimmung des Riboflavin-Vorläufers ARPP in den Deletionsmutanten und dem Wildtyp könnten eine zusätzliche Evidenz zur Untermauerung dieser ersten Ergebnisse liefern. Erwartungsgemäß sollten die *Knockouts* der HAD-Phosphatasen zu einer der Abnahme des Flavin-Gehalts entsprechenden Akkumulation des phosphorylierten Vorläufers führen. Eine längere Wachstumsdauer der Stämme bspw. über mehrere Tage, müsste zudem zu einer höheren Produktion und somit Sekretion von Riboflavin ins Kulturmedium führen, so dass eine Bestimmung des evtl. aussagekräftigeren extrazellulären Riboflavin-Gehalts möglich wäre.

4.2.10 Diskussion der Rolle von YcsE, YitU und YwtE sowie weiterer HAD-Phosphatasen in der Riboflavinbiosynthese

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass alle drei HAD-Phosphatasen (YcsE, YitU und YwtE), welche im *in-vitro* Phosphatsetest eine hohe enzymatische Aktivität gegenüber ARPP gezeigt hatten (Sarge et al., 2015b), die Dephosphorylierung des Intermediates auch *in-vivo* katalysieren und somit für die Riboflavinbiosynthese in *B. subtilis* von Bedeutung sind. Alle Einzeldelentionsmutanten wiesen im ELISA eine um etwa 50% reduzierte Riboflavin-Konzentration auf, die Doppelmutante $\Delta ycsE/\Delta yitU$ sowie die Triplemutante zeigten sogar um > 75% verminderte intrazelluläre Riboflavin-Konzentrationen (s. 4.2.9). Entgegen der bisherigen Annahme konnte jedoch für keine der Multideletionsmutanten, auch nicht für die Triplemutante, eine vollständige Riboflavin-Auxotrophie festgestellt werden. Die Triplemutante zeigte gegenüber dem Wildtyp-Stamm lediglich geringfügige Wachstumsunterschiede (s. 4.2.8). Wie bereits unter 4.2.9 diskutiert, besteht die Möglichkeit, dass weitere Phosphatasen die essenzielle Dephosphorylierung des Riboflavin-Vorläufers ARPP in nennenswerten Raten katalysieren können. Dabei könnte es sich um eine oder mehrere der HAD-Phosphatasen handeln, welche innerhalb unserer Forschungsgruppe bereits charakterisiert wurden (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Überblick über die kinetischen Kenndaten der 14 rekombinant exprimierten und im Phosphatase-test analysierten HAD-Phosphatasen aus *B. subtilis* (modifiziert nach Sarge et al., 2015b). Die drei HAD-Phosphatasen YcsE, YitU und YwtE wurden Fett hervorgehoben.

Enzym	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$] gegenüber:	
	ARPP	FMN
YcsE	12	25
YitU	1,7	17
YwtE	0,69	7,4
YxeH (YidA)	0,017	0,40
YfnB	0,0054	< 0,001
NtdB (YhjK)	0,0018	< 0,001
BAM54862.1	0,0005	< 0,001
YkrA	< 0,0001	0,17
YwpJ	< 0,0001	0,009
YkvW	< 0,0001	< 0,001
KFI15493.1	< 0,0001	< 0,001
NagD	< 0,0001	< 0,001
YhcW	< 0,0001	< 0,001
YsaA	< 0,0001	< 0,001

Das Enzym mit der nächsthöheren spezifischen Aktivität gegenüber ARPP (YxeH) hat jedoch eine Umsatzrate, die im Vergleich zu YcsE um einen Faktor von etwa 700 reduziert ist. Da in der Studie von Sarge et al. (2015b) insgesamt 16 mutmaßliche *B. subtilis* HAD-Mitglieder gefunden wurden, von denen nur 14 in löslicher Form und mit guter Ausbeute in *E. coli* exprimiert werden konnten, ist es ebenso möglich, dass eines oder beide dieser HAD-Enzyme weitere Phosphatasen sind, welche die Hydrolyse von ARPP mit einer höheren spezifischen Aktivität katalysieren können.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass der Verlust der Enzymaktivitäten der drei HAD-Phosphatasen durch epistatische Effekte kompensiert wird (s. auch Diskussion unter 4.2.9). Diese epistatischen Effekte könnten theoretisch aus unterschiedlichen Genaktivitäten (Genregulationen) oder aus Mutationen weiterer HAD-Phosphatasen und/oder Enzymen der Riboflavinbiosynthese resultieren. Auf Grundlage der durchgeführten Gesamtgenomsequenzierung und der umfangreichen Variationsanalyse (s. 4.2.7) wurde eine zusätzliche Punktmutation in der Doppelmutante $\Delta ycsE/\Delta yitU$, sowie der daraus erzeugten Triplemutante nachgewiesen. Die Funktion des betroffenen Proteins YjaZ ist noch nicht abschließend geklärt, es konnte jedoch mittels Sequenzanalyse keine Zugehörigkeit zur Familie der HAD-Phosphatasen festgestellt werden, weshalb vermutet wird, dass diese Mutation spontan aufgetreten ist. Die hier angenommenen epistatischen Effekte müssten dementsprechend die Folge einer veränderten Genexpression sein.

Als Kandidatenenzyme für eine Hochregulierung kämen u.a. alle weiteren HAD-Phosphatasen in Frage, welche im Phosphatasetest ursprünglich eine geringe enzymatische Aktivität gegenüber ARPP gezeigt hatten (s. Tabelle 10). Die (Haupt)funktionen dieser 11 HAD-Phosphatasen sind weiterhin größtenteils unbekannt, für einige der Enzyme wurden jedoch in den letzten Jahren ihre präferierten Substrate veröffentlicht. So wurde bspw. das Enzym YsaA (neue Genbezeichnung: *serB*) als Phosphoserin-Phosphatase in der Serin-Biosynthese identifiziert (Koo et al., 2017). Für YwpJ wurde kürzlich gezeigt, dass dieses N-Acetylglucosamin dephosphoryliert und wahrscheinlich an der Phosphorzucker-Stressantwort beteiligt ist (Morabbi Heravi et al., 2019).

Neben einer erhöhten Expression weiterer HAD-Phosphatasen, welche die Dephosphorylierung von ARPP ursprünglich als Nebenfunktion katalysiert haben, besteht zudem die Möglichkeit, dass in Folge der verminderten Riboflavin Produktion der Deletionsmutanten die Riboflavinbiosynthese-Gene des *rib*-Operons hochreguliert wurden, um die zelluläre Verfügbarkeit der essenziellen Kofaktoren FMN und FAD zu gewährleisten. Wie unter 2.1.3 näher erläutert, verfügt *B. subtilis* über einen Riboswitch-Mechanismus, welcher bei einer Akkumulation von FMN in der Zelle über eine Rückkopplungshemmung die Expression der Gene auf dem *rib*-Operon hemmt (Vitreschak et al., 2002; Winkler et al., 2002).

Im Umkehrschluss könnte ein deutlich verminderter FMN-Gehalt in der Zelle zu einer Hochregulierung des *rib*-Operons führen. Eine solche Hochregulierung eines durch einen Riboswitch-Mechanismus kontrollierten Operons wurde bereits für den Thiaminbiosyntheseweg in einer *A. thaliana*-Mutante beschrieben (Hsieh et al., 2017). Interessanter Weise wurde die erhöhte Expression der Biosynthese-Gene im Zusammenhang mit dem *Knockout* einer HAD-Phosphatase beobachtet, welche zusammen mit weiteren unspezifischen Phosphatasen im Verdacht steht, die Dephosphorylierung von Thiamin-Monophosphat, den vorletzten Schritt der Biosynthese, zu katalysieren (Hasnain et al., 2016; Hsieh et al., 2017).

Neben der noch offenen Frage, ob zusätzlich zu YcsE, YwtE und YitU noch weitere HAD-Phosphatasen den *Missing Link* in der Riboflavinbiosynthese mit einer hohen spezifischen Aktivität katalysieren, gilt es noch zu klären, welchen evolutionären Grund die Ausbildung der Phosphatase-Isoenzyme haben könnte. Häufig katalysieren Isoenzyme Reaktionsschritte, welche natürliche Kontrollpunkte für metabolische Regulierungen darstellen (Stifel & Herman, 1972). Da die Dephosphorylierung von ARPP jedoch erst spät in der Biosynthese erfolgt und ARP zudem ausschließlich für die Synthese von Riboflavin benötigt wird, besteht zumindest kein offensichtlicher Grund für eine regulierende Funktion der Isoenzyme. Des Weiteren ist es noch unklar, warum nahezu alle bekannten HAD-Phosphatasen, welche ARPP dephosphorylieren (s. auch 2.1.4) mit einer ebenso hohen bzw. höheren enzymatischen Aktivität auch die Dephosphorylierung des aus Riboflavin gebildeten Cofaktors FMN katalysieren.

4.3 Weitere Ergebnisse dieser Doktorarbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde neben der Etablierung des CRISPR-Cas9 Systems zur Genom Editierung in Prokaryoten (*E. coli* und *B. subtilis*) und der Erzeugung einzelner und kombinatorischen *Knockouts* von drei putativen HAD-Phosphatasen (YcsE, YitU und YwtE) in *B. subtilis*, der Forschungsansatz verfolgt, das CRISPR-Cas9 System als eine *in-vitro* Anwendung, in Form einer DNA-basierten Nachweismethode für die Lebensmittelkontrolle und -überwachung einzusetzen.

Die Authentizität von Rohwaren und Lebensmitteln bezüglich ihrer Zusammensetzung, Sortenreinheit, Art und geografischen Herkunft und/oder ihrer Herstellungsmethode ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal das in den letzten Jahren aufgrund zahlreicher Lebensmittelbetrugsfälle zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. Zur Differenzierung verschiedener Arten (bspw. Tierarten oder Fischarten) sind mehrere Protein-basierte (u.a. isoelektrische Fokussierung, ELISA) - und DNA-basierte Methoden (u.a. PCR, Microarray, Sequenzierungstechniken) verfügbar. Die Unterscheidung einzelner Sorten bspw. von Nüssen, Trüffeln oder Kakao, die aufgrund bestimmter Qualitätsmerkmale und/oder einer limitierten Erntemenge teilweise große preisliche Differenzen aufweisen, stellt eine besondere Herausforderung dar, da sich das Erbgut aufgrund des hohen Verwandtschaftsgrades teilweise lediglich in einigen wenigen Basenpaaren unterscheidet. Die für gewöhnlich hoch-variable produktspezifische Matrix der Lebensmittel und/oder die unterschiedlichen Prozessierungsgrade der Rohwaren, können eine sichere Differenzierung zusätzlich erschweren.

In der Routineanalytik werden Einzelbasenaustausche (engl. *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) häufig mit Hilfe von Analysemethoden nachgewiesen, welche auf der Verwendung von Restriktionsendonukleasen basieren. Diese Anwendung setzt jedoch das Vorhandensein einer geeigneten Erkennungsstelle (Restriktionsschnittstelle) voraus. Hier kann die mittels einer crRNA-Sequenz frei programmierbare Cas9-Endonuklease eine leistungsfähige Alternative darstellen.

In dieser Arbeit sollte exemplarisch eine CRISPR-Cas9 basierte, quantitative Nachweismethode zur Differenzierung des Konsumkakaos "CCN-51" von der Edelkakao-Sorte "Arriba" entwickelt werden. Aufgrund der enormen Preisunterschiede dieser beiden Kakaosorten, der begrenzten Anbaumenge von Edelkakao sowie der zunehmenden Auslobung von Edelkakao auf Lebensmitteln stellt dieses ein typisches Lebensmittel dar, bei welchem Methoden zur Authentizitätsbestimmung von Bedeutung sind.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde ein SNP ausgewählt, welcher eine in CCN-51 vorhandene PAM-Region (NGG) in eine nicht-kanonische PAM-Region in Arriba Kakao umwandelt. Hierdurch sollte erreicht werden, dass später nur die PCR-Fragmente von CCN-51 gespalten werden. Im nächsten Schritt wurden aus den reinen DNA-Isolaten der Kakaobohnen

der Sorten Arriba und CCN-51, PCR-Fragmente mit einer Größe von 1031 bp amplifiziert. Die Länge des DNA-Templates und die Position des SNPs wurden dabei so gewählt, dass nach einem *in-vitro*-Verdau mit der Cas9-Nuklease zwei Fragmente unterschiedlicher Größe erhalten werden. Zur Quantifizierung von Mischungen der beiden Sorten Arriba und CCN-51 wurden anschließend Standards mit Anteilen von 2,5-80% CCN-51 in Arriba Kakao hergestellt. Die Standards konnten zusammen mit den Realproben für eine semi-quantitative Analyse mittels AGE oder für quantitative Bestimmungen mit Hilfe der Kapillargelelektrophorese verwendet werden.

Unter Anwendung der Methode war es möglich Beimischungen ab 5-10% des Konsum-Kakaos CCN-51 im Edelkakao Arriba nachzuweisen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Methode mit einigen Modifikationen auch für die Differenzierung von prozessierten Rohwaren wie gerösteten und fermentierten Kakaobohnen und daraus hergestellten Schokoladenerzeugnissen geeignet ist.

Die programmierbare Cas9-Endonuklease stellt somit ein effizientes Werkzeug für die Detektion von SNPs dar, welche für Typ-II-Endonukleasen im Rahmen einer "klassischen" RFLP-Analyse (RFLP = Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) nicht zugänglich sind. Zudem stehen mit den zunehmenden Entdeckungen von weiteren CRISPR-Systemen in Bakterien und Archaeen (z. B. CRISPR/Cpf1 mit der PAM-Region 5'-TTTV-3') sowie synthetisch erzeugten Varianten von bereits bekannten CRISPR-Nukleasen, eine große Anzahl von verschiedenen Erkennungssequenzen zur Verfügung. Unter Einsatz dieser CRISPR-Nukleasen könnten auch bisher nur schwer detektierbare SNPs, wie sie in AT-reichen Regionen des Plastidengenoms vorkommen, zugänglich gemacht werden.

Die Ergebnisse wurden im Rahmen einer wissenschaftlichen Publikation veröffentlicht (Scharf et al., 2020):

Scharf, A.*, Lang, C.*, Fischer, M. Genetic authentication: Differentiation of fine and bulk cocoa (*Theobroma cacao* L.) by a new CRISPR/Cas9-based *in vitro* method. *Food Control* **2020**, 114, 107219. *geteilte Autorenschaft

5 Ausblick

Zur Anwendung der CRISPR-Cas9 Technologie in Bakterien

Der Erfolg der Anwendung der CRISPR-Cas Technologie in Bakterien ist von vielen Faktoren abhängig, welche teilweise noch nicht vollständig verstanden sind. Eine „einfache Übertragung“ bereits bestehender CRISPR-Cas Methoden auf einen anderen Stamm — auch wenn dieser ein naher Verwandter ist — scheint daher häufig nicht möglich zu sein. Daher könnte es zukünftig von Interesse sein, wenn für die Erzeugung einer gewünschten genetischen Veränderung in einem bestimmten Bakterienstamm möglichst mehrere komplementäre CRISPR-Cas Methoden zur Verfügung stehen würden.

Insbesondere bei der Anwendung in *E. coli* BL21(DE3) wurden in dieser und in weiteren Arbeiten Defizite bzgl. der Leistungsfähigkeit der CRISPR-Cas9 Technologie festgestellt. Da es sich bei *E. coli* BL21 um einen bedeutenden Produktionsstamm für rekombinante Proteine handelt, wäre eine robuste und effiziente Methode zur genetischen Veränderung des Stammes äußerst wünschenswert. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von den Autoren um Y. Jiang et al. (2015) konnte die Effizienz des ursprünglich für *E. coli* MG1655 entwickelten Zwei-Plasmid-Systems für die Anwendung in *E. coli* BL21(DE3) erhöht werden, in dem u.a. der IPTG-induzierbare Promotor *pMB1*, der die Transkription der pTargetF-spezifischen gRNA reguliert durch einen strenger regulierten Promotor ersetzt wurde. Die Autoren konnten zeigen, dass der ursprüngliche Promotor in BL21(DE3) eine erhöhte Undichtigkeit aufwies und somit ein Teil der pTargetF-Plasmide bereits unmittelbar nach der Transformation eliminiert wurde (Li et al., 2021). Das modifizierte Plasmid-System ist für Forschungszwecke frei verfügbar. Als weitere Problematik erwies sich die hohe Anzahl an ineffizienten crRNAs, welche aufgrund einer unzureichenden Aktivität nicht in der Lage waren gleichzeitig alle Genomäquivalente der Bakterien zu schneiden. Da die Zellen in Folge einer induzierten SOS-Antwort und einer damit einhergehenden Erhöhung der RecA-abhängigen Reparatur der Selektion durch das CRISPR-Cas System entkommen, könnte der Einfluss der crRNAs auf den Erfolg der Genom Editierung durch den Einsatz von *recA*-defizienten (*E. coli*)-Stämmen deutlich abgeschwächt werden (Cui & Bikard, 2016; Guo et al., 2018; Moreb et al., 2017). Die Verwendung von *recA*-Mutanten, welche über keine funktionierenden zelleigenen DNA-Reparaturwege verfügen, hätte jedoch neben einer Instabilität des Genoms zur Folge, dass ein Einsatz von externen Rekombinationssystemen wie bspw. dem Lambda Red System für die Genom Editierung zwingend erforderlich wäre. Die bessere Herangehensweise wäre daher eine gezielte Auswahl von effizienten crRNAs. Hierfür bedarf es jedoch zunächst groß angelegter prokaryotischer Studien, um weitere Merkmale von effizienten und ineffizienten crRNAs zu identifizieren und geeignete Algorithmen zu ihrer Vorhersage zur Verfügung stellen zu können.

Zur weiteren Aufklärung der Rolle von YcsE, YitU und YwtE in *B. subtilis*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Deletionsmutanten der promiskuen HAD-Phosphatasen YcsE, YitU und YwtE, welche mit einer hohen enzymatischen Aktivität die Dephosphorylierung von ARPP und FMN in der Riboflavinbiosynthese katalysieren, verminderte intrazelluläre Riboflavinkonzentrationen aufweisen. Darüber hinaus zeigte die Tripledeletionsmutante in Abwesenheit von Riboflavin zwar leichte Wachstumsveränderungen (verminderte Koloniengröße, geringfügig längere Wachstumszeiten), jedoch keine Riboflavin-Auxotrophie. Die ursprüngliche Komplexität der Thematik wird nun durch die Vermutung, dass epistatische Effekte den Verlust der fehlenden Enzymaktivitäten (teilweise) kompensieren könnten, nochmals erhöht. Um die Rolle der drei HAD-Phosphatasen in der Riboflavinbiosynthese und darüber hinaus zu klären, kann daher die Analyse jeweils nur eines einzelnen Metaboliten wie bspw. Riboflavin, ARPP oder FMN nicht ausreichend sein. Um der Fragestellung gerecht zu werden, bedarf es einer hochempfindlichen Nachweismethode, welche es ermöglicht viele hunderte Metabolite parallel in einer Probe zu erfassen bzw. zu quantifizieren. Eine geeignete, auf das Metabolom von Bakterien optimierte LC-MS (engl. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) -Methode wird derzeit in weiterführenden Arbeiten in unserer Forschungsgruppe etabliert.

Um der Frage nachzugehen, ob es in Folge der *Knockouts* der HAD-Phosphatasen zu einer Hochregulierung des *rib*-Operons bzw. einzelner *rib*-Gene gekommen ist, würde sich die quantitative Bestimmung des bifunktionellen Proteins RibA eignen, da die Reaktion der GTP-Cyclohydrolase II-Domäne nach aktuellem Stand den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Riboflavinbiosynthese darstellt (Abbas & Sibirny, 2011; Gräwert et al., 2013). Eine solche zielgerichtete Genexpressionsanalyse könnte bspw. mit Hilfe einer quantitativen PCR, der DNA-Microarray-Technik, einer Gesamt-Transkriptom-*Shotgun*-Sequenzierung (RNA-Sequenzierung) oder ebenfalls mittels Massenspektrometrie-basierten Verfahren erfolgen.

Zur Identifizierung von weiteren Phosphatasen welche die Dephosphorylierung von ARPP katalysieren

Unabhängig von der Frage, ob die *Knockouts* der HAD-Phosphatasen YcsE, YitU und/oder YwtE in *B. subtilis* eine Hochregulierung von Genen des *rib*-Operons und/oder von weiteren HAD-Phosphatasen zur Folge hatten, müssen eine oder mehrere weitere Phosphatasen existieren, welche die essenzielle Dephosphorylierung von ARPP wenigstens mit einer schwachen enzymatischen Aktivität katalysieren. Bei den gesuchten (HAD)-Phosphatasen könnte es sich um ein oder mehrere der Enzyme handeln, welche innerhalb unserer Forschungsgruppe bereits charakterisiert wurden oder um weitere, noch nicht identifizierte (HAD)-Phosphatasen. Eine Möglichkeit besteht daher darin, in konsekutiver Weise alle weiteren bekannten Phosphatasen in der Triplemutante auszuschalten. Mit insgesamt 11 potenziellen Kandidaten und aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes und des lediglich spekulativen Charakters, wäre dieser

Forschungsansatz jedoch wenig zielführend. Hinzu kommt, dass auf diese Weise lediglich eine Multideletionsmutante generiert würde, die im besten Falle eine Riboflavin-Auxotrophie aufweist. Eine Aussage über die Rolle der einzelnen, deletierten HAD-Phosphatasen in der Riboflavinbiosynthese könnte nur dann getroffen werden, wenn – wie in dieser Arbeit – auch die verschiedenen kombinatorischen *Gen-Knockouts* berücksichtigt würden.

Auch das Auffinden weiterer noch unbekannter HAD-Phosphatasen könnte sich als schwierig erweisen. Eine übliche Vorgehensweise bei der Suche nach Isoenzymen ist bspw. eine Datenbank-Suche mittels des BLAST-Algorithmus. Da Sequenzvergleiche jedoch ergaben, dass mit Ausnahme der vier konservierten Sequenzmotive, die Ähnlichkeiten der gesamten Aminosäuresequenzen der Mitglieder der HAD-Superfamilie verhältnismäßig gering sind (< 15%) (Seifried et al., 2013), wird es nicht möglich sein, alle HAD-Phosphatasen mittels des BLAST-Tools zu identifizieren.

In der Arbeit von Sonja Sarge (2015a) war die HAD-Phosphatase YcsE durch eine konsekutive Anreicherung des Phosphatasepools über mehrere chromatografische Verfahren aus dem Zellextrakt eines *B. subtilis*-Stammes gewonnen und mit Hilfe der MALDI-TOF/TOF-Analyse identifiziert worden. Mit Ausnahme von zwei YcsE-homologen Proteinen, waren keine weiteren Proteine mit einer mutmaßlichen Phosphataseaktivität unter den ersten 10 Treffern der durchgeführten Mascot-Suche gefunden worden. Die beiden Phosphatasen YitU und YwtE, welche nachweislich die Dephosphorylierung von ARPP mit einer hohen enzymatischen Aktivität katalysieren, waren ebenfalls nicht unter den 202 Gesamttreffern der Mascot-Suche. Der Zellextrakt der in dieser Arbeit generierten Tripledeletionsmutante könnte nun für die erneute Anreicherung eines solchen Phosphatasepools genutzt werden.

Möglicherweise würden diesmal weitere Phosphatasen angereichert, welche in Folge des Enzymverlustes von YcsE, YitU und/oder YwtE in den Vordergrund getreten sind bzw. aufgrund epistatischer Effekte überexprimiert wurden.

Ein weiterer interessanter Forschungsansatz ergibt sich durch den Einsatz von Minimalorganismen bspw. der Gattung *Mykoplasma*, welche nur ein Viertel bis ein Fünftel der Genomgröße der meisten anderen Bakterien aufweisen und zu den kleinsten der Autoreplikation befähigten Prokaryoten zählen. Die Suche nach weiteren (unbekannten) HAD-Phosphatasen, welche ARPP hydrolysieren, wäre aufgrund der um den Faktor 5 bis 6 reduzierten Anzahl an proteincodierenden Genen in Mykoplasmen leichter realisierbar. Da Mykoplasmen für gewöhnlich über einen Riboflavintransporter verfügen und aufgrund ihres kleinen Genoms, keine eigene Riboflavinbiosynthese betreiben, liegt jedoch die Vermutung nahe, dass sie auch über keine HAD-Phosphatasen verfügen, welche die Dephosphorylierung von ARPP katalysieren können. Allerdings wurde kürzlich im Darm eines Tiefseefisches eine neue Mykoplasmen-Art (*Mycoplasma liparidae*) entdeckt, für welche erstmals gezeigt werden konnte, dass sie über

alle Schlüsselgene der Riboflavinbiosynthese einschließlich eines *ycsE*-homologen Gens verfügt (Lian et al., 2020). *M. liparidae* wäre daher ein interessanter Kandidat für die Suche nach weiteren HAD-Phosphatasen, welche an der essenziellen Dephosphorylierung von ARPP beteiligt sind.

Auch Minimalorganismen, welche keine Riboflavin-Biosynthese betreiben, könnten möglicherweise zur weiteren Aufklärung der Funktion der einzelnen HAD-Phosphatasen beitragen. Durch das künstliche Einbringen einzelner Gene in ihr Genom könnte bspw. die Expression der einzelnen HAD-Phosphatasen ohne ihr vermeintliches epigenetisches Umfeld betrachtet werden.

6 Experimenteller Teil: Materialien

6.1 Chemikalien, Puffer, Kits, Reagenzien und Materialien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in molekularbiologischer Qualität oder in der höchsten verfügbaren Reinheit eingesetzt. Eine ausführliche Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und ihrer jeweiligen Spezifikationen befindet sich im Anhang (s. Anhang 1.1, Tabelle 39). Eine Liste der verwendeten Puffer und Lösungen, einschließlich ihrer Zusammensetzung, befindet sich ebenfalls im Anhang (s. Anhang 1.2, Tabelle 41) sowie eine Liste der verwendeten Kits, Reagenzien und Materialien (s. Anhang 1.3, Tabellen 42 und 43).

6.2 Geräte

Eine Liste der verwendeten Geräte inklusive der Spezifikationen und Herstellerangaben befindet sich im Anhang (s. Anhang 1.4, Tabelle 44).

6.3 Software

In Tabelle 11 sind die in dieser Arbeit verwendeten Software-Programme aufgeführt.

Tabelle 11: Verwendete Software.

Software	Hersteller/Quelle	Beschreibung
Argus XI Version 5.0.9	Biostep GmbH (Jahnsdorf, Deutschland)	Geldokumentation
BCFtools Version 1.7- 2	(Li, 2011)	Zur automatischen Identifizierung von genomischen Variationen
Benchling Biology Software 2021	Benchling (https://benchling.com)	Darstellung, Bearbeitung und <i>Alignment</i> von DNA-Sequenzen
ChemDraw Professional Version 15.0.0.106	PerkinElmer Inc. (Waltham, USA)	Darstellung von chemischen Strukturen/Reaktionen
Circa Genomics Software	http://omgenomics.com/circa	Design von Circos Plots von genomischen Daten
CLC Genomics Workbench 11 Software	QIAGEN (Aarhus, Dänemark)	Datenprozessierung und Qualitätskontrolle der NGS-Daten
CLUSTAL O Version 1.2.4	EMBL-EBI (https://www.ebi.ac.uk/)	<i>Alignment</i> von Aminosäuresequenzen
CRISPR-ERA Version 1.2	Liu et al., 2015 (http://crispr-era.stanford.edu/)	Auswahl geeigneter crRNA-Sequenzen
Genome Compiler Version 2.2.86	Genome Compiler Corporation (Los Altos, USA)	Darstellung, Bearbeitung und <i>Alignment</i> von DNA-Sequenzen
Integrative Genomics Viewer (IGV)	(Robinson et al., 2011; Thorvaldsdóttir et al., 2013)	Zur manuellen Überprüfung der assemblierten NGS-Daten auf Variationen
Multiple Primer Analyzer	Thermo Fischer SCIENTIFIC (https://www.thermofisher.com/)	Überprüfung mehrerer Primer auf die Bildung von Primer-Dimeren
NCBI	NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)	Datenbankrecherche
PowerPoint Version 2019	Microsoft Corporation	Erstellung/Bearbeitung von Graphiken

Software	Hersteller/Quelle	Beschreibung
RNAfold Web Server 2.4.18	Gruber et al., 2008 (http://rna.tbi.univie.ac.at/)	Berechnung der minimalen freien Energie [kcal/mol] der crRNAs
Tm Calculator	Thermo Fischer SCIENTIFIC (https://www.thermofisher.com/)	Primer-Design und Kalkulation der Annealing-Temperaturen
SnapGene® Software	GSL Biotech, (https://www.snapgene.com)	Erstellung von Vektorkarten
SoftMaxPro 5.4.3 Version 2.2.0	Molecular devices Navigator™	Software für den ELISA-Plattenreader
SWIFT II Instrument Control	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

6.4 Bakterienstämme

Für die Klonierungsarbeiten und das anschließende Vervielfältigen der Plasmide wurden *E. coli* XL1-Blue Zellen verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme für die CRISPR-Cas9 induzierte Genom Editierung und daraus resultierende Mutanten sowie weitere verwendete Stämme sind ebenfalls in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Charakteristika ^a	Anwendungsbereich	Literatur/Quelle
<i>E. coli</i> XL1-Blue ¹	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Klonierung/ Plasmid Vervielfältigung	(Bullock, 1987)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) ¹	<i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B-m_B⁻) λ(DE3 [<i>lacI lac UV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i>⁺]_{K-12}(λ^S)</i>	CRISPR-Cas9 Genom Editierung in <i>E. coli</i>	(Studier & Moffatt, 1986)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>ribA</i>	BL21(DE3), <i>ribA</i> ⁻	<i>ribA</i> auxotroph	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>ribB</i>	BL21(DE3), <i>ribB</i> ⁻	<i>ribB</i> auxotroph	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Δ <i>ribC</i>	BL21(DE3), <i>ribC</i> ⁻	<i>ribC</i> auxotroph	diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> NIG1121 ²	<i>metA</i> ⁻ , <i>hisC</i> ⁻	CRISPR-Cas9 Genom Editierung in <i>B. subtilis</i>	(Sadaie & Kada, 1983)
<i>B. subtilis</i> NIG1121 Δ <i>yycE</i>	<i>B. subtilis</i> NIG1121, <i>yycE</i> ⁻	<i>yycE</i> Knockout-Mutante	diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> NIG1121 Δ <i>yitU</i>	<i>B. subtilis</i> NIG1121, <i>yitU</i> ⁻	<i>yitU</i> Knockout-Mutante	diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> NIG1121 Δ <i>ywtE</i>	<i>B. subtilis</i> NIG1121, <i>ywtE</i> ⁻	<i>ywtE</i> Knockout-Mutante	diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> NIG1121 Δ <i>yycE</i> Δ <i>yitU</i>	<i>B. subtilis</i> NIG1121, <i>yycE</i> ⁻ , <i>yitU</i> ⁻	<i>yycE</i> und <i>yitU</i> Doppeldeletions-Mutante	diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> NIG1121 Δ <i>yycE</i> Δ <i>ywtE</i>	<i>B. subtilis</i> NIG1121, <i>yycE</i> ⁻ , <i>ywtE</i> ⁻	<i>yycE</i> und <i>ywtE</i> Doppeldeletions-Mutante	diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> NIG1121 Δ <i>ywtE</i> Δ <i>yitU</i>	<i>B. subtilis</i> NIG1121, <i>ywtE</i> ⁻ , <i>yitU</i> ⁻	<i>ywtE</i> und <i>yitU</i> Doppeldeletions-Mutante	diese Arbeit
<i>B. subtilis</i> NIG1121 Δ <i>ywtE</i> Δ <i>yitU</i> Δ <i>yycE</i>	<i>B. subtilis</i> NIG1121, <i>ywtE</i> ⁻ , <i>yitU</i> ⁻ , <i>yycE</i> ⁻	<i>yycE</i> , <i>yitU</i> und <i>ywtE</i> Tripledeletions-Mutante	diese Arbeit

^a Tetr: Tetracyclin Resistenz

¹: die Stämme wurden freundlicherweise von Dr. Boris Illarionov zur Verfügung gestellt

²: der Stamm wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Markus Fischer zur Verfügung gestellt

6.5 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten und teilweise erstellten Plasmide sind in Tabelle 13 aufgelistet und näher charakterisiert. In Anhang 2 befinden sich detaillierte Vektorkarten zu den Plasmiden pCas, pTargetF und pJOE8999.

Tabelle 13: Plasmide.

Plasmid	Charakteristika ^a	Anwendungsbereich	Literatur/Quelle
pET-22b(+) ¹	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor mit T7 Promotor und Terminator, ori pBR322, Amp ^r	Bestimmung der Transformationseffizienz elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	Novagen® Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
pCas ²	<i>cas9</i> -Gen mit nativem Promotor, IPTG-induzierbarer sgRNA, die Cas9 zum ori (<i>pMB1</i>) von pTargetF führt, λ -Red Rekombinationssystem unter Kontrolle des <i>L</i> -Arabinose induzierbaren Promotors <i>P_{araB}</i> , ori repA101(Ts), Km ^r	CRISPR-Cas9-basiertes Zwei-Plasmid-System zur Genom Editierung in <i>E. coli</i>	(Y. Jiang et al., 2015)
pTargetF ²	konstitutive Expression der sgRNA, Spc ^r	CRISPR-Cas9-basiertes Zwei-Plasmid-System zur Genom Editierung in <i>E. coli</i>	(Y. Jiang et al., 2015)
pTargetF- <i>ribA</i>		<i>Knockout</i> von <i>ribA</i>	diese Arbeit
pTargetF- <i>ribA</i> -G		<i>Knockout</i> von <i>ribA</i> , modifizierte crRNA	diese Arbeit
pTargetF- <i>ribB</i> 1		<i>Knockout</i> von <i>ribB</i>	diese Arbeit
pTargetF- <i>ribB</i> 2		<i>Knockout</i> von <i>ribB</i>	diese Arbeit
pTargetF- <i>ribC</i> 1		<i>Knockout</i> von <i>ribC</i>	diese Arbeit
pTargetF- <i>ribC</i> 2		<i>Knockout</i> von <i>ribC</i>	diese Arbeit
pJOE8999 ³	<i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> Shuttle- Plasmid, ori pE194ts für <i>B. subtilis</i> , <i>cas9</i> -Gen unter Kontrolle des Mannose induzierbaren Promotors <i>P_{manP}</i> , konstitutive Expression der sgRNA mittels <i>P_{vanP}</i> , Km ^r	CRISPR-Cas9-basiertes Plasmidsystem zur Genom Editierung in <i>B. subtilis</i>	(Altenbuchner, 2016)
pJOE8999- <i>ycsE</i>		Kontroll-Plasmid ohne <i>Donor-Template</i>	diese Arbeit
pJOE8999- <i>yitU</i>		Kontroll-Plasmid ohne <i>Donor-Template</i>	diese Arbeit
pJOE8999- <i>ywtE</i>		Kontroll-Plasmid ohne <i>Donor-Template</i>	diese Arbeit
pJOE8999- <i>ycsE</i> -DT		<i>Knockout</i> von <i>ycsE</i>	diese Arbeit
pJOE8999- <i>yitU</i> -DT		<i>Knockout</i> von <i>yitU</i>	diese Arbeit
pJOE8999- <i>ywtE</i> -DT		<i>Knockout</i> von <i>ywtE</i>	diese Arbeit

^a Amp^r: Ampicillin-Resistenz, Km^r: Kanamycin-Resistenz, Spc^r: Spectinomycin-Resistenz

¹: pET-22b(+) wurde freundlicherweise von Dr. Boris Illarionov zur Verfügung gestellt

²: pCas und pTargetF wurden freundlicherweise von Sheng Yan (Addgene: pCas # 62225; pTargetF # 62226) zur Verfügung gestellt

³: pJOE8999 wurde freundlicherweise von Dr. Josef Altenbuchner (Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart) zur Verfügung gestellt

6.6 Primer und DNA-Größenmarker

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH aus Ulm oder von der Firma Integrated DNA Technologies (IDT) aus Belgien bezogen. Eine Liste der verwendeten Primer und ihre Sequenzen befinden sich im Anhang (s. Anhang 3, Tabelle 45). Für die Größenabschätzung von DNA-Fragmenten in der Agarose-Gel-elektrophorese wurde der in Abbildung 38 dargestellte DNA-Leiter Mix peqGOLD der Firma Peqlab Biotechnologie verwendet, welcher 21 dsDNA Fragmente in einem Größenbereich von 100-10.000 bp umfasst (s. außerdem Anhang 1.3, Tabelle 43). Der Größenmarker enthält zur besseren Orientierung zudem drei verstärkt auftretende Banden bei 500 bp, 1000 bp und 3000 bp.

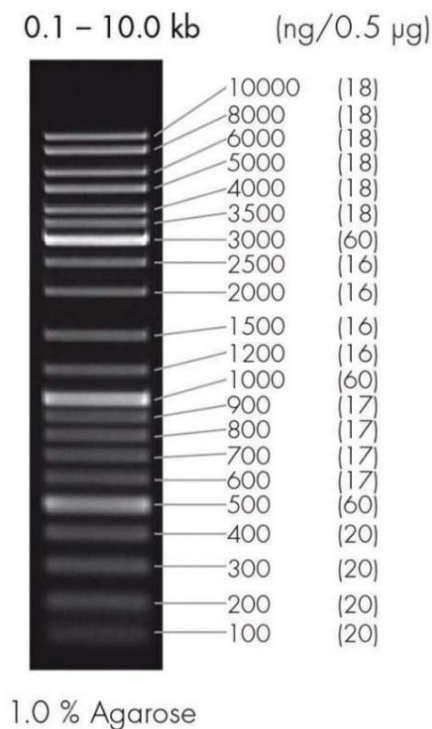


Abbildung 38: PeqGOLD DNA-Leiter Mix in einem Größenbereich von 100-10.000 bp (Peqlab Biotechnologie GmbH).

6.7 CRISPR-Cas9 Target-Sequenzen

Die in dieser Arbeit ausgewählten *Target*-Sequenzen und die resultierenden crRNA-Sequenzen für die *Knockouts* in *E. coli* und *B. subtilis* sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Ausgewählte crRNAs und ihre jeweiligen *Target*-Sequenzen.

<i>Knockout</i>	<i>Target</i> -Sequenz (3'→5') ¹	crRNA (5'→3')
<i>E. coli</i> BL21(DE3)		
<i>ribA</i> ⁻	CGGTTTGACGGTTGGGGTAC <u>CCC</u>	GCCAAACUGCCAACCCCAUG
<i>ribA-G</i> ⁻	CGGTTTGACGGTTGGGGTAC <u>CCC</u>	GCCAAACUGCCAACCCCAU
<i>ribB1</i> ⁻	TAACTAGACTACTGCGACCGT <u>TCC</u>	AUUGAUCUGAUGACGCUGGC
<i>ribB2</i> ⁻	CTGATTACTGGTACCGTGCTA <u>ACC</u>	GACUAAUGACCAUGGCACGA
<i>ribC1</i> ⁻	CCACGAAGGCACCGCGTAT <u>TGCC</u>	GGUGCUUCCGUGGCACAUA
<i>ribC2</i> ⁻	TAACCGCCTGTGAATTACAGT <u>TCC</u>	AUUGGCGGACACUUAUGUC
<i>B. subtilis</i> NIG1121		
<i>ycsE</i> ⁻	CCTGGTATAAGTTTACTAC <u>CCC</u>	GGACCAUAUCAAUGAUGU
<i>yitU</i> ⁻	AGTAGGCGTTCTGCTGTCG <u>ACC</u>	UCAUCCGCAAGACGACAGCU
<i>ywtE</i> ⁻	TGTAATTACCTAGTCCTTCG <u>GCC</u>	UGUAAUUACCUAGICCUUCG

¹: die PAM-Regionen der *Target*-Sequenzen sind unterstrichen.

6.8 DNA-Sequenzen der *Donor-Templates*

Die DNA-Sequenzen der *Donor-Templates* zur Genom Editierung in *E. coli* und *B. subtilis* sind im Anhang (s. Anhang 5, Tabelle 46) aufgeführt.

6.9 Medien/Medienzusätze und (Selektiv)-Agarplatten

Alle Medien bzw. Medienzusätze wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und die pH-Werte der verwendeten Medien mit einem digitalem pH-Meter eingestellt. Die verwendeten Elektroporationsmedien wurden mit Reinstwasser angesetzt. Alle Medien wurden, wenn möglich, bei 121 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert (Autoklavierbedingungen s. Anhang 6.1), um sterile Lösungen zu erhalten. Hitzeempfindliche Lösungen wurden mittels Spritzenfilter (Porengröße 0,45 µm) steril filtriert. Die abgekühlten Medien (unter 50°C) wurden gemäß den Antibiotikaresistenzen der entsprechenden Plasmide (s. 6.5, Tabelle 13) mit Antibiotikum versetzt. In dieser Arbeit wurde unter anderem das Nährmedium nach Luria Bertani (LB-Medium) verwendet (Sambrook & Russell, 2001).

Für die Herstellung von Agarplatten wurde dem LB-Medium zusätzlich Agar bzw. dem M9-Medium Agarose hinzugegeben. Das Medium wurde in Petrischalen gegossen und die ausgehärteten Agarplatten bei 4-8 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die zur Herstellung

der Medien verwendeten Lösungen sind in Anhang 1.2 aufgeführt. Die Zusammensetzungen der verwendeten (Fest)-Medien und Medienzusätze werden in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Für die Kultivierung, Transformation und Lagerung von Bakterien verwendete Medien, Medienzusätze und (Selektiv)-Agarplatten.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anwendungsbereich
Medien/Medienzusätze und (Selektiv)-Agarplatten für die Anzucht und Stammhaltung		
LB-Medium	15 g/L Caseinhydrolysat 7,5 g/L Hefeextrakt 7 g/L NaCl 1 Plättchen Natriumhydroxid (pH 7,4)	Zur Anzucht von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i> unter Standardbedingungen
	für Agarplatten zusätzlich 16 g Agar-Agar	
	autoklavieren	
LB-Glycerin-Medium	50% (v/v) LB-Medium 50% (v/v) Glycerin	Zur Stammhaltung von <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i> bei -80°C
	autoklavieren	
Minimal-Medium (M9)	12 g/L Na ₂ HPO ₄ 10 g/L Caseinhydrolysat 10 g/L NaCl 3 g/L KH ₂ PO ₄	Zur Anzucht von <i>B. subtilis</i> in einem Riboflavin-freien Nährmedium bzw. auf Riboflavin-freien Agaroseplatten
	Ad 880 mL Wasser	
	für Agarplatten zusätzlich 13 g Agarose	
	autoklavieren	
	Zugabe von: 40 mL (50 g/L) NH ₄ Cl 10 mL (6 g/10 mL) Glucoselösung 4 mL (5,6 g/L) CaCl ₂ -Lösung 4 mL Vitamin-Konzentrat (250x) 2 mL (25 g/L) MgSO ₄ -Lösung 1 mL Spurenelementkonzentrat (1000x)	
	Lösungen separat autoklavieren (steril filtrieren)	
Vitaminkonzentrat (250x ohne Riboflavin)	100 mg/L Cyanocobalamin 20 mg/L Pyridoxamin-Hydrochlorid 20 mg/L <i>p</i> -Aminobenzoesäure 20 mg/L Calciumpantothenat 15 mg/L Nicotinsäureamid 10 mg/L Thiamin-Hydrochlorid 10 mg/L Folsäure 5 mg/L Biotin	Zur Herstellung des M9-Minimal-Mediums
	unter Erwärmen lösen, steril filtrieren	
Spurenelementkonzentrat (1000x)	50 g/L EDTA 13,5 g/L MnCl ₂ * 4 H ₂ O 8,5 g/L FeSO ₄ * 7 H ₂ O 0,9 g/L ZnSO ₄ * 7 H ₂ O 0,2 g/L CuCl ₂ * 2 H ₂ O 0,2 g/L NiCl ₂ * 6 H ₂ O 0,1 g/L CoCl ₂ * 6 H ₂ O 0,1 g/L H ₃ BO ₃	Zur Herstellung des M9-Minimal-Mediums

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anwendungsbereich
Riboflavin-Suspension	pH Wert 7,4 mit 50 % NaOH einstellen, autoklavieren 100 mM Riboflavin Auf 90°C erhitzen	Suspension zur Supplementierung von Nährmedien für die Anzucht von Riboflavin-auxotrophen <i>E. coli</i> -Mutanten
Antibiotikallösungen (1000x)	25 mg/L Kanamycin (<i>E. coli</i>) 5 mg/L Kanamycin (<i>B. subtilis</i>) 30 mg/L Spectinomycin (<i>E. coli</i>) Lösungen steril filtrieren	Zur Selektion von transformierten Plasmiden
Medien/Medienzusätze und Lösungen für die Herstellung von elektrokompetenten <i>B. subtilis</i> Zellen		
LBS-Medium	LB-Medium mit 0,5 M <i>D</i> -Sorbitol getrennt autoklavieren	Anzuchtmedium
Glycin-Stammlösung (10x)	64 g/L Glycin steril filtrieren	Zusatz zum Anzuchtmedium
Tween 80-Stammlösung (10x)	5 g/L Tween 80 erwärmen und steril filtrieren	Zusatz zum Anzuchtmedium
<i>DL</i> -Threonin-Stammlösung (10x)	102 g/L <i>DL</i> -Threonin steril filtrieren	Zusatz zum Anzuchtmedium im Rahmen der Optimierung der Elektroporationseffizienz
SMGG-Medium (Elektroporationsmedium)	100 mL/L Glycerin 100 g/L Glycin-Betain 91 g/L <i>D</i> -Mannitol 91 g/L <i>D</i> -Sorbitol autoklavieren	Zum Waschen der Zellen
LBSM-Medium (<i>Recovery</i> -Medium)	LB-Medium mit 0,5 M <i>D</i> -Sorbitol 0,5 M <i>D</i> -Mannitol getrennt autoklavieren	Zur Aufnahme der Zellen nach der Elektroporation
Medien/Medienzusätze und Lösungen für die Herstellung von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen		
Elektroporationsmedium	100 mL/L Glycerin autoklavieren	Zum Waschen der Zellen
SOB-Medium (<i>Recovery</i> -Medium)	10 g/L Caseinhydrolysat 5 g/L Hefeextrakt 1,2 g/L MgSO ₄ 1 g/L MgCl ₂ 0,5 g/L NaCl 0,2 g/L KCl autoklavieren	Zur Aufnahme der Zellen nach der Elektroporation

7 Experimenteller Teil: Methoden

7.1 Mikrobiologische Methoden

Die zur Anzucht, Stammhaltung, Zellernte und Herstellung elektrokompetenter Zellen verwendeten Medien und Medienzusätze sind in Abschnitt 6.9, Tabelle 15 aufgeführt. Die verwendeten Lösungen befinden sich in Anhang 1.2.

7.1.1 Anzuchtverhalten und Stammhaltung

Übernachtkulturen

Zur Herstellung von Übernachtkulturen wurden jeweils 50 mL LB-Medium mit 20 µL der Dauerkultur des entsprechenden Stammes oder einer Bakterienkolonie von einer LB-Agar-Platte beimpft und bei 27 °C und 150 rpm über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert. Für die Kultur von Zellen, die beispielsweise nach einer erfolgten Klonierung und Transformation in einer Kolonie-PCR (s. 7.2.7.1.) positiv auf die entsprechende Plasmid-Modifikation getestet wurden, wurde dem LB-Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Zur Kultivierung Riboflavin-auxotropher *E. coli*-Mutanten wurde das LB-Medium mit 500 µL einer 100 mM Riboflavin-Suspension angereichert.

Hauptkulturen

Für die Herstellung von Hauptkulturen wurde frisches LB-Medium in einem Volumenverhältnis von 1:100 mit der Übernachtkultur überimpft und dieses im Schüttelinkubator bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. In Abhängigkeit der Kultur wurden dem Medium Antibiotika und/oder Riboflavin hinzugegeben. Die Zelldichte im Kulturmedium wurde in regelmäßigen Abständen durch eine photometrische Bestimmung des OD-Wertes bei 600 nm gegenüber unbeimpftem LB-Medium als Blindwert kontrolliert. In Abhängigkeit der weiteren Verwendung der Zellen wurden diese bis zum Erreichen eines bestimmten Zellwertes inkubiert.

Stammhaltung

Die kurzzeitige Lagerung der *B. subtilis*- und *E. coli* Stämme erfolgte auf LB-Nährböden bei 4 °C. Die Herstellung der Nährböden erfolgte unter Verwendung des in Abschnitt 6.9, Tabelle 15 aufgeführten LB- oder M9-Mediums. Hierzu wurden dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 16 g/L Agar-Agar hinzugefügt und dem M9-Minimalmedium 13 g/L Agarose. Die langfristige Lagerung der Bakterienstämme erfolgte in Form von Dauerkulturen. Für die Herstellung einer Dauerkultur wurde eine Hauptkultur bis zu einem OD-Wert von 1,0-1,5 kultiviert. Anschließend wurden 500 µL der Übernachtkultur mit 500 µL LB-Glycerin-Medium gemischt und die erhaltende Zellsuspension in einem Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert.

Erstellen einer Wachstumskurve für *B. subtilis* NIG1121

Zur Bestimmung der Wachstumsphasen und des besten Erntezeitpunktes des verwendeten Stammes *B. subtilis* NIG1121 für die spätere Elektroporation (s. 7.1.3) wurde eine Wachstumskurve erstellt. Die Hauptkultur wurde wie oben beschrieben hergestellt und bei 30 °C im Schüttelinkubator bebrütet. Die Zelldichte im Kulturmedium wurde in regelmäßigen Abständen innerhalb eines Zeitraumes von 8 h durch eine photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm gegenüber unbeimpftem LB-Medium als Blindwert kontrolliert. Die Ergebnisse der Messungen sowie die resultierende Wachstumskurve sind in Anhang 11 zusammengefasst.

7.1.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen und Elektroporation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der in Abschnitt 6.4, Tabelle 12 aufgeführte Stamm *E. coli* XL1-Blue für Klonierungsarbeiten und für eine anschließende Vervielfältigung der Plasmide mittels Transformation verwendet. Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) (Abschnitt 6.4, Tabelle 12) wurde zur Genom Editierung verwendet. Hierfür mussten zunächst elektrokompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen ohne Plasmid hergestellt werden. Diese wurden mit dem Plasmid pCas transformiert und anschließend erneut elektrokompetent gemacht. Die Herstellung der elektrokompetenten *E. coli*-Zellen der beiden Stämme erfolgte dabei bis auf geringfügige Modifizierungen nach der Methode von Dower et al. (1988).

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zunächst wurde wie in Abschnitt 7.1.1 beschrieben eine Übernachtskultur des jeweiligen *E. coli*-Stammes hergestellt. Am nächsten Tag wurden 500 mL frisches LB-Medium mit der Übernachtskultur überimpft. Die Hauptkultur wurde bis zum Erreichen eines OD-Wertes von 0,5-0,7 im Schüttelinkubator inkubiert und anschließend für 15 min auf Eis gestellt.

Bei der Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, die das Plasmid pCas enthielten, wurde den Vor- und Hauptkulturen zusätzlich das Antibiotikum Kanamycin (Endkonzentration: 25 µg/mL) und nach dem Erreichen eines OD-Wertes von 0,3-0,4 der Hauptkultur L-Arabinose-Lösung (Endkonzentration: 10 mM) hinzugegeben. Die Arabinose diente der Induktion des Promotors P_{araB} und somit der Expression der Lambda Red Gene auf dem Plasmid pCas. Die Hauptkultur wurde bis zum Erreichen eines OD-Wertes von 0,6-0,7 im Schüttelinkubator inkubiert und anschließend für 15 min auf Eis gestellt.

Die Zellen wurden in sterile Zentrifugenbecher überführt und mittels Zentrifugation (4500 g, 10 min, 4 °C) geerntet. Anschließend wurde das Zellpellet in 400 mL eisgekühltem Elektroporationsmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert (4500 g, 10 min, 4 °C). Dieser Zellwaschvorgang wurde jeweils unter Verwendung von 200 mL und 8 mL Elektroporationsmedium wiederholt. Zu besserer Handhabung wurde die 8 mL-Zellsuspension in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Nach den drei Waschschrritten wurde das Zellpellet in 1,5 mL

Elektroporationsmedium resuspendiert, in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Elektroporation

Die Transformation mit Plasmid-DNA wurde unter Verwendung von 50 µL elektrokompetenter Zellen, welche auf Eis aufgetaut wurden, durchgeführt. Der Zellsuspension wurden 1 ng Plasmid-DNA bzw. 5 µL eines Ligationsansatzes (s. 7.2.5) hinzugefügt und die Suspension durch Umschwenken vorsichtig gemischt. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine 1 mm Elektroporationsküvette transferiert, die in einen Elektroporator gegeben und mit Hochspannungsimpulsen (1700 V, 5 ms Dauer) behandelt wurde. Die Zellen wurden aus der Elektroporationsküvette in 1 mL eiskaltem SOB-Medium überführt und für 1 h bei 150 rpm und 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 g, 7 min, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 0,1 mL SOB-Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf einer LB-Agarplatte mit geeigneten Antibiotika ausplattiert. Die LB-Agarplatte wurde für 12-16 h bei 37 °C im Brutschrank bebrütet.

Die Transformation von *E. coli*-Zellen mit dem Plasmid pCas erfolgte analog zu dieser Vorgehensweise. Die Zellen wurden jedoch aufgrund des Temperatur-empfindlichen Replikationsursprungs von pCas bei 30 °C inkubiert.

Bestimmung der Transformationseffizienz elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Die Transformationseffizienz beschreibt die Anzahl der Kolonien bildenden Bakterieneinheiten (*colony forming units*, cfu) nach einer Transformation pro eingesetzte Menge an Plasmid-DNA in Mikrogramm. Um die Kompetenz der Bakterienzellen zu bestimmen, wurden je 1 µL einer 1 ng, 0,1 ng und 0,01 ng Plasmid-DNA-Lösung (pET-22b(+)) mit 50 µL kompetenten *E. coli*-Zellen analog zu der oben beschriebenen Durchführung transformiert. Anschließend wurden die Zellen auf Ampicillin-Selektivagar ausplattiert und bei 37 °C über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt und die Transformationsraten für 1 µg DNA des pET-22b(+)-Vektors berechnet.

7.1.3 Herstellung elektrokompetenter *B. subtilis*-Zellen und Elektroporation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der in Abschnitt 6.4, Tabelle 12 aufgeführte Stamm *B. subtilis* NIG1121 zur Genom Editierung verwendet. Die Herstellung der elektrokompetenten *B. subtilis*-Zellen erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Meddeb-Mouelhi et al., 2012 und Zhang et al., 2015.

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zunächst wurde wie in Abschnitt 7.1.1 beschrieben eine Übernachtskultur des *B. subtilis* Wildtyp-Stammes bzw. einer *B. subtilis* Deletionsmutante hergestellt. Die Kultur der *B. subtilis*-Zellen erfolgte abweichend zu den Angaben in Abschnitt 7.1.1 in LB-Sorbitol-Medium. Am nächsten Morgen wurden 10 mL aus der Übernachtskultur in 500 mL frisches LBS-Medium überführt und im Schüttelkolben bei 150 rpm und 30 °C bebrütet. Bei Erreichen eines OD600-Wertes von 0,5 wurden der Kultur die Zellhüllen-schwächenden Substanzen Glycin und Tween 80 aus sterilen Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 0,64% bzw. 0,05% hinzugegeben. Die Zellkultur wurde unter den gleichen Bedingungen weiter inkubiert, bis die Kultur einen OD600-Wert von 0,85 erreichte. Die Zellkultur wurde für 20 min auf Eis gekühlt und anschließend für 10 min bei 3500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 200 mL sterilem, eiskaltem Elektroporationsmedium resuspendiert und die Zellsuspension für 10 min bei 4500 g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Zellwaschvorgang wurde zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 mL Elektroporationsmedium resuspendiert, in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Elektroporation

Die Elektroporation von *B. subtilis*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte ausschließlich zur CRISPR-Cas9 vermittelten Genom Editierung und wird im entsprechenden Abschnitt (s. 7.2.9.2) beschrieben.

Bestimmung der Transformationseffizienz elektrokompetenter *B. subtilis*-Zellen

Die Transformationseffizienz von elektrokompetenten *B. subtilis*-Zellen wurde analog zu der unter 7.1.2 beschriebenen Bestimmung der Transformationseffizienz von *E. coli*-Zellen durchgeführt, jedoch unter Berücksichtigung des Elektroporationsprotokolls von *B. subtilis* und unter Verwendung von 50 ng Plasmid-DNA (pJOE8999).

7.1.4 Anzucht, Zellernte und Aufschluss von *B. subtilis* Zellen zur Bestimmung der intra- und extrazellulären Riboflavingehalte

Anzucht und Zellernte

Zur Bestimmung der Riboflavin-Konzentration von *B. subtilis* Wildtyp-Zellen und *B. subtilis* Deletionsmutanten wurden zunächst Übernachtskulturen in LB-Medium hergestellt (s. Abschnitt 7.1.1). Am nächsten Morgen wurden die Übernachtskulturen bei 4000 g und 20 °C zentrifugiert. Um mögliche Spuren von Riboflavin aus den bakteriellen Zellpellets zu entfernen, wurden die Überstände verworfen und die Zellpellets wurden in 50 mL steriler Kochsalzlösung resuspendiert. Dieser Zellwaschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden jeweils 0,4 mL aus den gereinigten Übernachtskulturen in 200 mL M9-Minimalmedium überführt und in Schüttelkolben (150 rpm) bei 37 °C bis zum Erreichen eines OD600-Wertes von 0,4 inkubiert.

Je 200 mL der Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (4000 g, 20 min, 4 °C). Von den Überständen wurden jeweils 50 mL in Zentrifugenröhrchen überführt und lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. Die erhaltenen Zellpellets wurden in 50 mL steriler Kochsalzlösung resuspendiert. Dieser Zellwaschvorgang wurde zweimal wiederholt, wobei nach dem letzten Zentrifugationsschritt das Nassgewicht der Zellpellets bestimmt wurde. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Zellaufschluss mittels Ultraschalls

Nach dem Auftauen der Zellpellets wurden diese ausgehend von ihrem Nasszellgewicht in der fünffachen Menge Reinstwasser resuspendiert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators wurden die Zellen in fünf Durchgängen bei einer Intensität von 30-40% und einer Dauer von 30 s aufgeschlossen. Zwischen den Durchgängen wurden die Proben für 30 s auf Eis gekühlt, um eine zu starke Erwärmung der Suspension zu vermeiden.

Nach den Zellaufschlüssen wurden die Zelltrümmer mittels Zentrifugation (14 000 g, 5 min, 4 °C) abgetrennt und die Überstände bis zur weiteren Analyse mittels ELISA-Methode (s. Abschnitt 7.2.12) bei -20 °C gelagert.

Aufkonzentrieren der Überstände mittels Rotationsverdampfer

Die Zellkultur-Überstände wurden vor der Bestimmung des Riboflavingehaltes mittels eines Rotationsverdampfers eingeeengt. Hierzu wurden jeweils 10 mL eines Zellüberstandes in einen 20 mL Rundkolben überführt und im Wasserbad unter Rotation auf 60 °C erhitzt. Die Rundkolben wurden mit Alufolie umwickelt, um das in den Überständen enthaltene Riboflavin vor der Lichteinwirkung zu schützen. Auf Grund der Temperaturstabilität von Riboflavin wurde keine Verringerung des Riboflavingehaltes in den Proben erwartet. Die Zellüberstände wurden bis zum Erreichen eines Volumens von 1 mL eingeeengt, wodurch eine Aufkonzentrierung um den Faktor 10 erreicht werden konnte. Die Konzentrate der Überstände wurden in 2 mL-Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

7.1.5 Wachstumstests der Deletionsmutanten auf Agaroseplatten

Zur Überprüfung der mittels des CRISPR-Cas9 Systems erzeugten Deletionsmutanten auf eine Riboflavin-Auxotrophie, wurden diese jeweils auf LB-Agarplatten ohne und mit Zusatz von Riboflavin (100 mg/L) (*E. coli*-Mutanten) oder im Falle der *B. subtilis*-Mutanten auf M9-Minimalagarplatten und LB-Agarplatten ausplattiert. Für den negativen Wachstumstest wurden M9-Agarplatten verwendet, welche mit Hilfe von Agarose hergestellt wurden, um sicherzustellen, dass kein Riboflavin auf den Nährböden enthalten ist. Die verwendeten Agarplatten und Zusätze sind in Abschnitt 6.9, Tabelle 15 aufgeführt. Das Ausplattieren der *B. subtilis*-Zellen erfolgte unter Verwendung von jeweils 90 µL Zellsuspension der Verdünnungsstufen 10⁻²,

10^{-4} und 10^{-6} . Die Agarplatten wurden bei 37 °C (*B. subtilis*) bzw. 30 °C (*E. coli*) über Nacht im Brutschrank bebrütet.

7.2 Molekularbiologische Methoden

7.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini-Kits (Omega Bio-tek, USA) und wird in Anhang 6.2 beschrieben.

7.2.2 Aufreinigung von DNA aus präparativen PCR-Ansätzen, Restriktionsverdau und Ligation

PCR-Fragmente, welche in einem präparativem PCR-Ansatz vervielfältigt wurden und der Modifizierung von Plasmid-DNA dienen (s. 7.2.7.2) oder dessen Sequenzen mittels SANGER-Sequenzierung überprüft werden sollten, wurden mit dem Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (New England Biolabs GmbH, Deutschland) aufgereinigt. Das Kit wurde ebenfalls für die Aufreinigung von DNA aus dem Restriktionsverdau (s. 7.2.5) und der Ligation (s. 7.2.6) verwendet. Die Aufreinigung der DNA erfolgte nach der Anleitung des Herstellers und wird in Anhang 6.3 beschrieben.

7.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Mittels Agarose-Gelelektrophorese kann neben der Trennung und Identifizierung von linearen DNA-Fragmenten und zirkulärer Plasmid-DNA auch die Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren durchgeführt werden. Eine präparative Agarosegelelektrophorese (s. 7.2.8) mit anschließender Isolierung der DNA aus der Agarosegel-Matrix wurde für PCR-Fragmente, welche im Rahmen einer OE-PCR (s. 7.2.7.5) generiert wurden und für Zwischen- und Endprodukte der SDM-PCR (s. 7.2.7.4) vorgenommen. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des PeqGOLD Gel Extraktions Kits (Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland) und wird in Anhang 6.4 beschrieben.

7.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die Quantifizierung von Plasmid-DNA, welche aus Bakterienzellen isoliert wurde (s. 7.2.1), wurde die photometrische Absorptionmessung mittels UV/Vis Spektrophotometer genutzt. Zur Konzentrationsbestimmung von DNA im ng/μL-Bereich, wie sie bei präparativen PCR-Methoden zu erwarten sind, wurde die fluorometrische Emissionsmessung mittels Quantus™ Fluorometer verwendet. Die hochempfindliche Fluoreszenzdetektion ermöglicht die Quantifizierung von dsDNA ab einer Konzentration von 0,01 ng/μL.

7.2.4.1 Photometrische Absorptionsmessung

Die photometrische Konzentrationsbestimmung erfolgt über die Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette. Hierzu wurden 400 µL Reinstwasser in die Quarzküvette gegeben und als Blindwert (BW) bei 260 nm gemessen. Anschließend wurden 8 µL der zu quantifizierenden DNA-Lösung hinzugegeben und durch mehrmaliges Umschwenken der Küvette gemischt. Es erfolgte die photometrische Messung bei 260 nm und die Berechnung der DNA-Konzentration über die gemessene optische Dichte, den Verdünnungsfaktor und einen stoffspezifischen Multiplikationsfaktor für dsDNA. Die Berechnung der Konzentration ist in Gleichung 1 dargestellt.

Gleichung 1: $c = (OD_{260}(Probe) - OD_{260}(BW)) \cdot V \cdot M$

Variable	Beschreibung [Einheit]
c	Konzentration [ng/µL]
OD_{260}	optische Dichte bei 260 nm
V	Verdünnungsfaktor (hier: 51)
M	Multiplikationsfaktor (bei dsDNA: 50)

7.2.4.2 Fluorometrische Emissionsmessung

Die fluorometrische Emissionsmessung erfolgte mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes und unter Verwendung des Quantus™ Fluorometers. Zunächst wurde der Fluoreszenzfarbstoff QuantiFluor® 1:200 mit 1x TE-Puffer verdünnt. Anschließend wurden 2 µL der zu quantifizierenden DNA-Lösung mit 98 µL 1x TE-Puffer und 100 µL der verdünnten QuantiFluor®-Lösung in ein 0,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben, mittels eines Vortex-Mischers gemischt und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Als Blindwert wurde parallel ein Reaktionsansatz bestehend aus 100 µL 1x TE-Puffer und 100 µL verdünnter QuantiFluor®-Lösung hergestellt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Lösungen bei einer Extinktion von 460 nm und einer Emission von 515-575 nm gemessen.

7.2.5 Sequenzspezifische Restriktion von Plasmid-DNA

Die Restriktion von Plasmid-DNA erfolgte zum einen nach der SDM-PCR (s. 7.2.7.4) um die lineare Plasmid-DNA von pTargetF bzw. pJOE8999 wieder zu zirkularisieren und zum anderen im Rahmen einer Klonierung, um die mit Hilfe der OE-PCR generierten *Donor-Templates* (s. 7.2.7.5) in das jeweilige pJOE8999-Plasmid einzufügen. Zudem wurde das in dieser Arbeit hergestellte crRNA/tracrRNA-Insert (s. 7.2.7.3) mit Hilfe einer Klonierung in das Plasmid pTargetF-*ribA* eingebracht. Die Zusammensetzung der entsprechenden Restriktionsansätze wird in den Tabellen 16-18 aufgeführt. Die verwendeten Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer sind in Anhang 1.3, Tabelle 43 aufgeführt.

Tabelle 16: Restriktionsansatz für die Zirkularisierung der Plasmid-DNA von pTargetF und pJOE8999 nach der SDM-PCR.

Reagenz	Volumen [μL]
Reinstwasser	59
CutSmart® Puffer (10x)	10
PCR-Produkt (lineare Plasmid DNA)*	30
SpeI-Restriktionsenzym	1

* die DNA-Konzentration betrug zwischen 5-10 ng/ μL

Tabelle 17: Restriktionsansätze der pJOE8999-Plasmide und der *Donor-Templates* für die Klonierung.

Reagenz	Volumen [μL]
Reinstwasser	59
CutSmart® Puffer (10x)	10
Plasmid-DNA pJOE8999 bzw. <i>Donor-Template-DNA</i> *	30
SmaI-Restriktionsenzym	0,5
Sall-HF-Restriktionsenzym	0,5

* die DNA-Konzentration betrug zwischen 50-200 ng/ μL

Tabelle 18: Restriktionsansätze für das Plasmid pTargetF und das crRNA/tracrRNA-Insert für die Klonierung.

Reagenz	Volumen [μL]
Reinstwasser	79 bzw. 48
CutSmart® Puffer (10x)	10
Plasmid-DNA pTargetF bzw. crRNA/tracrRNA-Insert*	9 bzw. 40
EcoRI-Restriktionsenzym	1
SpeI-Restriktionsenzym	1

* die DNA-Konzentration betrug zwischen 20-100 ng/ μL

Die Restriktionsansätze wurden für 5 sec bei 10 000 g zentrifugiert und für 1 h bei 37 °C (Restriktionsansätze mit SpeI bzw. SpeI und EcoRI) oder für 2 h bei 27 °C (Restriktionsansätze mit Sall und SmaI) inkubiert. Anschließend wurden die Restriktionsansätze wie unter 7.2.2 beschrieben aufgereinigt und in 20 μL Reinstwasser eluiert (Restriktionsansätze Tabelle 16 und 17). Die Restriktionsansätze für die Klonierung des crRNA/tracrRNA-Inserts in pTargetF (s. Tabelle 18) wurden mittels einer präparativen AGE (s. 7.2.8) und der unter 7.2.3 beschriebenen Gelextraktion aufgereinigt und in 40 μL Reinstwasser eluiert. Die gereinigten Restriktionsansätze wurden zur Ligation eingesetzt.

7.2.6 Ligation von Plasmid-DNA

Die Ligation der in Abschnitt 7.2.5 beschriebenen Restriktionsprodukte wurde in 200 μL -Ligationsansätzen durchgeführt. Die Ligation der verdauten *Donor-Templates* bzw. des crRNA/tracrRNA-Inserts mit der entsprechenden verdauten Plasmid-DNA (pJOE8999 bzw. pTargetF) erfolgte in einem molaren Verhältnis von 3:1 bis 5:1. Die Zusammensetzung der

Ligationsansätze wird in den Tabellen 19-21 aufgeführt. Die Spezifikationen der verwendeten T4 DNA-Ligase und der Reaktionspuffer sind in Anhang 1.3, Tabelle 43 aufgeführt.

Tabelle 19: Ligationsansatz für die Zirkularisierung der Plasmid-DNA von pTargetF und pJOE8999 nach der SDM-PCR.

Reagenz	Volumen [μL]
Reinstwasser	159,5
T4 DNA-Ligase Puffer (10x)	20
PCR-Produkt aus dem Verdau (lineare Plasmid DNA)*	20
T4 DNA-Ligase	0,5

* die DNA-Konzentration betrug zwischen 20-40 ng/ μL

Tabelle 20: Ligationsansatz für die Insertion der *Donor-Templates* in die pJOE8999-Plasmide.

Reagenz	Volumen [μL]
Reinstwasser	159
T4 DNA-Ligase Puffer (10x)	20
Plasmid-DNA pJOE8999 aus dem Verdau*	15
<i>Donor-Template</i> -DNA aus dem Verdau**	5
T4 DNA-Ligase	1

* die DNA-Konzentration betrug zwischen 20-30 ng/ μL

** die DNA-Konzentration betrug zwischen 30-40 ng/ μL

Tabelle 21: Ligationsansatz für die Insertion des crRNA/tracrRNA-Inserts in das Plasmid pTargetF.

Reagenz	Volumen [μL]
Reinstwasser	149
T4 DNA-Ligase Puffer (10x)	20
Plasmid-DNA pTargetF aus dem Verdau*	25
crRNA/tracrRNA-Insert aus dem Verdau**	5
T4 DNA-Ligase	1

* die DNA-Konzentration betrug ca. 3 ng/ μL

** die DNA-Konzentration betrug ca. 1 ng/ μL

Die Ligationsansätze wurden über Nacht in einem 1 L-Wasserbad (20 °C) im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Zum Entfernen der Ligase und des Reaktionspuffers wurden die Ansätze anschließend wie unter 7.2.2 beschrieben aufgereinigt und in 20 μL Reinstwasser eluiert. Die aufgereinigten Produkte der Ligationsansätze wurden in elektrokompetente *E. coli* XL1-Zellen transformiert (s. 7.1.2) und der Erfolg der Klonierung mittels einer Kolonie-PCR (s. 7.2.7.1) überprüft.

7.2.7 Methoden der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In dieser Arbeit wurden je nach Anwendungszweck zwei verschiedene Polymerasen verwendet. Die *Taq*-DNA-Polymerase wurde für analytische PCR-Methoden, wie beispielsweise der Kolonie-PCR (s. 7.2.7.1) verwendet. Für präparative PCR-Methoden wie der SDM-PCR (s. 7.2.7.4) oder der OE-PCR (s. 7.2.7.5), bei denen die Sequenzintegrität der PCR-Amplifikate entscheidend war, wurde die Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase verwendet, welche durch ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität eine Korrekturlesefunktion und eine im Vergleich zur *Taq*-DNA-Polymerase um den Faktor 50 geringere Fehlerrate aufweist.

7.2.7.1 Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR wird als Ausgangssubstanz anstelle eines reinen DNA-*Templates* biologisches Material in Form einer Bakterienkolonie verwendet. Es ist eine Amplifikation sowohl der chromosomalen DNA als auch der Plasmid-DNA der Bakterienkolonie möglich. Die Kolonie-PCR wurde in dieser Arbeit verwendet um den Erfolg einer Plasmid-Klonierung (s. 7.2.5 und 7.2.6) nach erfolgter Transformation zu überprüfen und um Bakterienzellen nach einem erfolgten CRISPR-Cas9 Event (s. 7.2.9) auf die gewünschte Mutation hin zu untersuchen. Hierzu wurde die DNA der Bakterienkolonie unmittelbar vor der PCR mit Hilfe eines Zellaufschlusses freigesetzt. Die Aufschlusslösung variierte je nach aufzuschließendem Zell-Material. In dieser Arbeit wurden für den Zellaufschluss von *E. coli*-Bakterien, TE-Puffer und für *B. subtilis*-Bakterien das Y-PER® Yeast Protein Extraktionsmittel (s. Anhang 1.2, Tabelle 41) verwendet.

Zellaufschluss

Es wurden 100 µL TE-Puffer bzw. Y-PER® Yeast Protein Extraktionsmittel als Lyse-Puffer in ein 500 µL-Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers eine geringe Menge Zellmaterial der gewünschten Kolonie von einer Agarplatte aufgenommen und in dem Lyse-Puffer suspendiert.

Um neues Zellmaterial der entsprechenden Kolonie zu erhalten, wurde der Zahnstocher zusätzlich auf einer LB-Agarplatte (gegebenenfalls mit entsprechenden Antibiotika) abgestrichen und die Agarplatte für 12-18 h bei 37 °C bzw. 30 °C (*E. coli*-Zellen mit dem Plasmid pCas) inkubiert. Die Bakterienzellen in den Zellaufschlüssen wurden unter Verwendung eines Vortexers für 10 s suspendiert und bei einer Temperatur von 98 °C für 5 min (*E. coli*) bzw. 10 min (*B. subtilis*) aufgeschlossen.

Die Zelltrümmer wurden bei der nachfolgenden Zentrifugation für 5 min bei 12 000 g abgetrennt und 1 µL des Überstandes für den PCR-Ansatz als Template verwendet.

PCR-Reaktion

Die Kolonie-PCR wurde in 50 µL Reaktionsansätzen durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermix ist in Tabelle 22 aufgeführt. Die entsprechenden Primerpaare werden in Anhang 3,

Tabelle 45 aufgeführt. Es wurden je 49 μL des Mastermix in ein 0,2 mL-PCR-Reaktionsgefäß gegeben und mit je 1 μL des Überstandes eines Zellaufschlusses bzw. als Blindwert mit 1 μL Reinstwasser versetzt. Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 23 aufgeführt. Die Spezifikationen der verwendeten Reagenzien sind in Anhang 1.3, Tabelle 43 angegeben. Im Anschluss an die PCR wurden die erhaltenen Amplifikate mittels 1-2%iger Agarosegele elektrophoretisch aufgetrennt (s. 7.2.8) und mit Hilfe des DNA-Größenmarkers und den erwarteten Fragmentlängen verglichen.

Tabelle 22: Mastermix der Kolonie-PCR.

Komponente	Volumen [$\mu\text{L}/50 \mu\text{L}$]	Konzentration im Ansatz
Taq-Puffer (10x)	5	1x
dNTPs (je 2,5 mM)	1	0,05 mM
Taq-DNA-Polymerase (10 U/ μL)	0,1	1 U/50 μL
Forward-Primer (100 μM)	0,5	1 μM
Reverse-Primer (100 μM)	0,5	1 μM
Reinstwasser	ad 50	-

Tabelle 23: Temperaturprogramm der Kolonie-PCR.

Wiederholungen	Temperaturzyklen	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	94	2:00
30	Denaturierung	94	0:30
	Annealing	X*	0:15
	Elongation	72	0:30-1:30**
1	Terminale Elongation	72	7:00
1	Kühlphase	4	∞

* Die optimale Annealing-Temperatur der jeweiligen Primer wurde mit Hilfe des Tm Calculators von Thermo Fisher (s. 6.3, Tabelle 11) anhand der Sequenzen und Konzentrationen der verwendeten Primer und der Polymerase berechnet.

**Die Dauer der Elongation wurde in Abhängigkeit der zu erwartenden Fragmentgröße des PCR-Produktes und der Lesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase (hier: 60 sec/1 kb) angepasst.

7.2.7.2 Präparative PCR zur Amplifizierung genomischer Bakterien-DNA

Die DNA der modifizierten Genabschnitte der *Knockout*-Mutanten, welche in der Kolonie-PCR positiv getestet wurden, musste zunächst mit Hilfe einer präparativen PCR vervielfältigt werden, um die jeweiligen Deletionen mit Hilfe der SANGER-Sequenzierung (s. 7.2.10) verifizieren zu können. Ebenso wurde die präparative PCR-Methode verwendet, um die nach der NGS-Sequenzierung (s. 7.2.11) verbliebenen Lücken in der Sequenz von *B. subtilis* NIG1121 durch die Amplifizierung und nachfolgende SANGER-Sequenzierung der entsprechenden Abschnitte (DNA-Fragmente) zu schließen. Hierzu mussten mit Hilfe einer präparativen PCR, die analog zu der in 7.2.7.1 beschriebenen Kolonie-PCR durchgeführt wurde, größere DNA-Mengen der

genomischen Fragmente amplifiziert werden. Die präparative PCR wurde in 100 μL -Reaktionsansätzen durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermix ist in Tabelle 24 aufgeführt. Anstelle der bei der Kolonie-PCR verwendeten *Taq*-DNA-Polymerase wurde die Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase verwendet. Es wurden, wenn nicht anderes angegeben, die gleichen Primerpaare verwendet wie zuvor in der Kolonie-PCR (s. Anhang 3, Tabelle 45). Es wurden je 99 μL des Mastermix in ein 0,2 mL-PCR-Reaktionsgefäß gegeben und mit je 1 μL des Überstandes eines Zellaufschlusses (s. 7.2.7.1) bzw. als Blindwert mit 1 μL Reinstwasser versetzt. Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 25 aufgeführt. Die Spezifikationen der verwendeten Reagenzien sind in Anhang 1.3, Tabelle 43 angegeben.

Tabelle 24: Mastermix der präparativen PCR.

Komponente	Volumen [$\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$]	Konzentration im Ansatz
Phusion-Puffer (5x)	20	1x
dNTPs (je 2,5 mM)	2	0,05 mM
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ μL)	1	2 U/100 μL
<i>Forward</i> -Primer (100 μM)	1	1 μM
<i>Reverse</i> -Primer (100 μM)	1	1 μM
Reinstwasser	ad 100	-

Tabelle 25: Temperaturprogramm der präparativen PCR.

Wiederholungen	Temperaturzyklen	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	0:23
25	Denaturierung	98	0:07
	Annealing	X*	0:15
	Elongation	72	0:20-0:50**
1	Terminale Elongation	72	7:00
1	Kühlphase	4	∞

* Die optimale Annealing-Temperatur der jeweiligen Primer wurde mit Hilfe des Tm Calculators von Thermo Fisher (s. 6.3, Tabelle 11) anhand der Sequenzen und Konzentrationen der verwendeten Primer und der Polymerase berechnet.

**Die Dauer der Elongation wurde in Abhängigkeit der zu erwartenden Fragmentgröße des PCR-Produktes und der Lesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase (hier: 30 sec/1 kb) angepasst.

Im Anschluss an die PCR wurden die erhaltenen Amplifikate mittels Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit wie unter 7.2.2 beschrieben aufgereinigt und in 25 μL Reinstwasser eluiert. Unter Anwendung der fluorometrischen Emissionsmessung (s. 7.2.4.2) wurde die DNA-Konzentration bestimmt.

7.2.7.3 Präparative PCR zur Herstellung des crRNA/tracrRNA-Inserts

Die präparative PCR zur Herstellung des *Inserts* für die Klonierung in pTargetF-*ribA* (s. 7.2.5 und 7.2.6) erfolgte in zwei konsekutiven PCR-Reaktionen im 100- μ L-Maßstab. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze der ersten und zweiten PCR wird in den Tabellen 26 und 27 aufgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer befinden sich in Anhang 3, Tabelle 45. Für die erste PCR-Reaktion diente das Plasmid pTargetF als Template. Beide Primer der Reaktion wiesen komplementäre Bereiche zu der auf dem Plasmid codierten DNA-Sequenz der tracrRNA auf und vervielfältigten diese. Der Vorwärtsprimer enthielt zudem am 5'-Ende einen Großteil der DNA-Sequenz der crRNA von *ribA* und brachte diese während der PCR-Reaktion in das Amplifikat ein. Die erste PCR-Reaktion wurde mit dem entsprechenden Primerpaar für 10 PCR-Zyklen durchgeführt. Anschließend wurde der PCR-Ansatz mit dem Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit wie unter 7.2.2 beschrieben aufgereinigt und in 50 μ L Reinstwasser eluiert. Ein Teil des gereinigten PCR-Produktes diente als Template für die zweite PCR-Reaktion (s. Tabelle 27) in der mit Hilfe eines zweiten Vorwärtsprimers (ribAfw2), welcher am 3'-Ende komplementäre Bereiche zu der in der ersten PCR-Reaktion mit dem Primer ribAfw1 eingebrachten DNA-Sequenz enthielt, die noch fehlenden Basen der DNA-Sequenz der crRNA eingebracht wurden. Der Rückwärtsprimer sowie der Vorwärtsprimer der zweiten PCR-Reaktion enthielten zudem die Sequenzen der EcoRI bzw. SpeI-Restriktionsschnittstellen, die während der Amplifikation an beiden Enden der resultierenden linearen PCR-Produkte eingefügt wurden.

Das Temperaturprogramm für die beiden PCR-Reaktionen ist in Tabelle 28 aufgeführt. Im Anschluss an die zweite PCR wurde das erhaltene Amplifikat mittels eines 3%igen Agarosegels und unter Anwendung einer präparativen AGE mit anschließender Gelextraktion (s. 7.2.8 und 7.2.3) isoliert und in 40 μ L Reinstwasser eluiert. Anschließend wurden das crRNA/tracrRNA-*Insert* sowie das Plasmid pTargetF mit den Restriktionsendonukleasen SpeI und EcoRI verdaut (s. 7.2.5) und erneut über eine präparative AGE gereinigt (s. 7.2.8 und 7.2.3). Das crRNA/tracrRNA-*Insert* wurde wie unter 7.2.6 beschrieben in das verdaute Plasmid pTargetF ligiert.

Der Ligationsansatz wurde aufgereinigt (s. 7.2.2), in elektrokompente *E. coli* XL1-Zellen transformiert (s. 7.1.2) und der Erfolg der Klonierung mittels der Kolonie-PCR (s. 7.2.7.1) und den zur Herstellung des *Inserts* verwendeten äußeren Primern ribA2fw und ribAr (Primersequenzen s. Anhang 3, Tabelle 45) überprüft. Für die Negativ-Kontrolle (N) wurde die ursprüngliche Plasmid-DNA von pTargetF als *Template* verwendet.

Tabelle 26: Mastermix der ersten PCR-Reaktion.

Komponente	Volumen [$\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$]	Konzentration im Ansatz
Phusion-Puffer (5x)	20	1x
dNTPs (je 2,5 mM)	2	0,05 mM
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ μL)	1	2 U/100 μL
Plasmid-DNA (pTargetF)	1	1 ng/100 μL
<i>Forward</i> -Primer ribAfw1 (100 μM)	0,8	0,8 μM
<i>Reverse</i> -Primer ribAr (100 μM)	0,8	0,8 μM
Reinstwasser	ad 100	-

* die DNA-Konzentration betrug ca. 1 ng/ μL

Tabelle 27: Mastermix der zweiten PCR-Reaktion.

Komponente	Volumen [$\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$]	Konzentration im Ansatz
Phusion-Puffer (5x)	20	1x
dNTPs (je 2,5 mM)	2	0,05 mM
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ μL)	1	2 U/100 μL
PCR-Produkt aus erster PCR-Reaktion	10	-
<i>Forward</i> -Primer ribAfw2 (100 μM)	0,8	0,8 μM
<i>Reverse</i> -Primer ribAr (100 μM)	0,8	0,8 μM
Reinstwasser	ad 100	-

Tabelle 28: Temperaturprogramm der ersten und zweiten PCR-Reaktion.

Wiederholungen	Temperaturzyklen	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	0:23
10 bzw. 25	Denaturierung	98	0:07
	Annealing	X*	0:20
	Elongation	72	0:10
1	Terminale Elongation	72	7:00
1	Kühlphase	4	∞

* Die optimale Annealing-Temperatur der jeweiligen Primer wurde mit Hilfe des Tm Calculators von Thermo Fisher (siehe 6.3, Tabelle 11) anhand der komplementären Bereiche der Sequenzen und Konzentrationen der verwendeten Primer und der Polymerase berechnet.

7.2.7.4 Side-directed mutagenesis (SDM)-PCR

In dieser Arbeit wurde die SDM-PCR verwendet, um die crRNA-Sequenzen auf den Plasmiden pTargetF bzw. pJOE8999 den jeweiligen *Target*-Sequenzen der geplanten *Knockouts* entsprechend anzupassen. Bei der SDM-PCR werden sogenannte Mutagenese-Primer verwendet, die sich aus einem zur Zielsequenz komplementären und einem variablen Bereich zusammensetzen, der neu in die Sequenz eingebracht werden soll. Die 20-bp DNA-Sequenz der crRNA wurde

in zwei Stufen (zwei PCR-Reaktionen) und unter Verwendung von zwei Mutagenese-Primern (fw1 und fw2) eingebracht (s. Ablaufschemata in Anhang 8, Abbildungen 45 und 46). Die Zusammensetzung der 150 μL -Reaktionsansätze der ersten und zweiten SDM-PCR wird in den Tabellen 29 und 30 aufgeführt. Wenn nach der SDM-PCR keine DNA-Produkte nachgewiesen werden konnten, wurde den PCR-Ansätzen optional DMSO hinzugegeben (4-8% v/v im Gesamtansatz). In Tabelle 31 sind die jeweiligen verwendeten Primerpaare aufgeführt. Die Sequenzen der Primerpaare befinden sich in Anhang 3, Tabelle 45. Die jeweiligen Primerpaare wurden mittels des Multiple Primer Analyzer (s. 6.3, Tabelle 11) auf mögliche Sekundärstrukturen untersucht. Für die SDM-PCR wurden zudem ausschließlich über HPLC gereinigte Primer verwendet.

Die Rückwärtsprimer (r) sowie die Vorwärtsprimer (fw2) der zweiten PCR-Reaktion enthielten die Sequenz der SpeI-Restriktionsschnittstelle, die während der Amplifikation an beiden Enden der resultierenden linearen PCR-Produkte eingefügt wurde. Das Temperaturprogramm für die beiden PCR-Reaktionen ist in Tabelle 32 aufgeführt. Die erste PCR-Reaktion wurde mit dem entsprechenden Primerpaar für vier PCR-Zyklen durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz mit dem Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit wie unter 7.2.2 beschrieben aufgereinigt und die DNA in 30 μL Reinstwasser eluiert. Das gereinigte PCR-Produkt diente als Template für die zweite SDM-PCR (s. Tabelle 30), die analog zur ersten PCR gemäß des Temperaturprogrammes in Tabelle 32 durchgeführt wurde, diesmal mit 25 PCR-Zyklen.

Im Anschluss an die zweite PCR wurde das erhaltene Amplifikat erneut aufgereinigt (s. 7.2.2) und in 20 μL Reinstwasser eluiert.

Tabelle 29: Mastermix der ersten SDM-PCR.

Komponente	Volumen [$\mu\text{L}/150 \mu\text{L}$]	Konzentration im Ansatz
Phusion-Puffer (5x)	30	1x
dNTPs (je 2,5 mM)	3	0,05 mM
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ μL)	1,5	3 U/150 μL
Plasmid-DNA (pTargetF bzw. pJOE8999)*	1	1 ng/150 μL
Forward-Primer (fw1, 100 μM)	1,2	0,8 μM
Reverse-Primer (100 μM)	1,2	0,8 μM
Reinstwasser	ad 150	-

* die DNA-Konzentration betrug ca. 0,5 ng/ μL

Tabelle 30: Mastermix der zweiten SDM-PCR.

Komponente	Volumen [$\mu\text{L}/150 \mu\text{L}$]	Konzentration im Ansatz
Phusion-Puffer (5x)	30	1x
dNTPs (je 2,5 mM)	3	0,05 mM
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ μL)	1,5	3 U/150 μL
PCR-Produkt aus erster SDM-PCR	25	-
Forward-Primer (fw2, 100 μM)	1,2	0,8 μM
Reverse-Primer (100 μM)	1,2	0,8 μM
Reinstwasser	ad 150	-

Tabelle 31: Verwendete Primerpaare für die SDM-PCR.

Target-Region der crRNA	Primerpaar erste PCR	Primerpaar zweite PCR
<i>E. coli</i> (pTargetF)		
<i>ribA-G</i>	ribA-Gfw1, pTargetFr	ribA-Gfw2, pTargetFr
<i>ribB1</i>	ribB1fw1, pTargetFr	ribB1fw2, pTargetFr
<i>ribB2</i>	ribB2fw1, pTargetFr	ribB2fw2, pTargetFr
<i>ribC1</i>	ribC1fw1, pTargetFr	ribC1fw2, pTargetFr
<i>ribC2</i>	ribC2fw1, pTargetFr	ribC2fw2, pTargetFr
<i>B. subtilis</i> (pJOE8999)		
<i>ycsE</i>	ycsEfw1, pJOEr	ycsEfw2, pJOEr
<i>yitU</i>	yitUfw1, pJOEr	yitUfw2, pJOEr
<i>ywtE</i>	ywtEfw1, pJOEr	ywtEfw2, pJOEr

Tabelle 32: Temperaturprogramm der ersten und zweiten SDM-PCR.

Wiederholungen	Temperaturzyklen	Temperatur [C°]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	0:23
4 bzw. 25	Denaturierung	98	0:07
	Annealing	X*	0:20
	Elongation	72	1:20-5:00**
1	Terminale Elongation	72	7:00
1	Kühlphase	4	∞

* Die optimale Annealing-Temperatur der jeweiligen Primer wurde mit Hilfe des Tm Calculators von Thermo Fisher (s. 6.3, Tabelle 11) anhand der komplementären Bereiche der Sequenzen und Konzentrationen der verwendeten Primer und der Polymerase berechnet.

** Die Dauer der Elongation variierte aufgrund der unterschiedlichen Größe der Plasmide und betrug für SDM-PCR-Ansätze mit pTargetF (ca. 2 kbp) 1 min und 20 sec und für SDM-PCR-Ansätze mit pJOE8999 (ca. 7500 bp ohne *lacZ*-Gen) 5 min.

7.2.7.5 *Overlap-extension (OE)-PCR*

Zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten *Donor-Templates* für die Genom Editierung in *E. coli* und *B. subtilis* wurde die OE-PCR verwendet. Hierzu wurden vier verschiedene Primer zur Amplifikation von zunächst zwei unterschiedlichen DNA-Fragmenten benötigt. In den ersten beiden separat ablaufenden PCR-Reaktionen (1A und 1B) synthetisiert zunächst das erste Primerpaar den linken homologen Bereich (L) und das zweite Primerpaar den rechten homologen Bereich (R) der *Donor-Templates*. Die beiden inneren Primer (Lr und Rfw) bringen dabei einen komplementären Bereich von 15-16 Nukleotiden für ein späteres Annealing der beiden Fragmente in einer dritten PCR-Reaktion ein (s. Ablaufschema in Anhang 9, Abbildung 47). Bei der Herstellung der *Donor-Templates* für die Anwendung in *B. subtilis* wurden mit Hilfe der äußeren Primer (Lfw und Rr) zudem die Restriktionsschnittstellen für die Nukleasen *SmaI* und *SalI* an den äußeren Enden der Fragmente eingebracht. Diese dienen der späteren Klonierung in das Plasmid pJOE8999.

Die zur Herstellung der *Donor-Templates* verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 33 und die Sequenzen der jeweiligen Primer in Anhang 3, Tabelle 45 aufgeführt. In Anhang 5, Tabelle 46 sind zudem die DNA-Sequenzen der mittels OE-PCR generierten *Donor-Templates* angegeben.

Tabelle 33: Verwendete Primerpaare für die OE-PCR-Reaktionen 1A und 1B.

<i>Knockout</i>	Primerpaar PCR 1A	Primerpaar PCR 1B
<i>E. coli</i>		
<i>ribA</i>	AmLfw, AmLr	AmRfw, AmRr
<i>ribB</i>	BmLfw, BmLr	BmRfw, BmRr
<i>ribC</i>	CmLfw, CmLr	CmRfw, CmRr
<i>B. subtilis</i>		
<i>ycsE</i>	EmLfw, EmLr	EmRfw, EmRr
<i>yitU</i>	UmLfw, UmLr	Umfw, UmRr
<i>ywtE</i>	WmLfw, WmLr	Wmfw, WmRr

Als Template der PCR-Reaktionsansätze 1A und 1B diente die chromosomale DNA von *E. coli* bzw. *B. subtilis*. Hierfür wurde die DNA einer Kolonie von *E. coli* BL21(DE3) bzw. *B. subtilis* NIG1121 analog zur Durchführung der Kolonie-PCR (s. 7.2.7.1) mit Hilfe eines Zellaufschlusses freigesetzt. Es wurden je 99 µL des Mastermix (s. Tabelle 34) in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben und mit 1 µL des Überstandes vom jeweiligen Zellaufschluss bzw. als Blindwert mit 1 µL Reinstwasser versetzt. Das verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 35 aufgeführt. Die ersten beiden PCR-Reaktionen (1A und 1B) wurden mit den entsprechenden Primerpaaren für 25 PCR-Zyklen durchgeführt.

Tabelle 34: Mastermix der OE-PCR-Reaktionen 1A und 1B.

Komponente	Volumen [$\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$]	Konzentration im Ansatz
Phusion-Puffer (5x)	20	1x
dNTPs (je 2,5 mM)	2	0,05 mM
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ μL)	1	2 U/100 μL
<i>Forward</i> -Primer (100 μM)	1	1 μM
<i>Reverse</i> -Primer (100 μM)	1	1 μM
Reinstwasser	ad 100	-

Tabelle 35: Temperaturprogramm der OE-PCR 1A und 1B.

Wiederholungen	Temperaturzyklen	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	0:23
25	Denaturierung	98	0:07
	Annealing	X*	0:20
	Elongation	72	0:10-0:20**
1	Terminale Elongation	72	7:00
1	Kühlphase	4	∞

* Die optimale Annealing-Temperatur der jeweiligen Primer wurde mit Hilfe des Tm Calculators von Thermo Fisher (siehe 6.3, Tabelle 11) anhand der komplementären Bereiche der Sequenzen und Konzentrationen der verwendeten Primer und der Polymerase berechnet.

** Die Dauer der Elongation wurde in Abhängigkeit der zu erwartenden Fragmentgröße der PCR-Produkte und der Lesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase (hier: 30 sec/1 kb) angepasst.

Für die Durchführung der zweiten PCR-Reaktionen wurden die PCR-Produkte aus den ersten beiden Reaktionen mittels präparativer AGE aufgetrennt und aus dem Gel isoliert (s. 7.2.8 und 7.2.3) und anschließend zu äquimolaren Anteilen im zweiten PCR-Ansatz verwendet. Eine Aufreinigung der beiden DNA-Fragmente über eine präparative AGE war notwendig, da ansonsten geringe DNA-Konzentrationen der chromosomalen DNA von *E. coli* in den zweiten PCR-Ansatz übertragen werden könnten und somit möglicherweise auch die ursprüngliche, unveränderte DNA amplifiziert würde. Im zweiten PCR-Ansatz dienten die PCR-Fragmente in Form von denaturierten Einzelsträngen als Megaprimer, welche an die komplementäre Sequenz des Überlappungspartners binden. Die PCR wurde zunächst für vier Zyklen ohne die Verwendung weiterer Primer nach den Bedingungen in Tabelle 37 durchgeführt. Die Zusammensetzung des Mastermix ist in Tabelle 36 aufgeführt. Nach Ablauf der vier Zyklen wurden dem PCR-Ansatz jeweils die äußeren Primer (Lfw und Rr) der entsprechenden Primerpaare hinzugegeben, um eine exponentielle Amplifikation der elongierten Megaprimer in 25 weiteren PCR-Zyklen (s. Temperaturprogramm Tabelle 38) zu erreichen.

Im Anschluss an die zweite PCR wurde das erhaltene Amplifikat entweder mit dem Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (*Donor-Templates* für die Klonierung in pJOE8999, s. 7.2.2) oder mittels einer präparativen AGE (s. 7.2.8) und der unter 7.2.3 beschriebenen Gelextraktion (*Donor-Templates* für die Anwendung in *E. coli*) aufgereinigt und in 20 µL Reinstwasser eluiert. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde mittels eines 1%igen Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt (s. 7.2.8) und mit Hilfe des DNA-Größenmarkers und den erwarteten Fragmentlängen verglichen. Die *Donor-Templates* für die Anwendung in *B. subtilis* wurden wie unter 7.2.5 und 7.2.6 beschrieben mit Hilfe einer Klonierung in das jeweilige pJOE8999-Plasmid eingebracht. Die Spezifikationen der verwendeten Reagenzien sind in Anhang 1.3, Tabellen 42 und 43 angegeben.

Tabelle 36: Mastermix der zweiten OE-PCR-Reaktion.

Komponente	Volumen [µL/100 µL]	Konzentration im Ansatz
Phusion-Puffer (5x)	20	1x
dNTPs (je 2,5 mM)	2	0,05 mM
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/µL)	1	2 U/100 µL
PCR-Fragment 1A*	5-10	20-50 ng/100 µL
PCR-Fragment 1B*	5-10	20-50 ng/100 µL
<i>Forward-Primer</i> (100 µM)**	1	1 µM
<i>Reverse-Primer</i> (100 µM)**	1	1 µM
Reinstwasser	ad 100	-

* die DNA-Konzentration betrug zwischen 2-10 ng/µL

** die Primer wurden nach vier PCR-Zyklen zum Reaktionsansatz hinzugegeben

Tabelle 37: Temperaturprogramm der zweiten OE-PCR-Reaktion vor Zugabe der Primer.

Wiederholungen	Temperaturzyklen	Temperatur [C°]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	0:23
4	Denaturierung	98	0:07
	Annealing	61*	0:20
	Elongation	72	0:30
1	Terminale Elongation	72	7:00
1	Kühlphase	4	∞

* Die optimale Annealing-Temperatur wurde mit Hilfe des Tm Calculators von Thermo Fisher (s. 6.3, Tabelle 11) anhand der Sequenz der komplementären Bereiche der PCR-Fragmente (Megaprimer) und anhand der Polymerase berechnet und betrug 61 °C.

Tabelle 38: Temperaturprogramm der zweiten OE-PCR-Reaktion nach Zugabe der Primer.

Wiederholungen	Temperaturzyklen	Temperatur [C°]	Zeit [min:s]
1	Initiale Denaturierung	98	0:23
25	Denaturierung	98	0:07
	Annealing	X*	0:20
	Elongation	72	0:30-0:40**
1	Terminale Elongation	72	7:00
1	Kühlphase	4	∞

* Die optimale Annealing-Temperatur der jeweiligen Primer wurde mit Hilfe des Tm Calculators von Thermo Fisher (s. 6.3, Tabelle 11) anhand der komplementären Bereiche der Sequenzen und Konzentrationen der verwendeten Primer und der Polymerase berechnet.

** Die Dauer der Elongation wurde in Abhängigkeit der zu erwartenden Fragmentgröße der PCR-Produkte und der Lesegeschwindigkeit der verwendeten Polymerase (hier: 30 sec/1 kb) angepasst.

7.2.8 Agarosegelelektrophorese (AGE)

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese ist es möglich, DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe voneinander zu trennen. Zur Separierung der Nukleinsäuremoleküle werden Agarosegele verwendet, dessen Netzstruktur von der Konzentration der Agarosegele abhängig ist. In dieser Arbeit wurden zur Auftrennung von Plasmid-DNA und größeren DNA-Fragmenten (> 600 bp) 0,8-1%ige und zur Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten (< 600 bp) 1,5-2%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde der gewünschten Konzentration entsprechend in 50 mL TAE (TRIS-Acetat-EDTA)-Puffer eingewogen und durch Erhitzen auf 100 °C in der Mikrowelle in Lösung gebracht. Nach dem Abkühlen der Agaroselösung auf etwa 65 °C wurde diese zur Gelausbildung in horizontale Gelträger gegossen. Zur Formung der Probenaschen wurden für analytische Gele Kämme verwendet, welche Probenaschen mit einem Volumen von 10-20 µL erzeugten. Für präparative Gele wurden Kämme verwendet, welche 100-150 µL große Taschen formten. Die Proben und der DNA-Größenmarker (s. 6.6) wurden vor Anlegen der Spannung in die vorgefertigten Taschen pipettiert. Die DNA-Proben wurden zuvor in einem Verhältnis von 10:1 mit Loading Dye (Blue Loading Buffer) versetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einer mit TAE-Puffer gefüllten horizontalen Laufkammer bei 120 V für 40-50 min. Die Detektion der DNA erfolgte entweder mit Hilfe des Interkalationsfarbstoffs Ethidiumbromid oder mit GelRed unter UV-Licht bei 312 nm. Die Digitalisierung der Elektropherogramme erfolgte unter Verwendung einer Geldokumentationseinheit.

Bei der präparativen Gelelektrophorese wurde die jeweilige DNA-Bande nach der elektrophoretischen Auftrennung unter UV-Licht (312 nm) mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 2,0 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende Isolierung der DNA aus der Gelmatrix erfolgte mit Hilfe des PeqGOLD Gel Extraction Kits und nach der unter 7.2.3 beschriebenen Durchführung. Die Spezifikationen der verwendeten Puffer, Lösungen und Reagenzien sind im Anhang dieser Arbeit aufgeführt (s. Anhang 1.1 bis 1.3).

7.2.9 Genom Editierung mittels CRISPR-Cas9

7.2.9.1 Genom Editierung in *E. coli*

Elektrokompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen, welche das Plasmid pCas enthielten, wurden wie unter 7.1.2 beschrieben hergestellt. Für die Elektroporation wurde ein gefrorenes Aliquot elektrokompeter Zellen (50 μ L) auf Eis aufgetaut und mit 60-100 ng der jeweiligen pTargetF-DNA (pTargetF-*ribA*, pTargetF-*ribB* bzw. pTargetF-*ribC*) und 100-300 ng der entsprechenden *Donor-Template*-DNA (D*TribA*, D*TribB* bzw. D*TribC*) gemischt. Die Elektroporation wurde wie unter 7.1.2 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen sofort in ein 50 mL-Zentrifugenröhrchen mit 2 mL SOB-Medium, 10 mM *L*-Arabinose und 0,08 mM Riboflavin überführt und 2 h im Schüttelinkubator (150 rpm) bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4500 g, 7 min, 4 °C) geerntet, das Zellpellet wurde in 0,1 mL Reinstwasser resuspendiert und die Zellsuspension auf einer LB-Agarplatte mit Kanamycin, Spectinomycin, *L*-Arabinose (1,5 g/L) und Riboflavin (200 mg/L) ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C für 18-24 h im Brutschrank inkubiert. Die verwendeten Medien und Medienzusätze sind in Abschnitt 6.9, Tabelle 15 aufgeführt. Die verwendeten Lösungen befinden sich in Anhang 1.1.

Plasmid *Curing* und Selektion der Mutanten

Am nächsten Tag wurden die erhaltenen *E. coli*-Transformanten mit Hilfe eines Wachstumstests auf LB-Agarplatten mit und ohne den Zusatz von Riboflavin auf eine Riboflavin-Auxotrophie und somit, auf eine erfolgreiche Deletion überprüft (s. 7.1.5). Die positiv getesteten Kolonien wurden anschließend mittels Kolonie-PCR (s. 7.2.7.1) auf die jeweilige zu erwartende Deletion getestet und eine der bestätigten Deletionsmutanten einem Plasmid-*Curing* unterzogen. Hierzu wurde eine einzelne Kolonie mit einer sterilen Impföse aufgenommen und in ein 2,0 mL-Reaktionsgefäß mit 100 μ L LB-Medium und 0,08 mM Riboflavin und 0,5 mM IPTG überführt. Die Zellsuspension wurde für 1 h bei 28 °C und 220 rpm auf einem Schüttelinkubator inkubiert und anschließend auf einer LB-Agarplatte mit 0,08 mM Riboflavin ausplattiert. Das Plasmid pCas verfügt über eine mittels IPTG-induzierbare sgRNA, welche Cas9 zum Replikationsursprung (eng. *origin of replication*, ori) von pTargetF führt und in diesen einen CRISPR-Cas9 vermittelten Doppelstrangbruch induziert. Am nächsten Morgen wurden die auf der Agarplatte gebildeten Kolonien auf den Verlust des Plasmids getestet, indem ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum Spectinomycin bestimmt wurde. Kolonien, welche das Plasmid pTargetF verloren hatten und daher auf der Spectinomycin-haltigen Agarplatte kein Wachstum zeigten, wurden einem Plasmid-*Curing* von pCas unterzogen.

Hierzu wurden diese mittels einer sterilen Impföse aufgenommen, auf einer LB-Agarplatte mit 0,08 mM Riboflavin (ohne Antibiotika) ausplattiert und über Nacht bei 42 °C inkubiert.

Aufgrund des Temperatur-empfindlichen ori repA101(Ts) von pCas kann das Plasmid durch eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur entfernt werden. Am nächsten Morgen wurden einige Kolonien auf den Verlust von pCas getestet, indem ihre Empfindlichkeit gegenüber Kanamycin bestimmt wurde. Von den Plasmid-freien Deletionsmutanten wurden wie unter 7.1.1 beschrieben Dauerkulturen hergestellt, welche in Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert wurden.

7.2.9.2 Genom Editierung in *B. subtilis*

Zur Genom Editierung in *B. subtilis* wurde das jeweilige für den gewünschten *Knockout* modifizierte Plasmid (pJOE8999-*ycsE*, pJOE8999-*yitU* bzw. pJOE8999-*ywtE*) mittels Elektroporation in die *B. subtilis*-Zellen eingebracht. Die Herstellung der elektrokompenten Zellen wird unter 7.1.3 beschrieben. Die Elektroporation erfolgte unter Verwendung von 50 µL elektrokompenten *B. subtilis*-Zellen und 50 ng pJOE8999-Plasmid-DNA (Transformationstests) bzw. 150-270 ng pJOE8999-Plasmid-DNA (Genom Editierung). Die Zellsuspension wurde zusammen mit der Plasmid-DNA (1-5 µL) in eine 1 mm Elektroporationsküvette gegeben, die in einen Elektroporator eingesetzt und mit Hochspannungsimpulsen (2000 V, 5 ms Dauer) behandelt wurde. Anschließend wurden die Zellen sofort in 1 mL eiskaltem *Recovery*-Medium resuspendiert und für 3 h bei 150 rpm und 30 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4500 g, 7 min, 4 °C) geerntet, das Zellpellet in 0,1 mL frischem *Recovery*-Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf einer LB-Agarplatte mit 0,2% Mannose und geeigneten Antibiotika ausplattiert. Die Agarplatten wurde über Nacht bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Die verwendeten Medien und Medienzusätze sind in Abschnitt 6.9, Tabelle 15 aufgeführt. Die verwendeten Lösungen befinden sich in Anhang 1.1.

Plasmid *Curing* und Selektion der Mutanten

B. subtilis-Kolonien, die am nächsten Tag auf den Agarplatten erschienen, wurden zunächst einem Plasmid *Curing* unterzogen. Für das Plasmid *Curing* wurde die temperaturempfindliche Eigenschaft des pE194ts Replikationsursprungs von pJOE8999 genutzt, um die Plasmid-DNA aus den Zellen zu eliminieren. Hierzu wurden einige einzelne Kolonien mit einer sterilen Impföse aufgenommen und auf einer frischen LB-Agarplatte ohne den Zusatz von Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 50 °C inkubiert. Bakterien, welche über Nacht wuchsen, wurden auf frischen LB-Agarplatten vereinzelt und bei 42 °C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die auf den Agarplatten kultivierten Kolonien auf den Verlust des Plasmids getestet, indem ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin bestimmt wurde.

Die Plasmid-freien Kolonien wurden anschließend mittels Kolonie-PCR (s. 7.2.7.1) auf die zu erwartende Deletion geprüft. Eine der bestätigten Deletionsmutanten wurde wie unter 7.1.1 beschrieben für die Herstellung einer Dauerkultur verwendet.

7.2.10 SANGER-Sequenzierung

Die mittels SDM-PCR (s. 7.2.7.4) oder Klonierung (s. 7.2.5 und 7.2.6) modifizierten Plasmide sowie die mittels präparativer PCR (s. 7.2.7.2) erhaltenen DNA-Fragmente von genomischer Bakterien-DNA wurden mit Hilfe der DNA-Sequenzierung nach SANGER (Sanger et al., 1977) auf eine korrekte DNA-Sequenz überprüft. Die DNA-Sequenzierung wurde in Dienstleistung von der Firma GATC-Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurden 20 μL der entsprechenden Plasmid-DNA (DNA-Konzentration: 30-100 $\text{ng}/\mu\text{L}$) bzw. der PCR-Fragmente (DNA-Konzentration: 10-50 $\text{ng}/\mu\text{L}$) und 20 μL eines für die entsprechende Sequenzierung geeigneten Primers (Konzentration: 10 $\text{pmol}/\mu\text{L}$) (Primer-Sequenzen s. Anhang 3, Tabelle 45) in jeweils ein 2,0 mL-Safe Seal Mikroröhrchen überführt und an GATC-Biotech verschickt. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Genome Compilers oder der Benchling Software (s. 6.3, Tabelle 11) abgebildet und unter Anwendung der *Alignment*-Funktion mit den zu erwartenden DNA-Sequenzen verglichen.

7.2.11 Next Generation Sequencing (NGS) und Datenprozessierung

Das Genom des *B. subtilis*-Wildtypstamms sowie das der Triplemutante (s. 6.4, Tabelle 12) wurde in Dienstleistung von der Firma Eurofins Genomics (Konstanz, Deutschland) mit Hilfe der NGS-Sequenzierung sequenziert. Hierzu wurden die Stämme zunächst auf LB-Agarplatten ausplattiert. Aus jeweils einer einzelnen Kolonie wurden Übernachtskulturen (s. 7.1.1) hergestellt. Diese Übernachtskulturen dienten wiederum als Inokulum (1:100) für die Hauptkulturen in einem Liter LB-Medium. Die Zellen wurden bei einem OD-Wert von 1,0 mittels Zentrifugation (4000 g, 30 min, 4 °C) geerntet. Anschließend wurde der Kulturüberstand entfernt, die Zellen in Saline resuspendiert und in 50 mL-Zentrifugen-Röhrchen überführt. Die Extraktion der genomischen DNA aus den Zellpellets erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics. Die Sequenzierung der DNA wurde mit Hilfe des Illumina HiSeq 2500 Systems (San Diego, Kalifornien, USA) vorgenommen.

Mit Hilfe der Software CLC Genomics Workbench 11 (siehe 6.3, Tabelle 11) wurden die erhaltenen *reads* gefiltert, um Adaptersequenzen, Basen mit einer geringen Qualität (Phred-Score < 13) und *reads*, welche 10 oder mehr mehrdeutige Basen (Ns = A, T, G oder C) in Folge enthielten, zu entfernen. Die getrimmten *reads* wurden mit Hilfe des Referenzgenoms des nächsten verwandten Stammes (*B. subtilis* subsp. *subtilis* 168, NCBI-Zugangsnummer: CP010052) assembliert. Anschließend wurden verbleibende Lücken in der Sequenz (eng. *sequence coverage gaps*) durch die Präparation der entsprechenden PCR-Fragmente (s. 7.2.7.2) und eine anschließende SANGER-Sequenzierung (s. 7.2.10) und erneute Assemblierung geschlossen.

7.2.12 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Riboflavin-Konzentration in den Überständen der aufgeschlossenen Zellpellets und im Zellmedium der *B. subtilis* Wildtyp-Zellen und *B. subtilis*-Deletionsmutanten (s. 7.1.4) wurde das (ELISA)-Testkit des Herstellers Elabscience Biotechnology (s. Anhang 1.3, Tabelle 42) verwendet. Das Testkit basiert auf dem Prinzip eines kompetitiven ELISA. Zu Beginn der Testdurchführung wurden alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur akklimatisiert, um Temperatureinflüsse während des Tests zu vermeiden. Anschließend erfolgte die sequenzielle Verdünnung der Proben im Probenverdünnungspuffer (1:5, 1:25, 1:50). Die Standardkurve wurde durch eine 1:2-Verdünnung des niedrigsten Standards modifiziert, was zu einem Messbereich von 0,16 ng/mL bis 10 ng/mL Riboflavin führte. Die weitere Durchführung der ELISA-Methode erfolgte nach der Anleitung des Herstellers und wird in Anhang 6.5 beschrieben. Nach dem letzten Inkubationsschritt wurde die Absorption mittels eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes (s. Anhang 1.4, Tabelle 44) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die gemessenen Daten wurden exportiert und mit Hilfe der Standardkurve und einer 4-Punkt-Parameter-Funktionsgleichung (s. Gleichung 2) nach Rodbard (1981) konnten die Riboflavin-gehalte in den Proben bestimmt werden. Für die Berechnung der intrazellulären Riboflavin-Konzentrationen wurden die Nasszellgewichte der jeweiligen Zellpellets berücksichtigt. Die Menge an Riboflavin in den *B. subtilis*-Zellen wurde in ng pro g Zellfeuchtgewicht angegeben.

Gleichung 2:
$$Y = \frac{A-D}{1+(\frac{X}{C})^B} + D$$

mit:

X = Konzentration des gesuchten Parameters

Y = Signal

A = obere Asymptote (*Response* auf 0 ng/mL Standard, hier: maximale Absorption)

B = Steigung der Kurve am Testmittelpunkt

C = Wendepunkt der Kurve (IC50-Wert in ng/mL)

D = untere Asymptote (*Response* auf höchsten Standard, hier: minimale Absorption)

7.3 Bildgebende Verfahren

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur morphologischen Untersuchung der *B. subtilis*-Mutanten wurden Übernachtskulturen der *B. subtilis* Wildtyp-Zellen und der *B. subtilis*-Deletionsmutanten wie unter 7.1.1 beschrieben bis zu einem OD-Wert von 0,9-1,0 kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Ernte der Zellen mittels Zentrifugation bei 4 °C und 5000 g für 6 min. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellpellets auf Eis gelagert. Die weitere Präparation der Zellen erfolgte durch das Biozentrum Klein Flottbek der Universität Hamburg. Die Zellpellets wurden gewaschen, mittels Kritischer Punkt Trocknung entwässert und anschließend mit Kohlenstoff bedampft. Die so hergestellten Zell-Präparate wurden anschließend mit dem REM LEO 1525 Gemini untersucht.

7.4 Bioinformatische Methoden

Online-Tool/CRISPR-ERA Version 1.2

Die Auswahl geeigneter *Target*-Sequenzen bzw. das Design der 20-Nukleotide umfassenden crRNAs für die durchgeführten *Gen-Knockouts* in *E. coli* und *B. subtilis* erfolgte unter Verwendung des Online-Tools CRISPR-ERA (s. auch 6.3, Tabelle 11). Die Software verwendet einen Algorithmus für die Suche nach CRISPR-Cas9 *Target*-Sequenzen und bewertet deren Effizienz und Spezifität unter Verwendung eines Regelsatzes, der aus aktuellen, publizierten Daten zusammengefasst wurde (Liu et al., 2015).

Mit Hilfe der Software wird zunächst jedes Zielgen bzw. jede genomische Sequenz im jeweiligen Organismus auf die für die Cas9-Nuklease aus *S. pyogenes* spezifische PAM-Region (5'-NGG-3' bzw. 3'-NCC-5') durchsucht. Für jede der möglichen *Target*-Sequenzen werden anschließend zwei *Scores* berechnet: (i) ein Effizienz-Score (E-Score) auf der Grundlage von Sequenzmerkmalen wie dem Guanin-Cytosin-(GC)-Gehalt (mindestens 25%, höchstens 75%) und Ortsinformationen, wie die Entfernung der Transkriptionsstartstelle (TSS) des Zielgens; und (ii) ein Spezifitäts-Score (S-Score) auf der Grundlage der Anzahl möglicher *Off-Target*-Bindungsstellen. Der S-Score gibt für alle potenziellen *Target*-Sequenzen an, ob identische oder sehr ähnliche (mit 1-3 Basen-*Mismatches*) genomische Sequenzen im jeweiligen Organismus vorhanden sind, die eine benachbarte PAM-Region aufweisen. Auch die alternative PAM-Sequenz (5'-NAG-3'), von der bekannt ist, dass sie von der Cas9-Nuklease in geringem Maße ebenfalls erkannt wird, wird bei der Anwendung der Software berücksichtigt (Jiang et al., 2013; Liu et al., 2015). Die *Target*-Sequenzen werden anschließend als resultierende crRNA-Sequenzen absteigend nach der Summe von E-Score und S-Score (maximal 20) geordnet, angezeigt. Bei der Auswahl der crRNA-Sequenzen wurden nach Möglichkeit die Sequenzen berücksichtigt, die einen maximalen Score von 20 aufwiesen.

Literaturverzeichnis

- Abbas, C. A. & Sibirny, A. A. (2011). Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : *MMBR*, 75(2), 321–360. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00030-10>
- Allen, K. N. & Dunaway-Mariano, D. (2004). Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. *Trends in biochemical sciences*, 29(9), 495–503.
- Altenbuchner, J. (2016). Editing of the *Bacillus subtilis* Genome by the CRISPR-Cas9 System. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5421–5427. <https://doi.org/10.1128/AEM.01453-16>
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A. & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), 569–573. <https://doi.org/10.1038/nature13579>
- Aravind, L., Galperin, M. Y. & Koonin, E. V. (1998). The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. *Trends in biochemical sciences*, 23(4), 127–129. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01189-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01189-X)
- Ashoori, M. & Saedisomeolia, A. (2014). Riboflavin (vitamin B₂) and oxidative stress: a review. *The British Journal of Nutrition*, 111(11), 1985–1991. <https://doi.org/10.1017/S0007114514000178>
- Au, C. H., Leung, A. Y. H., Kwong, A., Chan, T. L. & Ma, E. S. K. (2017). INDELseek: detection of complex insertions and deletions from next-generation sequencing data. *BMC genomics*, 18(1), 16.
- Ayora, S., Carrasco, B., Cárdenas, P. P., César, C. E., Cañas, C., Yadav, T. et al. (2011). Double-strand break repair in bacteria: a view from *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology reviews*, 35(6), 1055–1081.
- Babu, M., Díaz-Mejía, J. J., Vlasblom, J., Gagarinova, A., Phanse, S., Graham, C. et al. (2011). Genetic interaction maps in *Escherichia coli* reveal functional crosstalk among cell envelope biogenesis pathways. *PLoS Genetics*, 7(11), e1002377. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002377>
- Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K. & Richter, G. (2000). Biosynthesis of vitamin b2 (riboflavin). *Annual Review of Nutrition*, 20, 153–167. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.153>
- Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Mörtl, S., Kis, K., Kugelbrey, K. et al. (1997) [36] Biosynthesis of riboflavin: Lumazine synthase and riboflavin synthase. In D. B. MacCormick (Ed.), *Vitamins and coenzymes* (Methods in Enzymology, vol. 280, vol. 280, S. 389–399). San Diego, Calif.: Acad. Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)80130-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)80130-9)
- Bacher, A. & Lings, F. (1970). Biosynthesis of riboflavin. Formation of 2,5-diamino-6-hydroxy-4-(1'-D-ribitylamino)pyrimidine in a riboflavin auxotroph. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(18), 4647–4652.
- Bacher, A., Mailander, B., Baur, R., Eggers, U., Harders, H. & Schnepfle, H. (1975). Studies on the biosynthesis of riboflavin. *Chemistry and Biology of Pteridines*, 285–290.
- Bacher, A., Baur, R., Eggers, U., Harders, H. D., Otto, M. K. & Schnepfle, H. (1980). Riboflavin synthases of *Bacillus subtilis*. Purification and properties. *The Journal of biological chemistry*, 255(2), 632–637.

- Bacher, A., Eberhardt, S., Eisenreich, W., Fischer, M., Herz, S., Illarionov, B. et al. (2001). Biosynthesis of riboflavin. In G. Litwack (Ed.), *Cofactor biosynthesis. A mechanistic perspective* (Vitamins and hormones, vol. 61, vol. 61, S. 1–49). San Diego, Calif.: Acad. Press. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(01\)61001-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(01)61001-X)
- Baeshen, N. A., Baeshen, M. N., Sheikh, A., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I. et al. (2014). Cell factories for insulin production. *Microbial Cell Factories*, 13, 141. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0141-0>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S. et al. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5819), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Barrangou, R. & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular cell*, 54(2), 234–244.
- Berli, R. R. & Barbas, C. F. (2002). Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nature Biotechnology*, 20(2), 135–141. <https://doi.org/10.1038/nbt0202-135>
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S. & Nekrasov, V. (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant methods*, 9(1), 39.
- Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2008). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie* (Springer-Lehrbuch, 6., vollst. überarb. Aufl.). Berlin, Heidelberg: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-73202-0>
- Bennett, C. B., Lewis, A. L., Baldwin, K. K. & Resnick, M. A. (1993). Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(12), 5613–5617.
- Bergmans, H. E.N., Kooijman, D. H. & Hoekstra, W. P.M. (1980). Cotransformation of linear chromosomal DNA and plasmid DNA in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 211–214.
- Bertrand, C., Thibessard, A., Bruand, C., Lecointe, F. & Leblond, P. (2019). Bacterial NHEJ: a never ending story. *Molecular Microbiology*, 111(5), 1139–1151. <https://doi.org/10.1111/mmi.14218>
- Beumer, K. J., Trautman, J. K., Mukherjee, K. & Carroll, D. (2013). Donor DNA Utilization During Gene Targeting with Zinc-Finger Nucleases. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3(4), 657–664. <https://doi.org/10.1534/g3.112.005439>
- Bhagavan, N. V. (2002). *Medical biochemistry* (4th ed.). San Diego: Harcourt/Academic Press. Retrieved from <http://search.ebscohost.com>
- Bhagavan, N. V. & Ha, C.-E. (2011). *Essentials of medical biochemistry. With clinical cases*. Amsterdam: Elsevier.
- Bhaya, D., Davison, M. & Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual Review of Genetics*, 45, 273–297. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132430>
- Bibb, M. J., Ward, J. M. & Hopwood, D. A. (1978). Transformation of plasmid DNA into *Streptomyces* at high frequency. *Nature*, 274(5669), 398–400. <https://doi.org/10.1038/274398a0>
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K. G. & Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161(3), 1169–1175.
- Birkenmeier, M., Neumann, S. & Röder, T. (2014). Kinetic modeling of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* under production conditions. *Biotechnology letters*, 36(5), 919–928.
- Bitinaite, J., Wah, D. A., Aggarwal, A. K. & Schildkraut, I. (1998). FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), 10570–10575. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10570>

- Blyth, A. (1879). LVI.—The composition of cows' milk in health and disease. *J. Chem. Soc., Trans.*, 35(0), 530–539. <https://doi.org/10.1039/CT8793500530>
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. & Ehrlich, S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 8), 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
- Bresler, S. E., Cherepenko, E. I. & Perumov, D. A. (1974). Investigation of the operon of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. 3. Production and properties of mutants with a complex regulator genotype. *Soviet Genetics*, 7(11), 1466–1470.
- Brissett, N. C., Pitcher, R. S., Juarez, R., Picher, A. J., Green, A. J., Dafforn, T. R. et al. (2007). Structure of a NHEJ polymerase-mediated DNA synaptic complex. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5849), 456–459. <https://doi.org/10.1126/science.1145112>
- Brouns, S. J. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuys, R. J. H., Snijders, A. P. L. et al. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5891), 960–964. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>
- Bruand, C., Bidnenko, V. & Ehrlich, S. D. (2001). Replication mutations differentially enhance RecA-dependent and RecA-independent recombination between tandem repeats in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1248–1258. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02312.x>
- Brutinel, E. D., Dean, A. M. & Gralnick, J. A. (2013). Description of a riboflavin biosynthetic gene variant prevalent in the phylum Proteobacteria. *Journal of Bacteriology*, 195(24), 5479–5486. <https://doi.org/10.1128/JB.00651-13>
- Bullock, W. O. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques*, 5, 376–379.
- Burgess, C. M., Slotboom, D. J., Geertsma, E. R., Duurkens, R. H., Poolman, B. & van Sinderen, D. (2006). The riboflavin transporter RibU in *Lactococcus lactis*: molecular characterization of gene expression and the transport mechanism. *Journal of Bacteriology*, 188(8), 2752–2760. <https://doi.org/10.1128/JB.188.8.2752-2760.2006>
- Burroughs, A. M., Allen, K. N., Dunaway-Mariano, D. & Aravind, L. (2006). Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. *Journal of Molecular Biology*, 361(5), 1003–1034. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.049>
- Cameron, D. L., Di Stefano, L. & Papenfuss, A. T. (2019). Comprehensive evaluation and characterisation of short read general-purpose structural variant calling software. *Nature communications*, 10(1), 1–11.
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4910), 1288–1292. <https://doi.org/10.1126/science.2660260>
- Carter, Z. & Delneri, D. (2010). New generation of loxP-mutated deletion cassettes for the genetic manipulation of yeast natural isolates. *Yeast (Chichester, England)*, 27(9), 765–775. <https://doi.org/10.1002/yea.1774>
- Cathomen, T. & Keith Joung, J. (2008). Zinc-finger Nucleases: The Next Generation Emerges. *Molecular Therapy*, 16(7), 1200–1207. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.114>
- Cecchini, G., Perl, M., Lipsick, J., Singer, T. P. & Kearney, E. B. (1979). Transport and binding of riboflavin by *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 254(15), 7295–7301. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)50318-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50318-5)
- Chang, H. H. Y., Watanabe, G., Gerodimos, C. A., Ochi, T., Blundell, T. L., Jackson, S. P. et al. (2016). Different DNA End Configurations Dictate Which NHEJ Components Are Most Important for Joining Efficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 291(47), 24377–24389. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.752329>

- Chassy, B. M., Mercenier, A. & Flickinger, J. (1988). Transformation of bacteria by electro-
poration. *Trends in biotechnology*, 6(12), 303–309.
- Chen, H., Choi, J. & Bailey, S. (2014). Cut site selection by the two nuclease domains of the
Cas9 RNA-guided endonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 289(19), 13284–13294.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.539726>
- Chen, W., Zhang, Y., Yeo, W.-S., Bae, T. & Ji, Q. (2017). Rapid and Efficient Genome Editing
in *Staphylococcus aureus* by Using an Engineered CRISPR/Cas9 System. *Journal of the
American Chemical Society*, 139(10), 3790–3795. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b13317>
- Chester, N. & Marshak, D. R. (1993). Dimethyl sulfoxide-mediated primer Tm reduction: a
method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction.
Analytical Biochemistry, 209(2), 284–290. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1121>
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S. et al. (2014). Analysis of off-target
effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Re-
search*, 24(1), 132–141. <https://doi.org/10.1101/gr.162339.113>
- Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B. & Nicolas, J. F. (1995). Induction of homologous recombina-
tion in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cere-
visiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 15(4), 1968–1973.
<https://doi.org/10.1128/mcb.15.4.1968>
- Chuai, G., Ma, H., Yan, J., Chen, M., Hong, N., Xue, D. et al. (2018). DeepCRISPR: optimized
CRISPR guide RNA design by deep learning. *Genome Biology*, 19(1), 80.
<https://doi.org/10.1186/s13059-018-1459-4>
- Chung, M.-E., Yeh, I.-H., Sung, L.-Y., Wu, M.-Y., Chao, Y.-P., Ng, I.-S. et al. (2017). Enhanced
integration of large DNA into *E. coli* chromosome by CRISPR/Cas9. *Biotechnology and Bi-
oengineering*, 114(1), 172–183. <https://doi.org/10.1002/bit.26056>
- Clark, J. M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic
and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 16(20), 9677–9686.
<https://doi.org/10.1093/nar/16.20.9677>
- Cobb, R. E., Wang, Y. & Zhao, H. (2015). High-efficiency multiplex genome editing of *Strepto-
myces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS Synthetic Biology*, 4(6),
723–728. <https://doi.org/10.1021/sb500351f>
- Cohan, F. M., King, E. C. & Zawadzki, P. (1994). AMELIORATION OF THE DELETERIOUS
PLEIOTROPIC EFFECTS OF AN ADAPTIVE MUTATION IN *BACILLUS SUBTILIS*. *Evolu-
tion; International Journal of Organic Evolution*, 48(1), 81–95.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb01296.x>
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bac-
teria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the Na-
tional Academy of Sciences*, 69(8), 2110–2114.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N. et al. (2013). Multiplex genome
engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 819–823.
- Connor, E. E. (1998). Sulfonamide antibiotics. *Primary Care Update for OB/GYNs*, 5(1), 32–
35. [https://doi.org/10.1016/S1068-607X\(97\)00121-2](https://doi.org/10.1016/S1068-607X(97)00121-2)
- Court, D. L., Sawitzke, J. A. & Thomason, L. C. (2002). Genetic engineering using homologous
recombination. *Annual Review of Genetics*, 36, 361–388. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.36.061102.093104>
- Cui, L. & Bikard, D. (2016). Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of *Esche-
richia coli*. *Nucleic Acids Research*, 44(9), 4243–4251. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw223>
- Dahl, S. G., Sylte, I. & Ravna, A. W. (2004). Structures and models of transporter proteins.
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 309(3), 853–860.

- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- Debabov, V. G. (1982). The industrial use of bacilli. *The molecular biology of the Bacilli*, 1, 331–370.
- Della, M., Palmboos, P. L., Tseng, H.-M., Tonkin, L. M., Daley, J. M., Topper, L. M. et al. (2004). Mycobacterial Ku and ligase proteins constitute a two-component NHEJ repair machine. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5696), 683–685. <https://doi.org/10.1126/science.1099824>
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A. et al. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (2015). *Empfohlene Zufuhr von Riboflavin (Vitamin B2)*. Zugriff am 06.12.2022. Verfügbar unter: <https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/>
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J. E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P. et al. (2008). Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 190(4), 1390–1400. <https://doi.org/10.1128/JB.01412-07>
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F. et al. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 34(2), 184–191. <https://doi.org/10.1038/nbt.3437>
- Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I. et al. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature Biotechnology*, 32(12), 1262–1267. <https://doi.org/10.1038/nbt.3026>
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16(13), 6127–6145. <https://doi.org/10.1093/nar/16.13.6127>
- Eberhardt, S., Richter, G., Gimbel, W., Werner, T. & Bacher, A. (1996). Cloning, sequencing, mapping and hyperexpression of the *ribC* gene coding for riboflavin synthase of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 242(3), 712–719. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0712r.x>
- Eisenbrand, G., Schreier, P. & Meyer, A. H. (Hrsg.). (2006). *Römpp-Lexikon Lebensmittelchemie* (2., völlig überarb. und erw. Aufl.). Stuttgart: Thieme.
- Ellis, H. M., Yu, D., DiTizio, T. & Court, D. L. (2001). High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6742–6746. <https://doi.org/10.1073/pnas.121164898>
- Fischer, M. & Bacher, A. (2005). Biosynthesis of flavocoenzymes. *Natural Product Reports*, 22(3), 324–350. <https://doi.org/10.1039/b210142b>
- Fischer, M. & Bacher, A. (2006). Biosynthesis of vitamin B2 in plants. *Physiologia Plantarum*, 126(3), 304–318.
- Fischer, M. & Bacher, A. (2008). WISSENSCHAFT-Was ist das Gelbe vom Ei? *Biospektrum*, 14(3), 236.
- Fischer, M. & Glomb, M. A. (2015). *Moderne Lebensmittelchemie* (1. Aufl.). Hamburg: Behr. Verfügbar unter: <http://www.behrs.de/>
- Fisher, R.A. (1918). The Correlation Between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 52(02), 399–433. Retrieved from <http://eprints.icrisat.ac.in/10210/>

- Focke, F. (2011). *Molekularbiologische Methoden für die Lebensmittelanalytik am Beispiel der Gewürze* (Lebensmittelchemie, 1. Aufl.). Zugl.: Hamburg, Univ., Diss., 2011. München: Verl. Dr. Hut.
- Frackman, S., Kobs, G., Simpson, D. & Storts, D. (1998). Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. *Promega notes*, 65(27-29), 27–29.
- Gang-Ping Xue, Jennifer S Johnson & Brian P Dalrymple. (1999). High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Journal of microbiological methods*, 34(3), 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(98\)00087-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00087-6)
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(39), E2579-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Gong, C., Martins, A., Bongiorno, P., Glickman, M. & Shuman, S. (2004). Biochemical and genetic analysis of the four DNA ligases of mycobacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 20594–20606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401841200>
- Gräwert, T., Fischer, M. & Bacher, A. (2013). Structures and reaction mechanisms of GTP cyclohydrolases. *IUBMB Life*, 65(4), 310–322. <https://doi.org/10.1002/iub.1153>
- Gros, P.-A., Le Nagard, H. & Tenaillon, O. (2009). The evolution of epistasis and its links with genetic robustness, complexity and drift in a phenotypic model of adaptation. *Genetics*, 182(1), 277–293.
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R. & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), W70-4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
- Guo, J., Wang, T., Guan, C., Liu, B., Luo, C., Xie, Z. et al. (2018). Improved sgRNA design in bacteria via genome-wide activity profiling. *Nucleic Acids Research*, 46(14), 7052–7069. <https://doi.org/10.1093/nar/gky572>
- Gutiérrez-Preciado, A., Torres, A. G., Merino, E., Bonomi, H. R., Goldbaum, F. A. & García-Angulo, V. A. (2015). Extensive Identification of Bacterial Riboflavin Transporters and Their Distribution across Bacterial Species. *PloS One*, 10(5), e0126124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126124>
- Haase, I., Sarge, S., Illarionov, B., Laudert, D., Hohmann, H.-P., Bacher, A. et al. (2013). Enzymes from the haloacid dehalogenase (HAD) superfamily catalyse the elusive dephosphorylation step of riboflavin biosynthesis. *Chembiochem : a European Journal of Chemical Biology*, 14(17), 2272–2275. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300544>
- Hahn, H., Falke, D. & Klein, P. (Hrsg.). (1991). *Medizinische Mikrobiologie* (Springer-Lehrbuch). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-08626-1>
- Hamilton, C. M., Aldea, M., Washburn, B. K., Babitzke, P. & Kushner, S. R. (1989). New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 171(9), 4617–4622. <https://doi.org/10.1128/jb.171.9.4617-4622.1989>
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Harzer, G., Rokos, H., Otto, M. K., Bacher, A., Gishla, S. & Ghisla, S. (1978). Biosynthesis of riboflavin 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine 5'-phosphate is not a substrate for riboflavin synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 540(1), 48–54. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(78\)90433-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(78)90433-6)
- Hasan, M. S., Wu, X. & Zhang, L. (2015). Performance evaluation of indel calling tools using real short-read data. *Human genomics*, 9(1), 20.

- Hasnain, G., Roje, S., Sa, N., Zallot, R., Ziemak, M. J., Crécy-Lagard, V. de et al. (2016). Bacterial and plant HAD enzymes catalyse a missing phosphatase step in thiamin diphosphate biosynthesis. *The Biochemical Journal*, 473(2), 157–166. <https://doi.org/10.1042/BJ20150805>
- Hayhurst, E. J., Kailas, L., Hobbs, J. K. & Foster, S. J. (2008). Cell wall peptidoglycan architecture in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(38), 14603–14608. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804138105>
- Hayward, A. C. (1993). The hosts of *Xanthomonas*. In J. G. Swings & E. L. Civerolo (Hrsg.), *Xanthomonas* (S. 1–119). Dordrecht: Chapman & Hall. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1526-1_1
- Heap, J. T., Ehsaan, M., Cooksley, C. M., Ng, Y.-K., Cartman, S. T., Winzer, K. et al. (2012). Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker. *Nucleic Acids Research*, 40(8), e59. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1321>
- Heberer, B. (2015). *Grüne Gentechnik. Hintergründe, Chancen und Risiken* (essentials). Wiesbaden: Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-658-09392-1>
- Hemberger, S., Pedrolli, D. B., Stolz, J., Vogl, C., Lehmann, M. & Mack, M. (2011). RibM from *Streptomyces davawensis* is a riboflavin/roseoflavin transporter and may be useful for the optimization of riboflavin production strains. *BMC biotechnology*, 11(1), 119.
- Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M. D., Cortopassi, G. & Galas, D. J. (1989). A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 17(16), 6545–6551. <https://doi.org/10.1093/nar/17.16.6545>
- Hendel, A., Kildebeck, E. J., Fine, E. J., Clark, J., Punjya, N., Sebastiano, V. et al. (2014). Quantifying genome-editing outcomes at endogenous loci with SMRT sequencing. *Cell Reports*, 7(1), 293–305. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.040>
- Hiroyuki, S. & Susumu, K. (1981). New restriction endonucleases from *Flavobacterium okeanokoites* (FokI) and *Micrococcus luteus* (MluI). *Gene*, 16(1-3), 73–78. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(81\)90062-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(81)90062-7)
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1), 51–59. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90358-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90358-2)
- Hollander, I. & Brown, G. M. (1979). Biosynthesis of riboflavin: Reductase and deaminase of *Ashbya gossypii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 89(2), 759–763. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(79\)90694-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)90694-6)
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989). Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77(1), 61–68. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90359-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90359-4)
- Horvath, P. & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5962), 167–170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>
- Hruscha, A., Krawitz, P., Rechenberg, A., Heinrich, V., Hecht, J., Haass, C. et al. (2013). Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development*, 140(24), 4982–4987.
- Hsieh, W.-Y., Liao, J.-C., Wang, H.-T., Hung, T.-H., Tseng, C.-C., Chung, T.-Y. et al. (2017). The *Arabidopsis* thiamin-deficient mutant pale green1 lacks thiamin monophosphate phosphatase of the vitamin B1 biosynthesis pathway. *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology*, 91(1), 145–157. <https://doi.org/10.1111/tpj.13552>
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V. et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), 827–832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>

- Huang, H., Chai, C., Li, N., Rowe, P., Minton, N. P., Yang, S. et al. (2016). CRISPR/Cas9-Based Efficient Genome Editing in *Clostridium ljungdahlii*, an Autotrophic Gas-Fermenting Bacterium. *ACS Synthetic Biology*, 5(12), 1355–1361. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00044>
- Huang, H., Zheng, G., Jiang, W., Hu, H. & Lu, Y. (2015). One-step high-efficiency CRISPR/Cas9-mediated genome editing in *Streptomyces*. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 47(4), 231–243. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv007>
- Im Solov'eva, Iomantas, I., Kreneva, R. A., Kozlov, I. & Perumov, D. A. (1997). Cloning of ribR, an additional regulatory gene of the *Bacillus subtilis* riboflavin operon. *Genetika*, 33(6), 739–743.
- IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry.. *International Union of Pure and Applied Chemistry*. Zugriff am 06.12.2022. Verfügbar unter: <https://iupac.org/>
- Jansen, R., van Embden, J. D. A., Gaastra, W. & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jensen, M. A., Fukushima, M. & Davis, R. W. (2010). DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PloS One*, 5(6), e11024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011024>
- F. Jiang, K. Zhou, L. Ma, S. Gressel & J. Doudna. (2015). STRUCTURAL BIOLOGY. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6242), 1477–1481. <https://doi.org/10.1126/science.aab1452>
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(3), 233–239. <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>
- Y. Jiang, B. Chen, C. Duan, B. Sun, J. Yang & S. Yang. (2015). Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2506–2514. <https://doi.org/10.1128/AEM.04023-14>
- 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 (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E. & Doudna, J. (2013). RNA-programmed genome editing in human cells. *ELife*, 2, e00471. <https://doi.org/10.7554/eLife.00471>
- Karakousis, G., Ye, N., Li, Z., Chiu, S. K., Reddy, G. & Radding, C. M. (1998). The beta protein of phage λ binds preferentially to an intermediate in DNA renaturation. *Journal of molecular biology*, 276(4), 721–731.
- Karu, A. E., Sakaki, Y., Echols, H. & Linn, S. (1975). The gamma protein specified by bacteriophage gamma. Structure and inhibitory activity for the recBC enzyme of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 250(18), 7377–7387.
- Kildegaard, K. R., Tramontin, L. R. R., Chekina, K., Li, M., Goedecke, T. J., Kristensen, M. et al. (2019). CRISPR/Cas9-RNA interference system for combinatorial metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 36(5), 237–247. <https://doi.org/10.1002/yea.3390>
- Kim, D., Alptekin, B. & Budak, H. (2018). CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Functional & integrative genomics*, 18(1), 31–41.
- Kim, H. & Kim, J.-S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 15(5), 321–334. <https://doi.org/10.1038/nrg3686>

- Kim, J.-S., Lee, H. J. & Carroll, D. (2010). Genome editing with modularly assembled zinc-finger nucleases. *Nature Methods*, 7(2), 91; author reply 91-2. <https://doi.org/10.1038/nmeth0210-91a>
- Kim, Y. G., Cha, J. & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1156–1160. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>
- Kim, Y. G. & Chandrasegaran, S. (1994). Chimeric restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(3), 883–887. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.3.883>
- Kinoshita, Shukuo, Udaka, Shigezo, Shimono & Masakazu. (1957). Studies on the amino acid fermentation. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 3(3), 193–205. <https://doi.org/10.2323/jgam.3.193>
- Kis, K., Volk, R. & Bacher, A. (1995). Biosynthesis of riboflavin. Studies on the reaction mechanism of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase. *Biochemistry*, 34(9), 2883–2892. <https://doi.org/10.1021/bi00009a019>
- Kmiec, E. & Holloman, W. K. (1981). Beta protein of bacteriophage lambda promotes renaturation of DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 256(24), 12636–12639.
- Kobayashi, K., Ehrlich, S. D., Albertini, A., Amati, G., Andersen, K. K., Arnaud, M. et al. (2003). Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4678–4683. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730515100>
- Kocak, D. D., Josephs, E. A., Bhandarkar, V., Adkar, S. S., Kwon, J. B. & Gersbach, C. A. (2019). Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures. *Nature Biotechnology*, 37(6), 657–666. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0095-1>
- Koo, B.-M., Kritikos, G., Farelli, J. D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H. et al. (2017). Construction and Analysis of Two Genome-Scale Deletion Libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Systems*, 4(3), 291–305.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.12.013>
- Koonin, E. V. & Tatusov, R. L. (1994). Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity: application of an iterative approach to database search. *Journal of molecular biology*, 244(1), 125–132.
- Koser, S. A. (1968). Vitamin requirements of bacteria and yeasts. Springfield, IL, USA: Charles C. Thomas., 663 pp.
- Kusaoke, H., Hayashi, Y., Kadowaki, Y. & Kimoto, H. (1989). Optimum Conditions for Electric Pulse-mediated Gene Transfer to *Bacillus subtilis* Cells. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(9), 2441–2446. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869689>
- Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Gonzalez, C. F., Brown, G., Omelchenko, M. V., Borozan, I. et al. (2006). Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(47), 36149–36161. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605449200>
- Latham, J. R., Wilson, A. K. & Steinbrecher, R. A. (2006). The mutational consequences of plant transformation. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2006(2), 25376. <https://doi.org/10.1155/JBB/2006/25376>
- Leenay, R. T., Vento, J. M., Shah, M., Martino, M. E., Leulier, F. & Beisel, C. L. (2019). Genome Editing with CRISPR-Cas9 in *Lactobacillus plantarum* Revealed That Editing Outcomes Can Vary Across Strains and Between Methods. *Biotechnology Journal*, 14(3), e1700583. <https://doi.org/10.1002/biot.201700583>
- Lenhart, J. S., Schroeder, J. W., Walsh, B. W. & Simmons, L. A. (2012). DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(3), 530–564.

- Leyns, F., Cleene, M. de, Swings, J.-G. & Ley, J. de. (1984). The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botanical Review*, 50(3), 308–356. <https://doi.org/10.1007/BF02862635>
- Li, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*, 27(21), 2987–2993. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr509>
- Li, Q., Sun, B., Chen, J., Zhang, Y., Jiang, Y. & Yang, S. (2021). A modified pCas/pTargetF system for CRISPR-Cas9-assisted genome editing in *Escherichia coli*. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 53(5), 620–627. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmab036>
- Lian, C.-A., Yan, G.-Y., Huang, J.-M., Danchin, A., Wang, Y. & He, L.-S. (2020). Genomic Characterization of a Novel Gut Symbiont From the Hadal Snailfish. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2978. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02978>
- Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 1–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.r700039200>
- Ling, M. M. & Robinson, B. H. (1997). Approaches to DNA Mutagenesis: An Overview. *Analytical biochemistry*, 254(2), 157–178. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2428>
- Lingens, F., Oltmanns, O. & Bacher, A. (1967). Über Zwischenprodukte der Riboflavin-Biosynthese bei *Saccharomyces cerevisiae*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 22(7), 755–758. <https://doi.org/10.1515/znb-1967-0715>
- Little, J. W. (1967). An exonuclease induced by bacteriophage lambda. II. Nature of the enzymatic reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 242(4), 679–686.
- Litwack, G. (2018). *Human biochemistry*. London, U.K.: Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Liu, G., Zhang, Y. & Zhang, T. (2020). Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.11.006>
- Liu, H., Wei, Z., Dominguez, A., Li, Y., Wang, X. & Qi, L. S. (2015). CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(22), 3676–3678. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv423>
- Liu, P., Long, L., Xiong, K., Yu, B., Chang, N., Xiong, J.-W. et al. (2014). Heritable/conditional genome editing in *C. elegans* using a CRISPR-Cas9 feeding system. *Cell Research*, 24(7), 886–889. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.73>
- London, N., Farelli, J. D., Brown, S. D., Liu, C., Huang, H., Korczynska, M. et al. (2015). Covalent docking predicts substrates for haloalkanoate dehalogenase superfamily phosphatases. *Biochemistry*, 54(2), 528–537. <https://doi.org/10.1021/bi501140k>
- Lorenz, M. G. & Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews*, 58(3), 563–602.
- Lovett, S. T., Hurley, R. L., Suter, V. A., Aubuchon, R. H. & Lebedeva, M. A. (2002). Crossing over between regions of limited homology in *Escherichia coli*: RecA-dependent and RecA-independent pathways. *Genetics*, 160(3), 851–859.
- Luo, Z., Guo, Y., Liu, J., Qiu, H., Zhao, M., Zou, W. et al. (2016). Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–12.
- Lusetti, S. L. & Cox, M. M. (2002). The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 71–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.083101.133940>

- Mack, M., van Loon, A. P. G. M. & Hohmann, H.-P. (1998). Regulation of Riboflavin Biosynthesis in *Bacillus subtilis* Is Affected by the Activity of the Flavokinase/Flavin Adenine Dinucleotide Synthetase Encoded by *ribC*. *Journal of Bacteriology*, 180(4), 950–955.
- MacLean, R. C. (2010). Predicting epistasis: an experimental test of metabolic control theory with bacterial transcription and translation. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(3), 488–493. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2009.01888.x>
- Mahfouz, M. M., Li, L., Shamimuzzaman, M., Wibowo, A., Fang, X. & Zhu, J.-K. (2011). De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2623–2628. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019533108>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J. et al. (2020). Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews. Microbiology*, 18(2), 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S. et al. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology*, 31(9), 833–838. <https://doi.org/10.1038/nbt.2675>
- Malina, A., Cameron, C. J. F., Robert, F., Blanchette, M., Dostie, J. & Pelletier, J. (2015). PAM multiplicity marks genomic target sites as inhibitory to CRISPR-Cas9 editing. *Nature Communications*, 6(1), 10124. <https://doi.org/10.1038/ncomms10124>
- Mandel, M. & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology*, 53(1), 159–162. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90051-3)
- Massey, V. (2000). The Chemical and Biological Versatility of Riboflavin. *Biochemical Society Transactions*, 28(4), 283–296. <https://doi.org/10.1042/bst0280283>
- McDonald, I. R., Riley, P. W., Sharp, R. J. & McCarthy, A. J. (1995). Factors affecting the electroporation of *Bacillus subtilis*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 79(2), 213–218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb00937.x>
- McInerney, P., Adams, P. & Hadi, M. Z. (2014). Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Molecular Biology International*, 2014, 287430. <https://doi.org/10.1155/2014/287430>
- Meddeb-Mouelhi, F., Dulcey, C. & Beauregard, M. (2012). High transformation efficiency of *Bacillus subtilis* with integrative DNA using glycine betaine as osmoprotectant. *Analytical Biochemistry*, 424(2), 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.01.032>
- Michel, B. & Ehrlich, S. D. (1984). Recombination efficiency is a quadratic function of the length of homology during plasmid transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts and *Escherichia coli* competent cells. *The EMBO journal*, 3(12), 2879–2884.
- Michel, B. & Leach, D. (2012). Homologous Recombination-Enzymes and Pathways. *EcoSal Plus*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.7.2.7>
- Mingfu Ling, M. & Robinson, B. H. (2002). Site Directed Deletion, Insertion, and Substitution using PCR. In R. C. Bird & B. F. Smith (Hrsg.), *Genetic Library Construction and Screening: Advanced Techniques and Applications* (S. 33–53). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-56408-6_3
- Mironov, V. N., Kraev, A. S., Chikindas, M. L., Chernov, B. K., Stepanov, A. I. & Skryabin, K. G. (1994). Functional organization of the riboflavin biosynthesis operon from *Bacillus subtilis* SHgw. *Molecular & General Genetics: MGG*, 242(2), 201–208. <https://doi.org/10.1007/bf00391014>

- Mironov, V. N., Perumov, D. A., Krayev, A. S., Stepanov, A. I. & Skryabin, K. G. (1990). Unusual structure of *Bacillus subtilis* rib-operon regulatory region. *Molecular Biology/Molekulyarnaya Biologiya(Moscow)*, 24(1), 256–261.
- Moeller, R., Stackebrandt, E., Reitz, G., Berger, T., Rettberg, P., Doherty, A. J. et al. (2007). Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *Bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono- and polychromatic UV, and ionizing radiation. *Journal of Bacteriology*, 189(8), 3306–3311. <https://doi.org/10.1128/JB.00018-07>
- 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 (Reading, England)*, 155(Pt 3), 733–740. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>
- 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*, 60(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Mojica, F. J. M. & Garrett, R. A. (2013). Discovery and seminal developments in the CRISPR field. In *CRISPR-Cas Systems* (S. 1–31). Springer.
- Morabbi Heravi, K., Manzoor, I., Watzlawick, H., Jong, A. de, Kuipers, O. P. & Altenbuchner, J. (2019). Phosphosugar Stress in *Bacillus subtilis*: Intracellular Accumulation of Mannose 6-Phosphate Derepressed the *glcR-phoC* Operon from Repression by *GlcR*. *Journal of Bacteriology*, 201(9). <https://doi.org/10.1128/JB.00732-18>
- Moreb, E. A., Hoover, B., Yaseen, A., Valyasevi, N., Roecker, Z., Menacho-Melgar, R. et al. (2017). Managing the SOS Response for Enhanced CRISPR-Cas-Based Recombineering in *E. coli* through Transient Inhibition of Host *RecA* Activity. *ACS Synthetic Biology*, 6(12), 2209–2218. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00174>
- Mörthl, S., Fischer, M., Richter, G., Tack, J., Weinkauff, S. & Bacher, A. (1996). Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(52), 33201–33207. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33201>
- Mosberg, J. A., Lajoie, M. J. & Church, G. M. (2010). Lambda red recombineering in *Escherichia coli* occurs through a fully single-stranded intermediate. *Genetics*, 186(3), 791–799. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120782>
- Moscou, M. J. & Bogdanove, A. J. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5959), 1501. <https://doi.org/10.1126/science.1178817>
- Mougiakos, I., Bosma, E. F., Vos, W. M. de, van Kranenburg, R. & van der Oost, J. (2016). Next Generation Prokaryotic Engineering: The CRISPR-Cas Toolkit. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.004>
- Müller, H.-J. & Prange, D. R. (2016). *PCR - Polymerase-Kettenreaktion* (2. Auflage). Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-48236-0>
- Murphy, K. C. (1998). Use of Bacteriophage λ Recombination Functions To Promote Gene Replacement in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(8), 2063–2071. <https://doi.org/10.1128/JB.180.8.2063-2071.1998>
- Murphy, K. C., Campellone, K. G. & Poteete, A. R. (2000). PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene*, 246(1-2), 321–330. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00071-8)
- Nadin-Davis, S. A. & Chang, S. C. (1998). Site-directed mutagenesis of large plasmids. *Bio-Techniques*, 25(6), 1014–1019. <https://doi.org/10.2144/98256st04>
- Neu, H. C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257(5073), 1064–1073. <https://doi.org/10.1126/science.257.5073.1064>

- Neuberger, G. & Bacher, A. (1986). Biosynthesis of riboflavin. enzymatic formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 139(3), 1111–1116. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(86\)80292-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(86)80292-3)
- Nielsen, P., Neuberger, G., Fujii, I., Bown, D. H., Keller, P. J., Floss, H. G. et al. (1986). Biosynthesis of riboflavin. Enzymatic formation of 6, 7-dimethyl-8-ribityllumazine from pentose phosphates. *The Journal of biological chemistry*, 261(8), 3661–3669.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N. et al. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Niu, T., Lv, X., Liu, Y., Li, J., Du, G., Ledesma-Amaro, R. et al. (2021). The elucidation of phosphosugar stress response in *Bacillus subtilis* guides strain engineering for high N-acetylglucosamine production. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(1), 383–396. <https://doi.org/10.1002/bit.27577>
- Northrop-Clewes, C. A. & Thurnham, D. I. (2012). The discovery and characterization of riboflavin. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 61(3), 224–230. <https://doi.org/10.1159/000343111>
- O'Brien, P. J. & Herschlag, D. (1999). Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chemistry & Biology*, 6(4), R91-R105. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(99\)80033-7](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(99)80033-7)
- Oh, J.-H. & van Pijkeren, J.-P. (2014). CRISPR-Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*. *Nucleic Acids Research*, 42(17), e131. <https://doi.org/10.1093/nar/gku623>
- Ohse, M., Kawade, K. & Kusaoke, H. (1997). Effects of DNA topology on transformation efficiency of *Bacillus subtilis* ISW1214 by electroporation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(6), 1019–1021.
- Oraei, M., Razavi, S. H. & Khodaiyan, F. (2018). Optimization of Effective Minerals on Riboflavin Production by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051 Using Statistical Designs. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 10(1), 49–55.
- Orlando, S. J., Santiago, Y., DeKaveler, R. C., Freyvert, Y., Boydston, E. A., Moehle, E. A. et al. (2010). Zinc-finger nuclease-driven targeted integration into mammalian genomes using donors with limited chromosomal homology. *Nucleic Acids Research*, 38(15), e152. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq512>
- Osina, N. K., Kalambet, I. & Aleksandrov, A. A. (1985). Transcription of the riboflavin operon in *Bacillus subtilis*. *Doklady Akademii nauk SSSR*, 282(3), 737–740.
- Packeiser, H., Lim, C., Balagurunathan, B., Wu, J. & Zhao, H. (2013). An extremely simple and effective colony PCR procedure for bacteria, yeasts, and microalgae. *Applied biochemistry and biotechnology*, 169(2), 695–700.
- Pedrolli, D., Langer, S., Hobl, B., Schwarz, J., Hashimoto, M. & Mack, M. (2015). The ribB FMN riboswitch from *Escherichia coli* operates at the transcriptional and translational level and regulates riboflavin biosynthesis. *The FEBS Journal*, 282(16), 3230–3242. <https://doi.org/10.1111/febs.13226>
- Perkins, J. B., Sloma, A., Hermann, T., Theriault, K., Zachgo, E., Erdenberger, T. et al. (1999). Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22(1), 8–18. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900587>
- Plaut, G. W.E. (1963). Studies on the nature of the enzymic conversion of 6, 7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *The Journal of biological chemistry*, 238(6), 2225–2243.

- Plaut, G.W.E. & Harvey, R. A. (1971) [157] The enzymatic synthesis of riboflavin. In *Vitamins and Coenzymes* (Methods in Enzymology, Bd. 18, S. 515–538). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(71\)18114-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(71)18114-1)
- 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 (Reading, England)*, 151(Pt 3), 653–663. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>
- Pyne, M. E., Moo-Young, M., Chung, D. A. & Chou, C. P. (2015). Coupling the CRISPR/Cas9 System with Lambda Red Recombineering Enables Simplified Chromosomal Gene Replacement in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 5103–5114. <https://doi.org/10.1128/AEM.01248-15>
- Rahmer, R., Morabbi Heravi, K. & Altenbuchner, J. (2015). Construction of a Super-Competent *Bacillus subtilis* 168 Using the P *mtlA* -comKS Inducible Cassette. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1431. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01431>
- Ramirez, C. L., Foley, J. E., Wright, D. A., Müller-Lerch, F., Rahman, S. H., Cornu, T. I. et al. (2008). Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nature Methods*, 5(5), 374–375. <https://doi.org/10.1038/nmeth0508-374>
- Rawat, R., Sandoval, F. J., Wei, Z., Winkler, R. & Roje, S. (2011). An FMN hydrolase of the haloacid dehalogenase superfamily is active in plant chloroplasts. *The Journal of biological chemistry*, 286(49), 42091–42098.
- Razzaq, A. & Masood, A. (2018). CRISPR/Cas9 System: A Breakthrough in Genome Editing. *Mol Biol*, 7(210), 2.
- Revuelta, J. L., Ledesma-Amaro, R., Lozano-Martinez, P., Díaz-Fernández, D., Buey, R. M. & Jiménez, A. (2017). Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44(4-5), 659–665. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1842-7>
- Richter, G., Fischer, M., Krieger, C., Eberhardt, S., Lüttgen, H., Gerstenschläger, I. et al. (1997a). Biosynthesis of riboflavin: characterization of the bifunctional deaminase-reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 179(6), 2022–2028. <https://doi.org/10.1128/jb.179.6.2022-2028.1997>
- Richter, G., Krieger, C., Volk, R., Kis, K., Ritz, H., Götze, E. et al. (1997b) [34] Biosynthesis of riboflavin: 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase. In D. B. MacCormick (Ed.), *Vitamins and coenzymes* (Methods in Enzymology, vol. 280, S. 374–382). San Diego, Calif.: Acad. Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)80128-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)80128-0)
- Richter, G., Ritz, H., Katzenmeier, G., Volk, R., Kohnle, A., Lottspeich, F. et al. (1993). Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, mapping, and expression of the gene coding for GTP cyclohydrolase II in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 175(13), 4045–4051. <https://doi.org/10.1128/jb.175.13.4045-4051.1993>
- Richter, G., Volk, R., Krieger, C., Lahm, H. W., Röthlisberger, U. & Bacher, A. (1992). Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, and expression of the gene coding for 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174(12), 4050–4056. <https://doi.org/10.1128/jb.174.12.4050-4056.1992>
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. et al. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, 29(1), 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>
- Rocha, E. P. C., Cornet, E. & Michel, B. (2005). Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS Genetics*, 1(2), e15. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010015>

- Rodbard, D. (1981). Mathematics and statistics of ligand assays: an illustrated guide. *Ligand Assay: analysis of international developments on isotopic and nonisotopic immunoassay*, 45–99.
- Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M. (1994). Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular and Cellular Biology*, 14(12), 8096–8106. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.12.8096>
- Sa, N., Rawat, R., Thornburg, C., Walker, K. D. & Roje, S. (2016). Identification and characterization of the missing phosphatase on the riboflavin biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 88(5), 705–716. <https://doi.org/10.1111/tpj.13291>
- Sadaie, Y. & Kada, T. (1983). Formation of competent *Bacillus subtilis* cells. *Journal of Bacteriology*, 153(2), 813.
- Sakuma, T., Nishikawa, A., Kume, S., Chayama, K. & Yamamoto, T. (2014). Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Scientific Reports*, 4, 5400. <https://doi.org/10.1038/srep05400>
- Salomon, S. & Puchta, H. (1998). Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *The EMBO Journal*, 17(20), 6086–6095. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.20.6086>
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sander, J. D. & Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature Biotechnology*, 32(4), 347–355. <https://doi.org/10.1038/nbt.2842>
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sarge, S. (2015a). *Untersuchungen zur Riboflavinbiosynthese – Identifizierung und Charakterisierung der Phosphatase und Entwicklung antimikrobieller Leitstrukturen am Beispiel des lebensmittelpathogenen Bakteriums *Listeria monocytogenes** (Lebensmittelchemie, 1. Aufl.). Zugl.: Hamburg, Univ., FB Chemie, Diss., 2015. München: Dr. Hut. Verfügbar unter: <http://www.dr.hut-verlag.de/978-3-8439-2305-7.html>
- Sarge, S., Haase, I., Illarionov, B., Laudert, D., Hohmann, H.-P., Bacher, A. et al. (2015b). Catalysis of an Essential Step in Vitamin B2 Biosynthesis by a Consortium of Broad Spectrum Hydrolases. *Chembiochem : a European Journal of Chemical Biology*, 16(17), 2466–2469. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500352>
- Sauer, N. J., Mozoruk, J., Miller, R. B., Warburg, Z. J., Walker, K. A., Beetham, P. R. et al. (2016). Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotechnology Journal*, 14(2), 496–502. <https://doi.org/10.1111/pbi.12496>
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Hohmann, H. P., Manneberg, M., van Loon, A. P. & Bailey, J. E. (1996). Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(10), 3687–3696. <https://doi.org/10.1128/aem.62.10.3687-3696.1996>
- Scharf, A., Lang, C. & Fischer, M. (2020). Genetic authentication: Differentiation of fine and bulk cocoa (*Theobroma cacao* L.) by a new CRISPR/Cas9-based in vitro method. *Food Control*, 114, 107219. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107219>
- Schwechheimer, S. K., Park, E. Y., Revuelta, J. L., Becker, J. & Wittmann, C. (2016). Biotechnology of riboflavin. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(5), 2107–2119.
- Sedlmaier, H., Müller, F., Keller, P. J. & Bacher, A. (1987). Enzymatic synthesis of riboflavin and FMN specifically labeled with ¹³C in the xylene ring. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 42(4), 425–429.

- Segrè, D., Deluna, A., Church, G. M. & Kishony, R. (2005). Modular epistasis in yeast metabolism. *Nature Genetics*, 37(1), 77–83. <https://doi.org/10.1038/ng1489>
- Seifried, A., Schultz, J. & Gohla, A. (2013). Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *The FEBS Journal*, 280(2), 549–571. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08633.x>
- Semenova, E., Jore, M. M., Datsenko, K. A., Semenova, A., Westra, E. R., Wanner, B. et al. (2011). Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), 10098–10103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104144108>
- Sharan, S. K., Thomason, L. C., Kuznetsov, S. G. & Court, D. L. (2009). Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nature Protocols*, 4(2), 206–223. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.227>
- Shevchuk, N. A., Bryksin, A. V., Nusinovich, Y. A., Cabello, F. C., Sutherland, M. & Ladisch, S. (2004). Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Research*, 32(2), e19-e19.
- Shils, M. E. & Shike, M. (2006). *Modern nutrition in health and disease* (10th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Retrieved from [http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=booktext&NEWS=N&DF=bookdb&AN=00140038/10th_Edition/5&XPATH=/PG\(0\)](http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=booktext&NEWS=N&DF=bookdb&AN=00140038/10th_Edition/5&XPATH=/PG(0))
- Shuman, S. & Glickman, M. S. (2007). Bacterial DNA repair by non-homologous end joining. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(11), 852–861. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1768>
- Singh, S., Gupta, S. K., Nischal, A., Khattri, S., Nath, R., Pant, K. K. et al. (2012). Design of potential siRNA molecules for hepatitis delta virus gene silencing. *Bioinformatics*, 8(16), 749–757. <https://doi.org/10.6026/97320630008749>
- Sklyarova, S. A. & Mironov, A. S. (2014). Bacillus subtilis ypaA gene regulation mechanism by FMN riboswitch. *Russian Journal of Genetics*, 50(3), 319–322. <https://doi.org/10.1134/S1022795414030089>
- Smith, G. R. (1991). Conjugal recombination in E. coli: Myths and mechanisms. *Cell*, 64(1), 19–27. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90205-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90205-D)
- Solovieva, I. M., Kreneva, R. A., Leak, D. J. & Perumov, D. A. (1999). The ribR gene encodes a monofunctional riboflavin kinase which is involved in regulation of the Bacillus subtilis riboflavin operon. *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 1), 67–73. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-1-67>
- Sprink, T., Eriksson, D., Schiemann, J. & Hartung, F. (2016). Regulatory hurdles for genome editing: process-vs. product-based approaches in different regulatory contexts. *Plant cell reports*, 35(7), 1493–1506.
- Srivastava, R., Kaur, A., Sharma, C. & Karthikeyan, S. (2018). Structural characterization of ribT from Bacillus subtilis reveals it as a GCN5-related N-acetyltransferase. *Journal of structural biology*, 202(1), 70–81.
- Stahmann, K. P., Revuelta, J. L. & Seulberger, H. (2000). Three biotechnical processes using Ashbya gossypii, Candida famata, or Bacillus subtilis compete with chemical riboflavin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 509–516. <https://doi.org/10.1007/s002530051649>
- Sternberg, N. & Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination: I. Recombination between loxP sites. *Journal of molecular biology*, 150(4), 467–486.
- Sternberg, S. H. & Doudna, J. A. (2015). Expanding the Biologist's Toolkit with CRISPR-Cas9. *Molecular Cell*, 58(4), 568–574. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.032>

- Stewart, G. J. & Carlson, C. A. (1986). The biology of natural transformation. *Annual Reviews in Microbiology*, 40(1), 211–231.
- Stifel, F. B. & Herman, R. H. (1972). Role of isozymes in metabolic control. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 25(6), 606–611. <https://doi.org/10.1093/ajcn/25.6.606>
- Stratton, C. W. (2000). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Le Journal Medical Libanais. the Lebanese Medical Journal*, 48(4), 186–198.
- Studier, F.W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Sunguroğlu, C., Sezgin, D. E., Aytar Çelik, P. & Çabuk, A. (2018). Higher titer hyaluronic acid production in recombinant *Lactococcus lactis*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 48(8), 734–742. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1508036>
- Suzuki, N., Tsuge, Y., Inui, M. & Yukawa, H. (2005). Cre/loxP-mediated deletion system for large genome rearrangements in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(2), 225–233. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1772-6>
- Taketo, A. (1988). DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 949(3), 318–324. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(88\)90158-3](https://doi.org/10.1016/0167-4781(88)90158-3)
- Terakawa, A., Natsume, A., Okada, A., Nishihata, S., Kuse, J., Tanaka, K. et al. (2016). *Bacillus subtilis* 5'-nucleotidases with various functions and substrate specificities. *BMC Microbiology*, 16(1), 249. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0866-5>
- Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T. & Mesirov, J. P. (2013). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, 14(2), 178–192. <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
- Tycko, J., Myer, V. E. & Hsu, P. D. (2016). Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity. *Molecular Cell*, 63(3), 355–370. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.004>
- Typas, A., Nichols, R. J., Siegele, D. A., Shales, M., Collins, S. R., Lim, B. et al. (2008). High-throughput, quantitative analyses of genetic interactions in *E. coli*. *Nature Methods*, 5(9), 781–787. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1240>
- Vagner, V. & Ehrlich, S. D. (1988). Efficiency of homologous DNA recombination varies along the *Bacillus subtilis* chromosome. *Journal of Bacteriology*, 170(9), 3978–3982. <https://doi.org/10.1128/jb.170.9.3978-3982.1988>
- Van der Els, S., James, J. K., Kleerebezem, M. & Bron, P. A. (2018). Versatile Cas9-Driven Subpopulation Selection Toolbox for *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(8). <https://doi.org/10.1128/AEM.02752-17>
- Van der Oost, J., Jore, M. M., Westra, E. R., Lundgren, M. & Brouns, S. J. J. (2009). CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(8), 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.05.002>
- Van Loon, A. P., Hohmann, H.-P., Bretzel, W., Hübner, M. & Pfister, M. (1996). Development of a fermentation process for the manufacture of riboflavin. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 50(9), 410–412.
- Vega, M. de. (2013). The minimal *Bacillus subtilis* nonhomologous end joining repair machinery. *PloS One*, 8(5), e64232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064232>
- Vento, J. M., Crook, N. & Beisel, C. L. (2019). Barriers to genome editing with CRISPR in bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(9-10), 1327–1341. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02195-1>

- Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2002). Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3141–3151. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf433>
- Vogl, C. (2008). *Die Identifizierung und Charakterisierung zweier bakterieller Riboflavintransporter und des Thiamintransporters der Spalthefe Schizosaccharomyces pombe*.
- Vogl, C., Grill, S., Schilling, O., Stülke, J., Mack, M. & Stolz, J. (2007). Characterization of riboflavin (vitamin B2) transport proteins from *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*, 189(20), 7367–7375. <https://doi.org/10.1128/JB.00590-07>
- Volk, R. & Bacher, A. (1990). Studies on the 4-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3, 4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase. *The Journal of biological chemistry*, 265(32), 19479–19485.
- Waltz, E. (2016). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, 532(7599), 293. <https://doi.org/10.1038/nature.2016.19754>
- Wang, J. & Wilkinson, M. F. (2000). Site-directed mutagenesis of large (13-kb) plasmids in a single-PCR procedure. *BioTechniques*, 29(5), 976–978. <https://doi.org/10.2144/00295bm09>
- Wang, J., Li, J., Zhao, H., Sheng, G., Wang, M., Yin, M. et al. (2015). Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems. *Cell*, 163(4), 840–853. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.008>
- Wang, L. & Zhang, J. (2019). Prediction of sgRNA on-target activity in bacteria by deep learning. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 517. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3151-4>
- Wang, N., Lysenkov, V., Orte, K., Kairisto, V., Aakko, J., Khan, S. et al. (2022). Tool evaluation for the detection of variably sized indels from next generation whole genome and targeted sequencing data. *PLoS Computational Biology*, 18(2), e1009269. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009269>
- Wang, S. T., Setlow, B., Conlon, E. M., Lyon, J. L., Imamura, D., Sato, T. et al. (2006). The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 358(1), 16–37. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.059>
- Watkins, B. A., Davis, A. E., Cocchi, F. & Reitz, M. S. (1993). A rapid method for site-specific mutagenesis using larger plasmids as templates. *BioTechniques*, 15(4), 700–704. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8251172/>
- Weller, G. R., Kysela, B., Roy, R., Tonkin, L. M., Scanlan, E., Della, M. et al. (2002). Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science (New York, N. Y.)*, 297(5587), 1686–1689. <https://doi.org/10.1126/science.1074584>
- Whitworth, K. M., Lee, K., Benne, J. A., Beaton, B. P., Spate, L. D., Murphy, S. L. et al. (2014). Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biology of Reproduction*, 91(3), 78. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121723>
- Wiedenheft, B., van Duijn, E., Bultema, J. B., Bultema, J., Waghmare, S. P., Waghmare, S. et al. (2011). RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(25), 10092–10097. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102716108>
- Wilkinson, R. & Wiedenheft, B. (2014). A CRISPR method for genome engineering. *F1000prime Reports*, 6, 3. <https://doi.org/10.12703/P6-3>
- Wilson, T. E., Topper, L. M. & Palmbo, P. L. (2003). Non-homologous end-joining: bacteria join the chromosome breakdance. *Trends in biochemical sciences*, 28(2), 62–66. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00005-7)

- Winkler, W. C., Cohen-Chalamish, S. & Breaker, R. R. (2002). An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(25), 15908–15913. <https://doi.org/10.1073/pnas.212628899>
- Wirth, N. T., Kozaeva, E. & Nikel, P. I. (2020). Accelerated genome engineering of *Pseudomonas putida* by I-SceI-mediated recombination and CRISPR-Cas9 counterselection. *Microbial Biotechnology*, *13*(1), 233–249. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13396>
- Wong, N., Liu, W. & Wang, X. (2015). WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system. *Genome biology*, *16*(1), 218.
- Wu, X., Scott, D. A., Kriz, A. J., Chiu, A. C., Hsu, P. D., Dadon, D. B. et al. (2014). Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, *32*(7), 670–676. <https://doi.org/10.1038/nbt.2889>
- Wyman, C. & Kanaar, R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annual Review of Genetics*, *40*, 363–383. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090451>
- Xu, C., Wu, K., Zhang, J.-G., Shen, H. & Deng, H.-W. (2017). Low-, high-coverage, and two-stage DNA sequencing in the design of the genetic association study. *Genetic Epidemiology*, *41*(3), 187–197. <https://doi.org/10.1002/gepi.22015>
- Yang, R., Nelson, A. C., Henzler, C., Thyagarajan, B. & Silverstein, K. A. T. (2015). ScanIndel: a hybrid framework for indel detection via gapped alignment, split reads and de novo assembly. *Genome medicine*, *7*(1), 127.
- Yonezawa, A. & Inui, K.-i. (2013). Novel riboflavin transporter family RFVT/SLC52: identification, nomenclature, functional characterization and genetic diseases of RFVT/SLC52. *Molecular aspects of medicine*, *34*(2-3), 693–701.
- Yosef, I., Goren, M. G. & Qimron, U. (2012). Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, *40*(12), 5569–5576. <https://doi.org/10.1093/nar/gks216>
- You, C., Zhang, X.-Z. & Zhang, Y.-H. P. (2012). Simple cloning via direct transformation of PCR product (DNA Multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(5), 1593–1595. <https://doi.org/10.1128/aem.07105-11>
- Young, D. W. (1986). The biosynthesis of the vitamins thiamin, riboflavin, and folic acid. *Natural product reports*, *3*, 395–419.
- Yusupova, Y. R., Skripnikova, V. S., Kivero, A. D. & Zakataeva, N. P. (2020). Expression and purification of the 5'-nucleotidase YitU from *Bacillus* species: its enzymatic properties and possible applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(7), 2957–2972. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10428-y>
- Zerbini, F., Zanella, I., Fraccascia, D., König, E., Irene, C., Frattini, L. F. et al. (2017). Large scale validation of an efficient CRISPR/Cas-based multi gene editing protocol in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, *16*(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0681-1>
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P. et al. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, *163*(3), 759–771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
- Zhang, B.-z., Zhang, X., An, X.-p., Ran, D.-l., Zhou, Y.-s., Lu, J. et al. (2009). An easy-to-use site-directed mutagenesis method with a designed restriction site for convenient and reliable mutant screening. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, *10*(6), 479–482. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820367>
- Zhang, G.-q., Bao, P., Zhang, Y., Deng, A.-h., Chen, N. & Wen, T.-y. (2011). Enhancing electro-transformation competency of recalcitrant *Bacillus amyloliquefaciens* by combining cell-wall weakening and cell-membrane fluidity disturbing. *Analytical Biochemistry*, *409*(1), 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.10.013>

- Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J. P. & Stewart, A. F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genetics*, 20(2), 123–128. <https://doi.org/10.1038/2417>
- Zhang, Z., Ding, Z.-T., Shu, D., Di Luo & Tan, H. (2015). Development of an efficient electroporation method for iturin A-producing *Bacillus subtilis* ZK. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(4), 7334–7351. <https://doi.org/10.3390/ijms16047334>
- Zheng, B., Sage, M., Sheppard, E. A., Jurecic, V. & Bradley, A. (2000). Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2), 648–655. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.2.648-655.2000>
- Zhou, H., Liu, B., Weeks, D. P., Spalding, M. H. & Yang, B. (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Research*, 42(17), 10903–10914.

Eigene Veröffentlichungen

Veröffentlichungen zur Anwendung der CRISPR-Cas9 Methodik

Publikationen (Peer-Review)

Scharf, A.*, Lang, C.*, Fischer, M. Genetic authentication: Differentiation of fine and bulk cocoa (*Theobroma cacao* L.) by a new CRISPR/Cas9-based in vitro method. *Food Control* 2020, 114, 107219. *geteilte Autorenschaft

In Vorbereitung

Scharf, A.*, La-Rostami, F*., Illarionov, B., Nemes, V., Feldmann, A.M., Höft, L., Bacher, A., Fischer, M. Biosynthesis of riboflavin: CRISPR/Cas9-mediated knockouts of the genes *ycsE*, *ywtE* and *yitU* showed that dephosphorylation of the 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidinedione 5'-phosphate must be catalyzed in vivo by more than three phosphatases. *geteilte Autorenschaft

Zeitschriftenbeiträge

Lang, C., **Scharf, A.**, Fischer, M. Lebensmittelauthentifizierung – Anwendung der CRISPR-Cas9-Technologie zur Differenzierung von Edel- und Konsumkakao. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 2021, 117, 194-199.

Scharf, A., Fischer, M. *Genome Editing* - Gezielte Veränderungen des Erbgutes von Lebensmitteln mit Hilfe der CRISPR-Cas9-Technologie. *chrom+food FORUM* 2017, 9, 14-17.

Scharf, A., Fischer, M. CRISPR-Cas9 Technologie: Eine molekulare Schere zur schnellen und gezielten genetischen Veränderung von Lebensmitteln. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 2016, 112, 288-294.

Poster

Scharf, A., Nemes, V., Feldmann, A.M., Rostami, F., Illarionov, B., Fischer, M. *Genome Editing*: Anwendung der CRISPR-Cas9-Technologie zur Aufklärung der Riboflavin-Biosynthese in *Bacillus subtilis*. 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 2018, Berlin, Germany

Scharf, A., Nemes, V., Illarionov, B., Fischer, M. *Genome Editing* unter Verwendung der CRISPR-Cas9-Technologie in *Escherichia coli*. 46. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 2017, Würzburg, Germany

Scharf, A., Nemes, V., Feldmann, A.M., Illarionov, B., Fischer, M. Genome Editing: Implementation of the CRISPR-Cas9 system in *Escherichia coli*. Emerging Science Convention 2017, Hamburg, Germany

Vorträge

Scharf, A., Fischer, M. *Genome Editing*: Anwendung der CRISPR-Cas9-Technologie in *Escherichia coli*. Regionalverbandstagung Nord, 2018, Bremen, Germany

Scharf, A., Fischer, M. *Genome Editing*: Neue Technologien zur genetischen Veränderung von Lebensmitteln. 8. Fachtagung des Nationalen Referenzlabors für gentechnisch veränderte Organismen, 2016, Berlin, Germany

Anhang

Anhangverzeichnis

Anhang 1: Chemikalien, Lösungen, Puffer, Kits, Reagenzien, Materialien und Geräte....	160
Anhang 1.1: Chemikalienverzeichnis.....	160
Anhang 1.2: Verzeichnis der verwendeten Lösungen und Puffer.....	162
Anhang 1.3: Verzeichnis der verwendeten Kits, Reagenzien und Materialien.....	163
Anhang 1.4: Geräteverzeichnis	165
Anhang 2: Vektorkarten	167
Anhang 3: Primer	170
Anhang 4: DNA-Sequenz des <i>Inserts</i> für die Klonierung in pTargetF	174
Anhang 5: DNA-Sequenzen der <i>Donor-Templates</i>	175
Anhang 6: Arbeitsanweisungen	178
Anhang 6.1: Autoklavierbedingungen.....	178
Anhang 6.2: Arbeitsanweisung des E.Z.N.A.® Plasmid DNA-Mini Kits.....	178
Anhang 6.3: Arbeitsanweisung des Monarch® PCR & DNA Cleanup Kits...	179
Anhang 6.4: Arbeitsanweisung des PeqGOLD Gel Extraktions Kits	179
Anhang 6.5: Arbeitsanweisung des Elabscience Vitamin B ₂ ELISA Kits	180
Anhang 7: Weitere Elektropherogramme.....	181
Anhang 8: Ablaufschemata der SDM-PCR-Reaktionen und Lokalisierung der für die Klonierung der <i>Donor-Templates</i> in das Plasmid pJOE8999 genutzten Restriktionsschnittstellen	183
Anhang 9: Ablaufschema der OE-PCR.....	185
Anhang 10: MFE und Sekundärstruktur-Vorhersage der crRNA-Sequenz <i>ribC1</i>	186
Anhang 11: Wachstumskurve <i>B. subtilis</i> NIG1121	187
Anhang 12: Optimierung der Elektroporationsmethode für <i>B. subtilis</i>	188
Anhang 12.1: Bestimmung der Elektroporationseffizienz von <i>B. subtilis</i> unter Anwendung der Transformationsmethode nach Dower et al. ...	188
Anhang 12.2: Erhöhung der Transformationsrate durch den Einsatz osmoprotektiver Substanzen und hoher elektrischer Feldstärken.....	188
Anhang 12.3: Weitere Erhöhung der Transformationsrate durch Zugabe von Zellhüllen-schwächenden Substanzen zum Wachstumsmedium	189
Anhang 13: <i>Genome coverage</i> Plot.....	190

Anhang 14: Visualisierung des zusätzlichen SNPs in den NGS-Daten der Tripledeletionsmutante	191
Anhang 15: REM-Aufnahmen des <i>B. subtilis</i> Wildtypen und der Deletionsmutanten.....	192
Anhang 16: Standardkurve und Messwerte des Riboflavin-ELISAs	193

Anhang 1: Chemikalien, Lösungen, Puffer, Kits, Reagenzien, Materialien und Geräte

Anhang 1.1: Chemikalienverzeichnis

Alle verwendeten Chemikalien wiesen eine hohe molekularbiologische Qualität bzw. eine hohe verfügbare Reinheit auf.



Tabelle 39: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien.




Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
Agar Agar für die Bakteriologie	-	-	-	Carl Roth
Agarose für die DNA Elektrophorese	-	-	-	Serva
L(+)-Arabinose ≥ 99%	-	-	-	Sigma
Calciumchlorid ≥ 98%	-	-	-	Carl Roth
Caseinhydrolysat für die Mikrobiologie	-	-	-	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥ 99,9% für die Molekularbiologie	-	-	-	Sigma
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ≥ 99%	-	-	-	Carl Roth
Essigsäure 100% ROTIPURAN®	GHS02, GHS05	H226, H290, H314	P280, P210, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310	Carl Roth
Ethanol ROTIPURAN® ≥ 99,8%	GHS05, GHS07	H302+H312+H332+H314	P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P310	Carl Roth
D(+)-Glucose wasserfrei	-	-	-	Carl Roth
Glycerin ROTIPURAN® > 99,5%	-	-	-	Carl Roth
Glycin-Betain > 99% für die Biochemie	-	-	-	Honeywell
HEPES ≥ 99,5%	-	-	-	Sigma
Hefeextrakt pulv. für die Bakteriologie	-	-	-	Carl Roth
Kaliumchlorid ≥ 99,5%	-	-	-	Carl Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) ≥ 99% für die Mikrobiologie	-	-	-	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat ≥ 98%	-	-	-	Carl Roth
Kaliumhydrogencarbonat ≥ 99%	-	-	-	Merck
Dikaliumhydrogenphosphat ≥ 98%, wasserfrei	-	-	-	Carl Roth

Substanz	Piktogramme	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
Kanamycinsulfat für die Biochemie	GHS08	H360D	P281, P260, P308+P313	Carl Roth
Magnesiumchlorid ≥ 98%, wasserfrei	-	-	-	Sigma
Magnesiumsulfat ≥ 99%, wasserfrei	-	-	-	Carl Roth
D-Mannit ≥ 98% für die Biochemie	-	-	-	Carl Roth
D(+)-Mannose ≥ 99,5% für die Biochemie	-	-	-	Carl Roth
Natriumchlorid ≥ 99,9%	-	-	-	Carl Roth
Natriumhydroxid ≥ 98%, in Plätzchen	GHS05	H290, H314	P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P308+P310	Carl Roth
PEG 6000 für biochemische Zwecke	-	-	-	Carl Roth
Riboflavin ≥ 97%, für die Biochemie	-	-	-	Carl Roth
D-Sorbit ≥ 98%, für die Biochemie	-	-	-	Carl Roth
Spektinomycin	GHS07	H335, H315, H319	P261, P302+P352, P280, P305+P351, P338	Sigma
Stickstoff, flüssig	GHS04	H280	P403	Linde
DL-Threonin für die Zellkultur	-	-	-	Sigma
Tris ≥ 99,9%	GHS07	H315, H319, H335	P302+P352, P305+P351+P337, P312	Sigma
Tween 80	-	-	-	VWR

Carl Roth = Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
 Honeywell = Honeywell Fluka (Charlotte, North Carolina, USA)
 Linde = Linde GmbH (Pullach, Deutschland)
 Merck = Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
 Sigma = Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)
 Serva = SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
 VWR = VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 40: Definition der GHS-Symbole in Tabelle 39.

Symbolnummer	GHS-Symbol	Bedeutung
GHS02		brandfördernd
GHS04		Gase unter Druck, verdichtete/ verflüssigte/ tiefgekühlt verflüssigte Gase

Symbolnummer	GHS-Symbol	Bedeutung
GHS05		ätzend
GHS07		reizend
GHS08		gesundheitsschädlich

Anhang 1.2: Verzeichnis der verwendeten Lösungen und Puffer

Alle Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und die pH-Werte der verwendeten Puffer mit einem digitalem pH-Meter eingestellt.

Tabelle 41: Verwendete Lösungen und Puffer.

Puffer/ Lösung	Hersteller/Quelle	Zusammensetzung/ Konzentration
Ammoniumchlorid-Lösung	Eigene Herstellung	50 g/L, steril filtriert
Arabinose-Lösung	Eigene Herstellung	1 M Arabinose, steril filtriert
Calciumchlorid-Lösung	Eigene Herstellung	5,6 g/L, steril filtriert
Ethidiumbromid-Lösung	Eigene Herstellung	0,001%
GelRed Nucleic Acid Strain-Lösung	Biotium Inc. (Fremont, California, USA)	3300x
Glucose-Lösung	Eigene Herstellung	20%
Glucose-Lösung zur Herstellung des Minimal-Mediums	Eigene Herstellung	6 g/10 mL, steril filtriert
Hepes	Eigene Herstellung	1 M
IPTG-Lösung	Eigene Herstellung	10 mM IPTG
Magnesiumsulfat-Lösung	Eigene Herstellung	25 g/L, steril filtriert
Mannose-Lösung	Eigene Herstellung	20%, steril filtriert
Saline (isotone Natriumchlorid-Lösung)	Eigene Herstellung	0,9%
TAE-Puffer (Agarose-Gelelektrophorese)	Eigene Herstellung	40 mM Tris 2 mM Na ₂ -EDTA pH 8,2 (mit Essigsäure eingestellt)
TE-Puffer	Eigene Herstellung	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 7,5
Y-Per® Yeast Protein Extraction Reagent	Thermo Scientific (Langenselbold, Deutschland)	-

Anhang 1.3: Verzeichnis der verwendeten Kits, Reagenzien und Materialien

Tabelle 42: Verwendete Kits.

Reagenzien-Kit	Hersteller/Quelle	Spezifikation/ Beschreibung
Elabscience Vitamin B ₂ ELISA Kit	Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland)	Zur quantitativen Bestimmung von Riboflavin in den Zellpellets und im Zellmedium von <i>B. subtilis</i>
E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (Q Spin)	Omega Bio-tek, Inc. (Norcross, Georgia, USA)	Zur Isolierung von Plasmid-DNA
Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)	Zur DNA-Aufreinigung aus PCR, Restriktions-Verdau oder Ligation
PeqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Tabelle 43: Weitere verwendete Reagenzien und Materialien.

Bezeichnung	Hersteller/Quelle	Spezifikation/ Beschreibung
Reagenzien für die PCR		
Blue Loading Buffer (6x)	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)	10 mM Tris-HCL, 0,03% Bromphenolblau, 0,03% Xylencyanol, 60% Glycerin, 60 mM EDTA
DNA Ladder Mix	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)	100-10.000 bp, 50 µg
dNTPs	Bioline GmbH (Luckenwalde, Deutschland)	Gesamtkonzentration: 10 mM in Wasser, jeweils 2,5 mM
Phusion® GC Buffer	New England Biolabs GmbH, (Frankfurt, Deutschland)	Keine genauen Angaben, 100% DMSO, 50 mM MgCl ₂
Phusion® HF Buffer (5x)	New England Biolabs GmbH, (Frankfurt, Deutschland)	Keine genauen Angaben, 100% DMSO, 50 mM MgCl ₂
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)	-
Reaktionspuffer für die <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (10x)	Eigene Herstellung	30mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM KCl, 0,1% Triton® X-100
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (<i>Thermus aquaticus</i>) ink. Puffer	Herstellung im Institut (Focke, 2011)	10 U/µL

Bezeichnung	Hersteller/Quelle	Spezifikation/ Beschreibung
Reagenzien für den Restriktionsverdau und die Ligation		
Sall-HF (inkl. Puffer)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)	20.000 U/mL
Smal (inkl. Puffer)		20.000 U/mL
SpeI (inkl. Puffer)		10.000 U/mL
EcoRI (inkl. Puffer)		10.000 U/mL
T4-DNA-Ligase (inkl. Puffer)		400.000 U/mL
Materialien		
Elektroporations-küvetten	BTX® Harvard Bioscience Inc. (Holliston, USA)	1 mm Spaltbreite
Einmalküvetten	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)	Acryl, 10 x 4 x 45 mm
Einmalspritzen (steril)	B Braun™ Injekt™ Thermo Fisher Scientific GmbH (Bremen, Deutschland)	24 mL Füllvolumen, steril
Kryoröhrchen	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)	CryoPure Tubes: 1,0 mL, 1,6 mL
Mikroröhrchen	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)	1,5 mL, 2,0 mL
Mikroröhrchen (Safe Seal)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)	2,0 mL
Parafilm	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	5 cm x 75 m Universal-Verschluss- folie
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)	0,2 µL Multiply®-Pro mix
PCR-Reaktionsgefäße (Quantus Fluorometer)	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)	0,5 mL geeignet für eine Verwen- dung mit dem Quantus™ Fluoro- meter
Petrischalen	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)	Ø 92 mm, transparentes Polysty- rol, ohne Entlüftungsnocken
Pipettenspitzen (10-20 µL, 100- 250 µL)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)	10-20 µL, 100-250 µL
Pipettenspitzen (100-1000 µL)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)	100-1000 µL
Präzisionsküvetten aus Quarzglas	SUPRASIL® Hellma Materials GmbH (Jena, Deutschland)	10 mm Schichtdicke
Spritzenvorsatzfilter (steril)	Acrodisc® Pall Corporation (New York, USA)	Porengröße: 0,45 µm
Zahnstocher	Handelsüblich	-
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)	mL, 50 mL

Anhang 1.4: Geräteverzeichnis**Tabelle 44: Verzeichnis der verwendeten Geräte.**

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikation
Analysenwaage	Kern und Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)	Kern ABJ 220-4M Maximalgewicht: 220 g Genauigkeit: 0,1 mg
Autoklav	System GmbH (Wettenberg, Deutschland)	Horizontaler Tischautoklav: DX23 Vertikaler Standautoklav: VX95
Bidestille	Heraeus Instruments GmbH (Osterode, Deutschland)	Destamat, Bi 18 E
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH (Osterode, Deutschland)	Thermo Scientific Heraeus Function Line Typ B20
Eismaschine	AB Ninolab (Upperlands Väsby, Schweden)	Imaskin IQ-135
Elektrophoreseeinheit	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)	EV 231
Elektroporationsgeräte	BTX® Harvard Bioscience Inc. (Holliston, USA)	Elektroporations System BTX Harvard Apparatus ECM 399
	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)	Eppendorf Eporator® für Bakterien und Hefen, 230 V/ 50 – 60 Hz
Gefrierschrank (-25 C°)	Robert Bosch GmbH (Stuttgart, Deutschland)	A++, handelsüblich
Gefrierschrank (-80 C°)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH (Wesseling-Berzdorf, Deutschland)	Ultra-Tiefemperatur-Gefrier- schrank
Geldokumentationseinheit	Biostep GmbH (Jahnsdorf, Deutschland)	Biostep Dark Hood DH-40/50
Gradienten- Thermocycler	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)	T3000 oder TGradient
Grobwaage	Sartorius-Werke GmbH (Göttingen, Deutschland)	Sartorius 1203 MP, max. 3700g, Genauigkeit: 0,1g
Laminar Flow (Sterilwerkbank)	Thermo Electron LED GmbH (Langenselbold, Deutsch- land)	Typ: Safe 2020 1.2
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)	RH basic 2
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Molecular Devices (Ismaning, Deutschland)	SpectraMax M5
Mikrowelle	Severin Elektrogeräte GmbH (Sundern, Deutschland)	Typ 7810
Millipore-Anlage (Wasseraufbereitungssystem)	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)	Direct-Q® 3UV-R
Minizentrifuge	Beckman Coulter Inc. (Krefeld, Deutschland)	Microfuge 16
pH-Einstabsmesskette	Schott Geräte GmbH (Ludwigshafen, Deutschland)	Blue line pH 12
pH-Meter	Schott Geräte GmbH (Ludwigshafen, Deutschland)	Listed 8FG93, CG842
Quantus™ Fluorometer	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)	zu verwenden mit QuantiFluor® Dyes
Rotationsverdampfer	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG (Schwabach, Deutschland)	Laborata 4000 efficient mit WB eco
Schüttler/Brutschrank	Edmund Bühler GmbH (Bodelshausen, Deutschland)	Inkubationshaube TH 30, Universalschüttler SM 30
Spülmaschine	Miele & Cie. KG (Gütersloh, Deutschland)	G 7883

Bezeichnung	Hersteller	Spezifikation
Stickstofftank	Air Liquide Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)	Arpege 170
Thermocycler	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)	peqLab Primus 25 advanced
Trockenschrank	Steiner GmbH (Siegen Eiserfeld, Deutschland)	Heraeus Instruments
Vortexer	Scientific Industries Inc. (New York, USA)	Genie 2
Ultraschallwandler	Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)	UW 2200
UV/Vis Photometer	Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg im Breisgau, Deutschland)	Ultrospec 4300 pro UV/Visible Spektrophotometer
Zentrifugen	Sartorius (Göttingen, Deutschland)	Sigma 3-16 PK
	Thermo Electron Corporation (Beverly, USA)	Sorvall RC 6 PLUS Centrifuge Rotor: SLA-3000

Anhang 2: Vektorkarten

In den Abbildungen 39, 40 und 41 sind die Vektorkarten des Zwei-Plasmid-Systems (pCas und pTargetF) zur Genom Editierung in *E. coli* sowie die des Plasmids pJOE8999 zur Genom Editierung in *B. subtilis* dargestellt. Die Vektorkarten wurden mit Hilfe der SnapGene® Software und den bei Addgene veröffentlichten (pCas: # 62225, pTargetF # 62226) bzw. von Dr. Altenbuchner zur Verfügung gestellten Plasmid-Sequenzen erstellt.

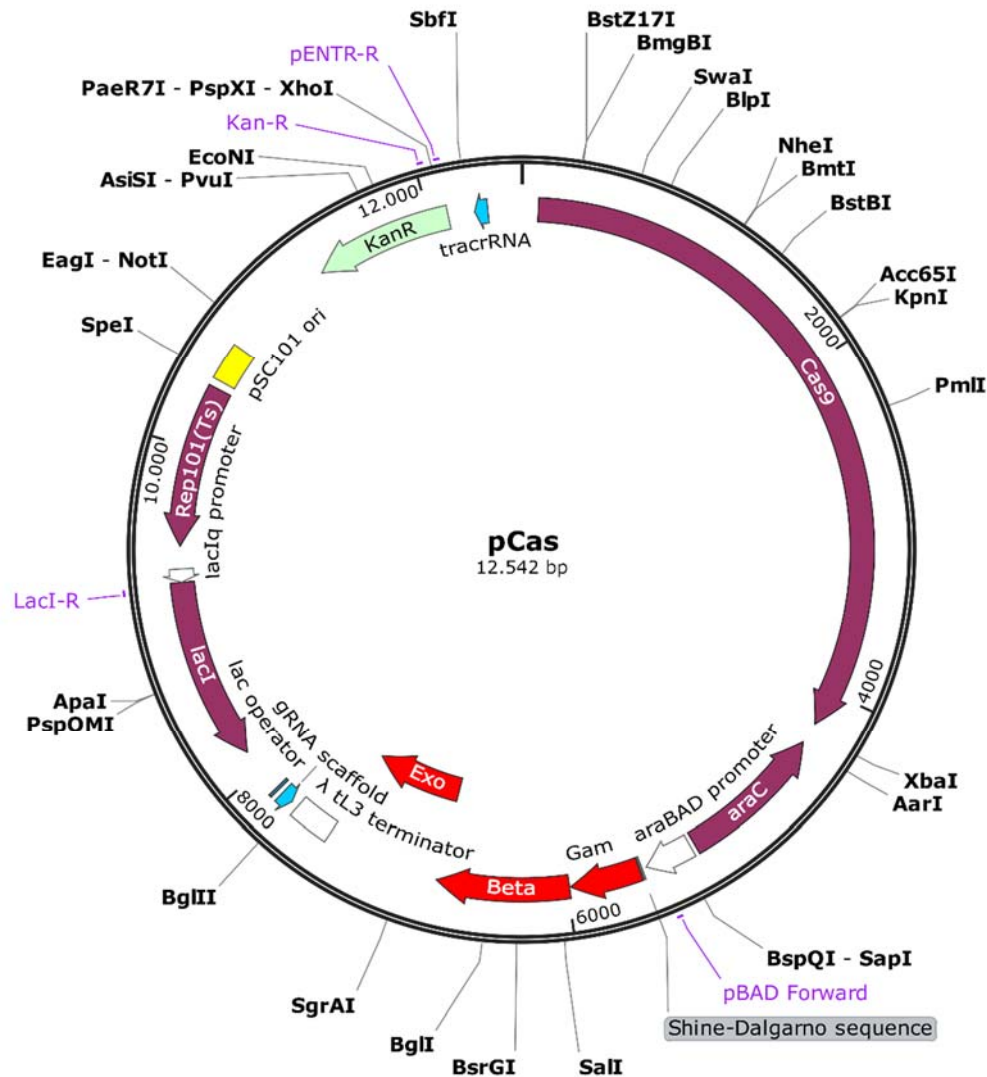


Abbildung 39: Vektorkarte von Plasmid pCas. Das Plasmid ist Teil des CRISPR-Cas9 basierten Zwei-Plasmid-Systems veröffentlicht von Y. Jiang et al., 2015 zur Genom Editierung in *E. coli*. Es enthält u.a. das Gen für die Cas9-Nuklease (*cas9*), die Gene des Lambda Red Rekombinationssystems (*exo*, *beta* und *gam*) unter Kontrolle des *L*-Arabinose induzierbaren Promotors *P_{araB}*, und eine Kanamycin-Resistenz (*kanR*). Die IPTG-induzierbare sgRNA, die Cas9 zum Replikationsursprung (eng. *origin of replication*, *ori*) (*pMB1*) von pTargetF führt und in diesen einen CRISPR-Cas9 vermittelten Doppelstrangbruch induziert, dient der Entfernung (Plasmid-*Curing*) des zweiten Plasmids (pTargetF) nach erfolgter Genom Editierung. Das Plasmid besitzt zudem den Temperatur-empfindlichen *ori repA101(Ts)*, wodurch es nach dem Plasmid-*Curing* von pTargetF, durch eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur selbst entfernt werden kann. Das Plasmid pCas wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Sheng Yan (Addgene: pCas # 62225).

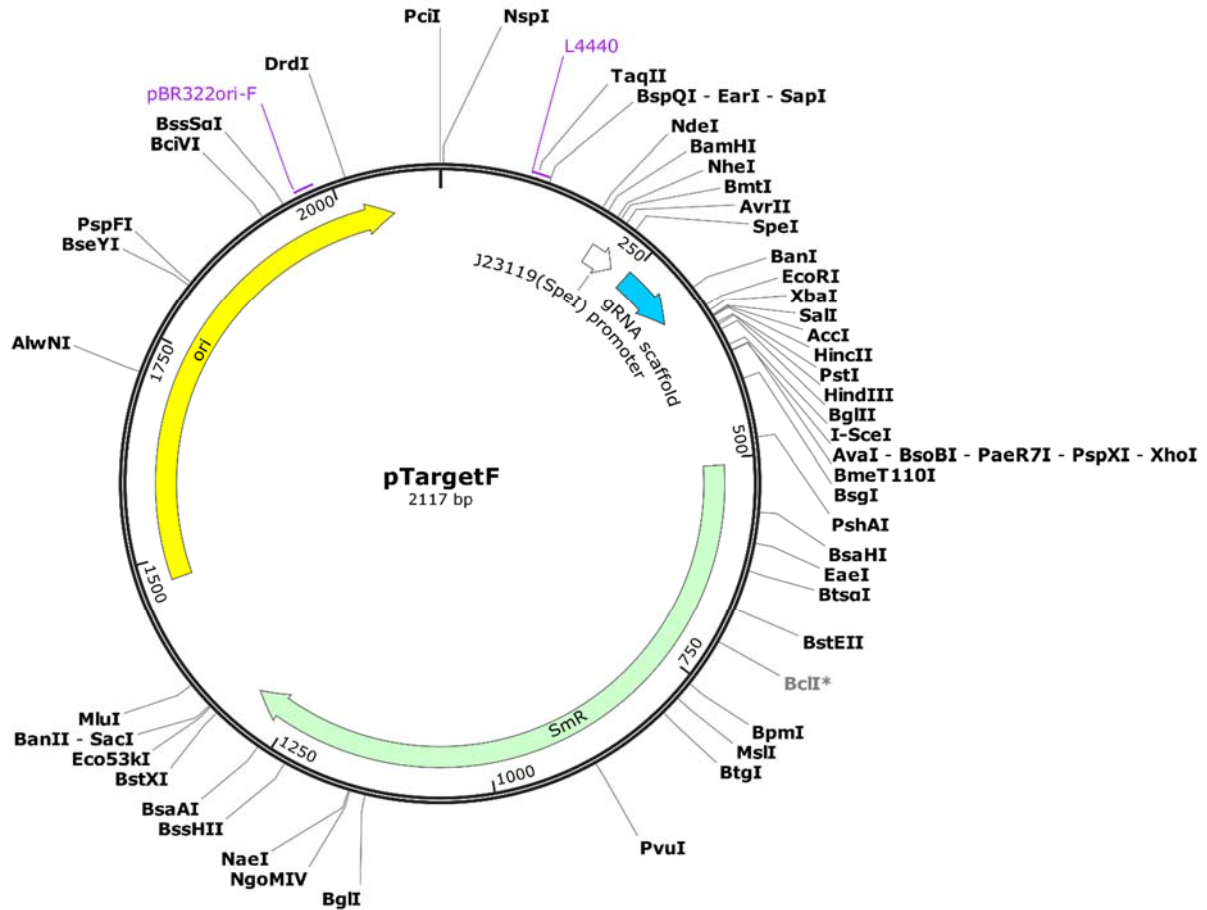


Abbildung 40: Vektorkarte von Plasmid pTargetF. Das Plasmid ist Teil des CRISPR-Cas9 basierten Zwei-Plasmid-Systems veröffentlicht von Y. Jiang et al., 2015 zur Genom Editierung in *E. coli*. Es enthält u.a. die crRNA und die tracrRNA (hier: gRNA scaffold), welche unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors stehen sowie ein Spectinomycin-Resistenzgen (*smR*). Das Plasmid pTargetF wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Sheng Yan (Addgene: pTargetF # 62226).

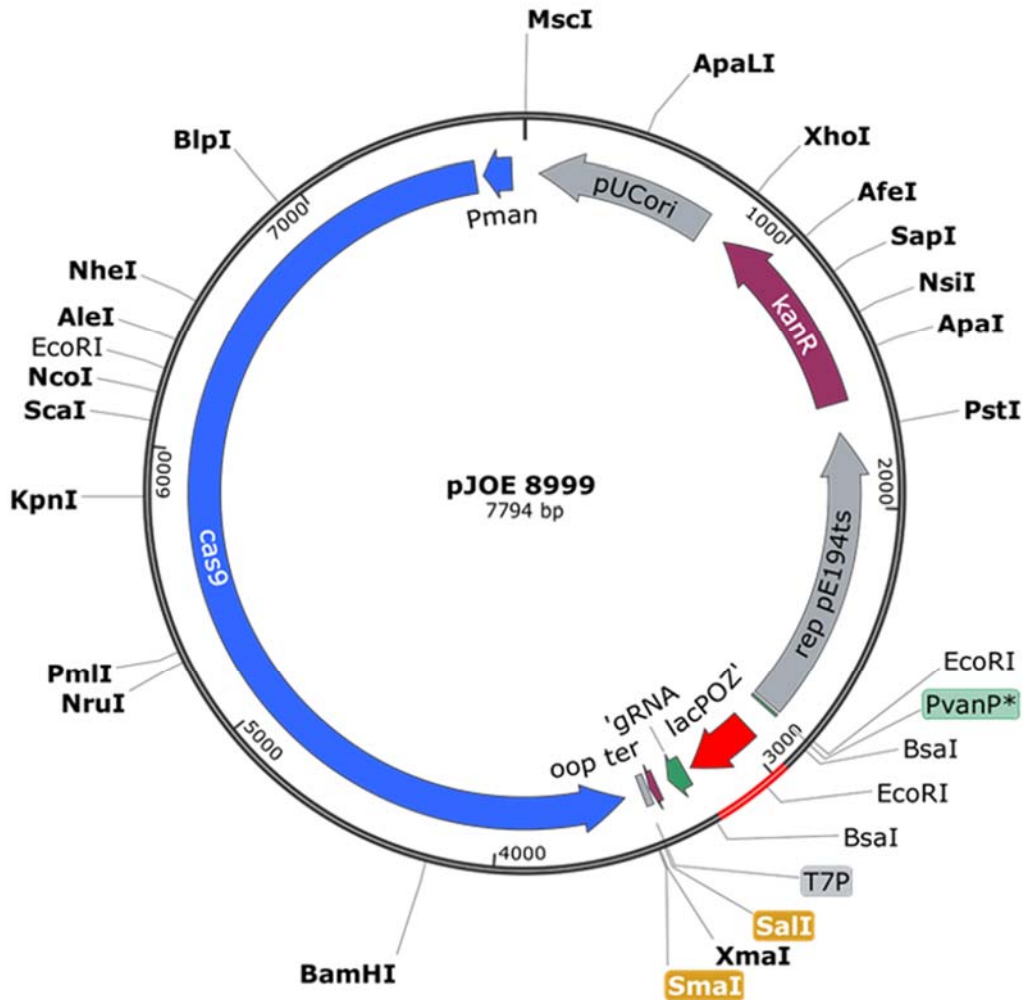


Abbildung 41: Vektorkarte von Plasmid pJOE8999. Bei dem Plasmid pJOE8999 handelt es sich um ein von Altenbuchner, 2016 veröffentlichtes *Shuttle* Plasmid, welches zur Genom Editierung in *B. subtilis* verwendet wurde. Es enthält einen ori (pUC) für *E. coli* und einen Temperatur-empfindlichen ori (pE194ts) für die Replikation in *B. subtilis* sowie ein Kanamycin-Resistenzgen (*kanR*), welches in beiden Organismen exprimiert wird. Die Expression des Gens *cas9* wird durch den Mannose-induzierbaren Promotor P_{manP} gesteuert. Der Promotor ist in *E. coli* nicht aktiv und kann von ManR in Anwesenheit von Mannose und Abwesenheit von Glukose aktiviert werden. Die Expression der crRNA und der tracrRNA (gRNA) erfolgt konstitutiv mittels des semisynthetischen Promotors PvanABK. Das *lacZ*-Fragment ist für den Austausch der crRNA-Sequenzen vorgesehen und wurde in dieser Arbeit nicht genutzt. Das Plasmid pJOE8999 und seine DNA-Sequenz wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Josef Altenbuchner (Institut für industrielle Genetik, Universität Stuttgart).

Anhang 3: Primer

In Tabelle 45 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer sowie ihre Sequenzen und Anwendungsbereiche aufgeführt.

Tabelle 45: Verzeichnis der verwendeten Primer.

Primer	Primer-Sequenz (5'→3')*	Anwendungsbereich
<i>E. coli</i>		
ribAfw1	AAACTGCCAACCCCATG GTTTTAGAGCTAGAAATAGCA AGTTAAAAT	Präparative PCR zur Herstellung des crRNA/tracrRNA-Inserts
ribAfw2	GAGAACTAGTCAGAAGCC AAACTGCCAACCCCATG	Präparative PCR zur Herstellung des crRNA/tracrRNA-Inserts, Kolonie-PCR-Screening, Screening des pTargetF-ribA-Plasmids nach CRISPR-Cas9-Event
ribAr	TCTCAGAATTC AAAAAAGCACCGA	Präparative PCR zur Herstellung des crRNA/tracrRNA-Inserts, Kolonie-PCR-Screening
Seq-pTargetF-ribAr	GTAAGCACTACATTTGCTC	SANGER-Sequenzierung zur Verifizierung der DNA-Sequenz des crRNA/tracrRNA-Inserts im Plasmid pTargetF-ribA
ribA-Gfw1	CCAAACTGCCAACCCCAT GTTTTAGAGCTAGAAATAGCA AGTTAAAATAAG	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von ribA-G
ribA-Gfw2	GAGAACTAGTGAAG CCAAACTGCCAACCCCAT GTTTTAG AGC	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von ribA-G
ribB1fw1	TCTGATGACGCTGGC GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT TAAAATAAGGCTAGTC	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von ribB1
ribB1fw2	GAGAACTAGTCAGAAATGATCTGATGACGCTGGC GTTT TAGA	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von ribB1
ribB2fw1	TGACGATGGCAGCA GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTC	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von ribB2
ribB2fw2	GAGAACTAGTCAGAAGACTAATGACGATGGCAGCA GTTT TAGA	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von ribB2
ribC1fw1	GTGGCGCATAA GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA AT	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von ribC1
ribC1fw2	GAGAACTAGTAGAAGGTGCTTCC GTGGCGCATAA GTTTT AGAGC	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von ribC1
ribC2fw1	GGACACTTAATGTC GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAAT	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von ribC2
ribC2fw2	GAGAACTAGTCAGAAATGGC GGACACTTAATGTC GTTT TAGAGC	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von ribC2
pTargetFr	GAGAACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCT	SDM-PCR zur Einbringung der crRNAs in pTargetF (universeller Rückwärtsprimer)
Seq-pTargetFr	GTCGATCATAGCACGATC	SANGER-Sequenzierung zur Verifizierung der mittels SDM-PCR modifizierten DNA-Sequenzen der crRNAs in den Plasmiden pTargetF-ribA-G, pTargetF-ribB1/B2, pTargetF-ribC1/C2
AmLfw	ACACCAGAGAAACCAGCC	Donor-Template für den Knockout von ribA
AmLr	TCACACGTGCGGTCC TTAGGCTTCTGCCACACG	Donor-Template für den Knockout von ribA
AmRr	TTGGTTAAACAAGCGGACTTC	Donor-Template für den Knockout von ribA, Nachweis der Mutation in der

Primer	Primer-Sequenz (5'→3')*	Anwendungsbereich
AmRfw	GGACCGCACGTGTGA CCTGATGGTGGGATTGA	Gensequenz von <i>ribA</i> mittels Kolonie-PCR
ribA-mutfw	GGACCGCACGTGTGA	Donor-Template für den Knockout von <i>ribA</i>
Cycfw	TAGCCAACCTTTGTTCTCCAGG	Nachweis der Mutation in der Gensequenz von <i>ribA</i> mittels Kolonie-PCR
BmLfw	TGTAGTTTCCCTGTACTGATAGGTG	SANGER-Sequenzierung zur Verifizierung der <i>ribA</i> -Genmutation in <i>E. coli</i>
BmLr	TCACACGTGCGGTCC TACACCACCTGCCTGAGC	Donor-Template für den Knockout von <i>ribB</i>
BmRr	GACAACTTCTGCCAGCTTCAC	Donor-Template für den Knockout von <i>ribB</i> , Kolonie-PCR-Screening, SANGER-Sequenzierung zur Verifizierung der <i>ribB</i> -Genmutation in <i>E. coli</i>
BmRfw	GGACCGCACGTGTGA GGCATACCGTCAGGCACA	Donor-Template für den Knockout von <i>ribB</i>
CmLfw	GAAATTCAGTCTATTGTAGCGAGG	Donor-Template für den Knockout von <i>ribC</i> , Kolonie-PCR-Screening, SANGER-Sequenzierung zur Verifizierung der <i>ribC</i> -Genmutation in <i>E. coli</i>
CmLr	TTCACACGTGCGGTCC GCCAAGATTGGTAATGCGTAACG	Donor-Template für den Knockout von <i>ribC</i>
CmRr	CGGCCTTCGAGTGGC	Donor-Template für den Knockout von <i>ribC</i> , Kolonie-PCR-Screening
CmRfw	GGACCGCACGTGTGAA ATGACCACTGCTGAAGTGG	Donor-Template für den Knockout von <i>ribC</i>
pTargetF-Screenr	GAGCTGCACATGAACTC	Screening des pTargetF- <i>ribA</i> -Plasmids nach CRISPR-Cas9-Event
pCasKanfw	GATTATCCCGTGACAGG	Screening des pCas-Plasmids nach CRISPR-Cas9-Event
pCasKanr	TCTGATGTTACATTGCACAAG	Screening des pCas-Plasmids nach CRISPR-Cas9-Event
<i>B. subtilis</i>		
YcsEfw	TTGTGTCGTAATCCCGTT	Präparative PCR zur Amplifikation der <i>ycsE</i> -Gensequenz, Primer für SANGER-Sequenzierung
YcsEr	ACACCATCCTCAATATTTGTAT	Präparative PCR zur Amplifikation der <i>ycsE</i> -Gensequenz
YitUfw	GGTGCCTGTTCTCTCCTTTA	Präparative PCR zur Amplifikation der <i>yitU</i> -Gensequenz, Primer für SANGER-Sequenzierung
YitUr	AATCTGCTTGACCGCTCAAT	Präparative PCR zur Amplifikation der <i>yitU</i> -Gensequenz
YwtEfw	CAGTTGAGTCTATTAGCTG	Präparative PCR zur Amplifikation der <i>ywtE</i> -Gensequenz, Primer für SANGER-Sequenzierung
YwtEr	CCGAAAGAAGCTGGTCT	Präparative PCR zur Amplifikation der <i>ywtE</i> -Gensequenz
ycsEfw1	TATTCAAATGATGT GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT TAAAAAT	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von <i>ycsE</i>
ycsEfw2	GAGAACTAGTGGACCA TATTCAAATGATGT GTTTTAGAGCTAGAAAT	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von <i>ycsE</i>
yitUfw1	AAGACGACAGCT GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAG	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von <i>yitU</i>
yitUfw2	GAGAACTAGTTCATCCGC AAGACGACAGCT GTTTTAGAGCTAGAAAT	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von <i>yitU</i>

Primer	Primer-Sequenz (5'→3')*	Anwendungsbereich
ywtEfw1	GGATCAGGAAGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA AAATAAG	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von <i>ywtE</i>
ywtEfw2	GAGAACTAGTACATTAATGGATCAGGAAGCGTTTTAGA GCTAGAA	SDM-PCR zur Einbringung der crRNA von <i>ywtE</i>
pJOEr	GAGAACTAGTTACATTTTACTCAATTCTCTAATCACGGT	SDM-PCR zur Einbringung der crRNAs in pJOE8999 (universeller Rückwärtsprimer)
T7r	CCCTATAGTGAGTCGTATTA	SANGER-Sequenzierung zur Verifizierung der jeweiligen DNA-Sequenzen der crRNA-Inserts in den Plasmiden pJOE8999- <i>ycsE</i> , pJOE8999- <i>yitU</i> und pJOE8999- <i>ywtE</i>
EmLfw	GAGATCGTTCGACTCTGTCATGTTTGATCACCTCA	Donor-Template für den Knockout von <i>ycsE</i> , Kolonie-PCR-Screening
EmLr	TCACACGTGCGGTCCGCCAAATTTCACTGCCGT	Donor-Template für den Knockout von <i>ycsE</i>
EmRr	GAGATCCCCGGGGTCCCAGAATAAAACCTGCC	Donor-Template für den Knockout von <i>ycsE</i> , Kolonie-PCR-Screening
EmRfw	GGACCGCACGTGTGATGGAGAGGCGAGTTTCCGG	Donor-Template für den Knockout von <i>ycsE</i>
UmLfw	GAGATCGTTCGACGGTGCCTGTTCTCTCCTTTA	Donor-Template für den Knockout von <i>yitU</i> , Kolonie-PCR-Screening
UmLr	TCACACGTGCGGTCCCTTGACAATTGGCGTTGTCAG	Donor-Template für den Knockout von <i>yitU</i>
UmRr	GAGATCCCCGGGAATCTGCTTGACCGCTCAAT	Donor-Template für den Knockout von <i>yitU</i> , Kolonie-PCR-Screening
UmRfw	GGACCGCACGTGTGACATAACGTGCTTGCTGAAG	Donor-Template für den Knockout von <i>yitU</i>
WmLfw	GAGATCGTTCGACCAGCTGACGGTTATGATTA	Donor-Template für den Knockout von <i>ywtE</i> , Kolonie-PCR-Screening
WmLr	TCACACGTGCGGTCCGCCATTAGCTGCAATGATA	Donor-Template für den Knockout von <i>ywtE</i>
WmRr	GAGATCCCCGGGAAAGTAGCCACACCATT	Donor-Template für den Knockout von <i>ywtE</i> , Kolonie-PCR-Screening
WmRfw	GGACCGCACGTGTGACAGATGACCATCTGCTTTC	Donor-Template für den Knockout von <i>ywtE</i>
Screen-YcsEfw	ATTCATTCTCCTCAAACATAGG	Kolonie-PCR-Screening zum Nachweis des Einbaus von DT <i>ycsE</i> in pJOE8999- <i>ycsE</i>
Screen-YcsEr	ACACCATCCTCAATATTTGTAT	Kolonie-PCR-Screening zum Nachweis des Einbaus von DT <i>ycsE</i> in pJOE8999- <i>ycsE</i>
Screen-YitUfw	ATAGGGTCGACGGTGCCTGT	Kolonie-PCR-Screening zum Nachweis des Einbaus von DT <i>yitU</i> in pJOE8999- <i>yitU</i>
Screen-YitUr	ATTGGCCCCGGGAATCTGCTT	Kolonie-PCR-Screening zum Nachweis des Einbaus von DT <i>yitU</i> in pJOE8999- <i>yitU</i>
Screen-YwtEfw	ATAGGGTCGACCAGCTGACG	Kolonie-PCR-Screening zum Nachweis des Einbaus von DT <i>ywtE</i> in pJOE8999- <i>ywtE</i>
Screen-YwtEr	ATTGGCCCCGGGAAAGTAGGC	Kolonie-PCR-Screening zum Nachweis des Einbaus von DT <i>ywtE</i> in pJOE8999- <i>ywtE</i>
T7fw	TAATACGACTCACTATAGGG	SANGER-Sequenzierung zur Verifizierung des korrekten Einbaus der Donor-Templates in die Plasmide pJOE8999- <i>ycsE</i> -DT, pJOE8999- <i>yitU</i> -DT und pJOE8999- <i>ywtE</i> -DT

Primer	Primer-Sequenz (5'→3')*	Anwendungsbereich
ycsE-mutfw	TCGTAATCCC <u>GTTCGCTTT</u>	Nachweis der Mutation in der Gensequenz von <i>ycsE</i> mittels Kolonie-PCR, SANGER-Sequenzierung zur Verifizierung der <i>ycsE</i> -Genmutation in <i>B. subtilis</i>
ycsE-mutr	TTCGGAACGACTATTC <u>CGAA</u>	Nachweis der Mutation in der Gensequenz von <i>ycsE</i> mittels Kolonie-PCR
yitU-mutfw	CAGTTGAGTCTATTCAGCTG	Nachweis der Mutation in der Gensequenz von <i>yitU</i> mittels Kolonie-PCR, SANGER-Sequenzierung zur Verifizierung der <i>yitU</i> -Genmutation in <i>B. subtilis</i>
yitU-mutr	CCGAAAGAAGCTGGTCT	Nachweis der Mutation in der Gensequenz von <i>yitU</i> mittels Kolonie-PCR
ywtE-mutfw	GGTGCCTGTTCTCTTCCTTTA	Nachweis der Mutation in der Gensequenz von <i>ywtE</i> mittels Kolonie-PCR, SANGER-Sequenzierung zur Verifizierung der <i>ywtE</i> -Genmutation in <i>B. subtilis</i>
ywtE-mutr	AATCTGCTTGACCGCGTCAAT	Nachweis der Mutation in der Gensequenz von <i>ywtE</i> mittels Kolonie-PCR
yjaZfw	CATATAGCTGGCTCAGGAA	Präparative PCR zur Amplifikation der <i>yjaZ</i> -Gensequenz
yjaZr	CCAACTGCGTATCCAAGC	Präparative PCR zur Amplifikation der <i>yjaZ</i> -Gensequenz, Primer für SANGER-Sequenzierung

* Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Die gelb hinterlegten Nukleotide kennzeichnen die komplementären Bereiche für die Überlappung der Primer bei der OE-PCR und der SDM-PCR bzw. bei der Herstellung des crRNA/tracrRNA-Inserts. Mutagene Nukleotide die bei der SDM-PCR bzw. der OE-PCR, oder bei der Herstellung des crRNA/tracrRNA-Inserts mit Hilfe der Mutagenese-Primer in das PCR-Produkt eingebracht wurden, sind in Rot dargestellt.

Anhang 4: DNA-Sequenz des *Inserts* für die Klonierung in pTargetF

62 GAGA **ACTAGT** CAGAAG **GCCAAACTGCCAACCCCATG** GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAA
126 ATAAGGCTAGTC **CGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT** **GAATTCTG**
129 AGA

actagt = Restriktionsschnittstelle für SpeI

gaattct = Restriktionsschnittstelle für EcoRI

crRNA/Sequenzabschnitt von *ribA*

tracrRNA

Transkriptionsterminator

Anhang 5: DNA-Sequenzen der *Donor-Templates*

Zur Herstellung der *Donor-Templates* für die *Knockouts* in *E. coli* BL21(DE3) wurden die unter der NCBI-Zugangsnummer CP001509.3 hinterlegten Nukleotidsequenzen der entsprechenden Gene berücksichtigt. Die *Donor-Templates* für die *Knockouts* in *B. subtilis* wurden anhand der Nukleotidsequenzen von *B. subtilis* 168 (NCBI-Zugangsnummer: CP010052.1) designt. Die Sequenzen der *Donor-Templates* sind in Tabelle 46 aufgeführt.

Tabelle 46: Verzeichnis der DNA-Sequenzen der in dieser Arbeit hergestellten *Donor-Templates*.

<i>Donor-Template</i>	Nucleotid-Sequenz (5'→3') ^a	Anwendungsbereich
<i>E. coli</i>		
DTribA	<p>ACACCAGAGAAACCAGCCGAATAAAATCAAATGTGTAATGACGCC CCAGGGCTGGGTGACAGTTTCAGTAACCCAAAAAGCCGCTTTTAG TAGCCAACTTTGTCTCCAGTTGCCAACGCCAGCCAGAAATCCA TACGGCTACTGGCATGACAAGCAATAGTGCAGCTCCCCTGCGGT ACGTCTGGCAATCGAACGCATGGCCTCTCTTTTGTATAAGTCCC ACAATCATAACTGAAAACGCCAGTTCCAGGAAAAATTGACAGATT TGTGCCATTCCGTGAACGATCGACGCGTCTGATTAGGTGAACCC CTTCTCGTTATGGCAAATAAGCCAATACAGAACCAGCATTATCT GGAGAATTTTCATGCAGCTTAAACGTGTGGCAGAAGCCTAAGGACC GCACGTGTGACCTGATGGTGGGATTTGAAGAACTGGCAACCGGAC ACGATCATGTGCGCGTAGTCTATGGCGATATTTCCGGGCATAACC CGGTACTTGGCGCGCTCCATTCCGAATGTCTGACCGGTGACGCC TGTTACAGTTGCGCTGCGATTGTGGCTTCCAGCTCGAAGCGGCAT TGACGCAAATTGCCGAGGAAGCCGTTGGTATTTGTGTATCACC GTCAGGAAGGTGTAACATTGGTCTGCTGAATAAAATCCGCGCTT ACGCACTGCAGGATCAAGGTTACGATACCGTAGAGGCTAACCACC AGTTAGGCTTCGCCGCTGATGAGCGGACTTCACTCTTTGCGCTG ATATGTTCAAACCTCTTGGCGTCAATGAAGTCCGCTTGTTAACCA A</p>	<p><i>Knockout von ribA.</i> Die flankierenden Primer sind AmLfw und AmRr, die Deletion befindet sich zwischen den inneren Primern AmLr und AmRfw.</p>
DTribB	<p>TGTAGTTTCCCTGTACTGATAGGTGTTGAGTGCCATTGTAGTGCG ATAAGGGTAAGTCATAAACCAGAATTATGTGAAGCTATGCGTTGC TGCCGCTAATCATTAGCGTTATAGTGAATCCGCTTATTCTCAGGG CGGGCGAAATTTCCACCCGCGGTAATCAACTCAGTTGAAAGC CCGCGAGCGCTTTGGGTGCGAACTCAAAGGACAGCAGATCCGGTG TAATTCGGGGCCGACGTTAGAGTCCGGATGGGAGAGAGTAACG ATTCTGTGCGGCATGGACCCGCTCACGTTATTTGGCTATATGCC GCCACTCCTAAGACTGCCCTGATTCTGGTAACCATAATTTTAGTG AGGTTTTTTTACCATGAATCAGACGCTACTTCTCTTTTGGTAC GCCTTTCGAACGTGTTGAAAATGCACTGGCTGCGCTGCGTGAAGG ACGCGGTGTAATGGTGTGATGATGAAGACCGTGAAAACGAAGG TGATATGATCTTCCCGGCAGAAACCATGACTGTTGAGCAGATGGC GCTGACCATTGCGCCACGGTAGCGGTATTGTTGCTGTGCATTAC TGAAGATCGCCGTAACAACCTCGATCTGCCAATGATGGTAGAAAA TAACACCAGCGCTATGGCACCGGTTTTACCGTGACCATTGAAGC AGCTGAAGGTGTGACTACCGGTGTTTCTGCCGCTGACCGTATTAC GACCGTTCGCGCAGCGATTGCCGATGGCGCAAAACCGTCAGATCT GAATCGTCTGGCCACGTTTTTCCACTTCGCGCTCAGGCAGGTGG TGTAGGACCGCACGTGTGAGGCATAACCGTCAGGCACAAGGCACAT GAGCGTAAAGCCAGCTGAAAACCGCTGCTTAATTTACTGCCTTAA TCAAGAAACCGAAGTTGTAGCAGGCTTCGGTTTTTATTTTTCCCT GCTATGCAAGATGTTAATTCGCTTCTCTTTCTATGAGAAAAATTT CATTAAATCAGGCATTCTTTTTCATTATGATCAAAATCATATAA TTGTTCCGTTATTATGCGACCATATGAATATATCCGAAAAAGGAT ATGTGAAATTTATACGCTAAATGTTTAGTATGTTAAATATTAAG GGTAAAAGGATGTTTATCGCTGGTACTGGATTGTATTGATTGCT CTGGTTGTGGTGGGTTATTTCTGCAATTTGAAACGTTATTGTCCG GCGTTTCGCCAGGACAGAGACGCACTGCTTGAAGCGCGGAACAAA TACTTAAACAGTACGAGAGAAGAGACAGCCGAAAAGGTAGAATAA GGCTTTCGTGAAGCTGGCAGAAGTTGTC</p>	<p><i>Knockout von ribB.</i> Die flankierenden Primer sind BmLfw und BmRr, die Deletion befindet sich zwischen den inneren Primern BmLr und BmRfw.</p>

Donor-Template	Nucleotid-Sequenz (5' → 3') ^a	Anwendungsbereich
DTribC	<p>GAAATTCAGTCTATTGTAGCGAGGATTTATTAATTCTCCAGTGAA AAAATAGCCATTCTTACCCCTTCACTGGTAAGGGCGTTTTCCACC TGCTATTGTGCTGAACAGAAATGTCTTAACTGATTTCCAGGAGTTGT AAGTATGTTTACGGGGATTTGTACAGGGCACC GCAAAACTGGTGTC GATTGACGAGAAACCAAATTTTCGTACGCATGTGGTGGAGTTACC CGACCACATGCTGGACGGCCTGGAAACCGGTGCTTCCGTGGCGCA TAACGGTTGCTGCCTGACCGTGACGGAAATTAACGGCAACCATGT CAGTTTTGACCTGATGAAAGAAACGTTACGCATTACCAATCTTGG <u>CGGACCGCACGTTGAA</u>ATGACCACTGCTGAAGTGGCGAAAAATAT TAACCTCAGAAAAATAATCGCCAGATCTGGTTTAAAGTCCAGGATA GTCAGTTGATGAAATATATTTCTGTACAAAGGATTTATTGGCATCG ACGGTATTAGCCTGACCGTCCGGCAAGTACGCCAACCGGTTTTTT GCGTCCATTTAATTCCGGAAACACTGGAACGCACGACTCTTGGGA AGAAAAAATTTGGCGCACGCGTCAACATTGAAATCGATCCACAAA CTCAGGCAGTGGTAGATACGGTAGAACGTGTCTGGCGGCACGAG AAAATGCCATGAATCAACCAGGCACAGAAGCCTGATCTGAAATCG CCCCGGAGAGGGGGCGATAGAATAGCCTTTAGCGAGCCACTCGA AGGCCG</p>	<p><i>Knockout von ribC.</i> Die flankierenden Primer sind CmLfw und CmRr, die Deletion befindet sich zwischen den inneren Primern CmLr und CmRfw.</p>
<i>B. subtilis</i>		
DTyosE	<p>GAGATCgtcgacTCTGTCTATGTTTGATCACCTCACCGTTTTGTTTT CCTCTTATTCTTCTCCTCAAACATAGGAAATCGCTTTTTTTGTCC CGCTGGGTATAATGTATTAGAATAGAGAGAAGCACAACAAAAAGA TAAAGAGAGGTACATATATGTCTGTTCAAAGAGAAGATGTAGATA TCAAGCTGATCGCAATTGATATGGATGGTACTGCTGAACGACG AGCAGCTGATCTCGGATGAAAACCGCAAAGCCATTCTGTAAGCGG AGGATAAAGGTGTGTATGTGGTGTATCAGCACGGCCGGACGCTGA TGACGTGCAGGGAGCTGGCGGAATCGCTAAAGCTGTATCCTTTC TAATCACGGCAAACGGCAGTGAAAATTTGGGA<u>GGACCGCACGTTGTG</u> <u>A</u>TGGAGAGGGCAGTTTTCCGGAAAACATTACGGATCATGAATGGCT CAAATTCGGCTTTGACATCGAGGATGACGATATCCGAAACGAAGT GCTTGAGGCTGAGAAAAACAAAGAGCTCGAAATCACAAATTC AAGTCCGACAAACATTGAAGTCAACGCGCTTGGCATCAACAAAGC TGCAGCCCTTGCCAAGGTTACGGAAAACTCGGCTTTACAATGGA GAATGTGATGGCGATGGGCGACAGCCTTAATGACATTGCGATGAT CAAAGAAGCGGGTCTTGGCGTCGCAATGGGCAATGCGCAAGACAT CGTAAAAGAAACGGCTGATTATATCACGGATACAAATATTGAGGA TGGTGTGCTGCTAAAGCGATTCCGCAATGGGTACTATAAAAAAAGAG AGTCCTAAGATGGACTCTCTTTTTTAGTTTTGGCAGTTTTTATTCT GGGACccccgggGATCTC</p>	<p><i>Knockout von ycsE.</i> Die flankierenden Primer sind EmLfw und EmRr, die Deletion befindet sich zwischen den inneren Primern EmLr und EmRfw.</p>
DTyitU	<p>GAGATCgtcgacGGTGCCTGTTCTCTTCCCTTACAATATGTA ACGGAATACCGGAAACGGTTTGATTCTCAATTTGTATACAATGTG CCCTCCTTAGGATAAACCATAATCATAAAGTGAACATGTAGACAAT AAAGATGGTAAAAAGCTACACTGTAAGTAAGGCAAAACAAGCAAA ATCTAAGGTTAAAGGAGCTTTTCATGGAGACAAAACCTATTTAA TCGCATTAGATTTAGATGGAACATTATTTAAAGGATGATAAAACCA TATCTGAAAACACCCTTCATACGATACAGCGCTAAAAGATGACG GGCATTATGTCTGCATCTCAACAGGCCGTCCGTATCGTTCAAGTT CCATGTACTACCAGCAGATGGAGCTGACAACGCCAATTGTCAA<u>GG</u> <u>ACCGCACGTTGTA</u>CATAACGTGCTTGCTGAAGTGATTGACGACGT ATACTTTCATTACCATGATGAGCACCTGATAGATGCCTTTAACAT GAACACAACAAATGTAACGGTCCGAGACTTGGGGAAAATCTCGG TGAAGATGTGACGTCCGTACTCATAACATGCAAAGGAAGAGGATGT GCCGGCAATACGCTCATATTTATCGGATGTGCATGCCGAGGTGAT CGACCATAGAAGATGGGCCGCTCCTTGGCATGTCAATTGAAATFAT CAAAAGCGGATGAATAAAGCGGTCCGGCTGCAGAAAATCAGCGA TTATTACGGCGTGCCGAGGGAGCGGATCATTGCTTTTGGAGATGA GGATAACGATTTGGAAATGCTTGAATTTGCAGGCTGCGGCGTTGC AATGGGAAATGGAATTGACGCGGTCAAGCAGATTCccgggGATCT C</p>	<p><i>Knockout von yitU.</i> Die flankierenden Primer sind UmLfw und UmRr, die Deletion befindet sich zwischen den inneren Primern UmLr und UmRfw.</p>

Donor-Template	Nucleotid-Sequenz (5' → 3')^a	Anwendungsbereich
DT _{ywtE}	<p>GAGATCgtcgacCAGCTGACGGGTATGATTATGAACCTGCCGGA GTCTATTATTCAAATTGAATCAGCAAAGCTGCAGGAAGTTAAA AAAGAGCTGCAAAACGATTTAGGTGTATAATGAACGGGATGGCGA TTACGCCATCCCGTTTTACATATTTCTTGTGAAAATTATCAAA GTAACGTTTAGCCTTAATTTATATGGATTATGTTTCACAGGCAAG CTGAACATACTACACGAAGCAGCTTCATTTTAAAGGAGTTCCCC TACATATGAAATGTATTGCGATTGATCTAGACGGAACATTACTGA ATAAAGAAAGCGTCATTTCTGCGGAAAACAGAGAGGCGATCAAGC GGGCCGTTGATGCCGGCATCCTCGTCACCATTTGCACGGGAAGAG CGACATTTGATGTAAAAGCGCTGCTGGATGACTTGGACATCCCTA TCATTGCAGCTAATGGC<u>GGACCGCACGTGTGA</u>CAGATGACCATCT GCTTTCTCCTTTTGACGGCGAAGCTAAGCTGCACGCGGAGCTTGA CATTCTAAAGAGCGCAAACCCAAACGAGCAGACGGATGACTTGTG GCAAGGAGCCATGACTCAATTCAAACAGTTTGGCATTAAACCAAT CCCTCATATCGAATCGGTTTTTGACGGCGGTGAAAACATTTATAA GCTTCTTTGCTTCTCCTTTGATATGGACAAGCTGAAACAAGCGAA GGAAGAACTGAAGCATCATAAAAAACTGGCGCAAACCTCTTCAGG AAAACATATTATCGAAATCCTGCCGGCCTCGTCAGGAAAAGGACG CGCGTTAACAAAGCTGGCTGACATATACGGAATTGAAACACAGGA TATCTATGCGATCGGCGATAGTCCAAACGATTTGTCCATGTTTGA AGTCGCCGGACACCGTATCGCCATGGAAAATGCGATTGATGAATT AAAAGAAAAAGCACCTTTGTCAAAAAAGCAATGACGAAAATGG TGTGGCCTACTTTcccgggGATCTC</p>	<p><i>Knockout</i> von <i>ywtE</i>. Die flankierenden Primer sind WmLfw und WmRr, die Deletion befindet sich zwischen den inneren Primern WmLr und WmRfw.</p>

^a Nukleotidsequenzen von Primern, die für die Herstellung der *Donor-Templates* verwendet wurden, sind unterstrichen, die Sequenz des durch die OE-PCR eingefügten Überlappungsbereichs ist gelb hinterlegt. Restriktionsschnittstellen sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Die beim *Donor-Template* für *ribA* (DT_{ribA}) blau hinterlegte Sequenz, kennzeichnet den verbliebenen Teil der Zielsequenz, Punktmutationen sind in Rot dargestellt.

Anhang 6: Arbeitsanweisungen

Anhang 6.1: Autoklavierbedingungen

Tabelle 47: Autoklavierbedingungen der verwendeten Autoklavierprogramme.

Autoklavier-Programm	Sterilisierungstemperatur [C°]	Sterilisierungsdauer [min]	Trocknungszeit [min]	Vakuumszyklen
Festkörper	121	20	10	6
Flüssigkeiten	121	20	0	0
Abfall	121	20	0	0

Anhang 6.2: Arbeitsanweisung des E.Z.N.A.® Plasmid DNA-Mini Kits

- 2 mL einer 50 mL-Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes mit dem zu isolierenden Plasmid abnehmen und zentrifugieren (2 min, 12 000 g, 20 °C), Überstand verwerfen (Zellpellet sollte ein Gewicht von etwa 70-90 mg aufweisen)
- Zellmaterial in 500 µL Puffer P1 resuspendieren, 0,5 µL RNase hinzugeben und 5 min inkubieren
- 500 µL Lysepuffer P2 hinzugeben und durch 4-6-maliges Umschwenken vermischen, bis die Lösung eine blaue Färbung annimmt
- 700 µL Neutralisierungspuffer P3 hinzugeben und durch 4-6-maliges Umschwenken vermischen bis die Lösung farblos ist, 5 min auf Eis inkubieren
- 20 min bei 12 000 g und 5 °C zentrifugieren
- 2 x je 700 µL vom Überstand auf die Spin Column (Säule) geben und für 2 min bei 2500 g und 20 °C zentrifugieren, Durchfluss beide Male verwerfen
- 400 µL Bindepuffer auf die Spin Column geben, für 1 min inkubieren und für 2 min bei 2500 g und 20 °C zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 700 µL Waschpuffer auf die Spin Column geben, zentrifugieren (2 min, 2500 g, 20 °C), Durchfluss verwerfen
- zum Trocknen der Säule diese erneut für 1 min zentrifugieren
- Säule auf ein unbenutztes 1,5 mL-Mikroröhrchen setzen, zur Elution der DNA 60 µL Reinstwasser auf die Säule geben, 1 min inkubieren und anschließend für 1 min bei 12 000 g und 20 °C zentrifugieren

Über die Zusammensetzung der einzelnen Puffer macht der Hersteller keine Angaben.

Anhang 6.3: Arbeitsanweisung des Monarch® PCR & DNA Cleanup Kits

- abhängig von der Größe der DNA-Fragmente bzw. Plasmide, DNA-Lösung mit DNA-Bindpuffer verdünnen (dsDNA > 2 kbp = 2:1, dsDNA < 2 kbp = 5:1) und durch mehrmaliges Wenden des Mikroröhrchens mischen
- DNA-Lösung auf die Spin Column geben und für 1 min bei 14 000 g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 200 µL Waschpuffer auf die Spin Column geben, zentrifugieren (1 min, 14 000 g), Durchfluss verwerfen
- Waschschrift wiederholen
- zum Trocknen der Säule diese erneut für 1 min zentrifugieren
- Säule in ein unbenutztes 1,5 mL-Mikroröhrchen überführen, zur Elution der DNA je nach weiterer Verwendung 12-30 µL Reinstwasser auf die Säule geben, 1 min inkubieren und anschließend für 1 min bei 14 000 g zentrifugieren

Über die Zusammensetzung der einzelnen Puffer macht der Hersteller keine Angaben.

Anhang 6.4: Arbeitsanweisung des PeqGOLD Gel Extraktions Kits

- Gelstück wiegen und gleiches Volumen an Bindpuffer zugeben (1 mg Gel = 1 µL Bindpuffer)
- Agarose im Wasserbad bei 55-60 °C vollständig lösen, zwischendurch kräftig schütteln
- DNA-Lösung (bis 750 µL) auf die Spin Column überführen und für 1 min bei 12 000 g zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 750 µL Waschpuffer auf die Spin Column geben, 2-3 min inkubieren und zentrifugieren (1 min, 12 000 g), Durchfluss verwerfen
- Waschschrift wiederholen
- zum Trocknen der Säule diese erneut für 1 min zentrifugieren
- Säule in ein neues 1,5 mL Mikroröhrchen überführen, zur Elution der DNA 30-50 µL Reinstwasser auf die Säule geben, 1 min inkubieren und anschließend für 1 min bei 6000 g zentrifugieren

Über die Zusammensetzung der einzelnen Puffer macht der Hersteller keine Angaben.

Anhang 6.5: Arbeitsanweisung des Elabscience Vitamin B₂ ELISA Kits

- Riboflavin-Standard (20 ng/mL) seriell 1:2 in Referenzstandard- und Probenverdünnungslösung verdünnen (Verdünnungsgradient: 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,31, 0,16 ng/mL und 0 ng/mL (Verdünnungslösung ohne Riboflavin-Standard))
- Proben entsprechend der zu erwartenden Riboflavin-Konzentration ebenfalls in Referenzstandard- und Probenverdünnungslösung verdünnen
- 50 µL von jedem Standard bzw. jeder Probe in jeweils zwei Wells der Mikrotiterplatte pipettieren
- direkt danach 50 µL des verdünnten, biotinylierten Detektionsantikörpers (1:100 in Antikörperverdünnungslösung) in jedes Well geben, Inkubation der Mikrotiterplatte für 45 min bei 37 °C
- Inhalt der Wells verwerfen, 350 µL Waschpuffer in jedes Well geben und nach 2 min verwerfen, Waschschrift insgesamt 3-mal wiederholen
- 100 µL des verdünnten Meerrettichperoxidase- (eng. *Horseradish peroxidase*, HRP) Konjugats (1:100 in Konjugatverdünnungslösung) in jedes Well geben, Inkubation der Mikrotiterplatte für 30 min bei 37 °C
- Inhalt der Wells verwerfen, 350 µL Waschpuffer in jedes Well geben und nach 2 min verwerfen, Waschschrift insgesamt 5-mal wiederholen
- 90 µL der Substratlösung in jedes Well geben, Inkubation der Mikrotiterplatte für 15 min bei 37 °C
- 50 µL der Stopplösung in jedes Well geben
- Bestimmung der OD-Werte mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes (s. Anhang 1.4, Tabelle 44) bei einer Wellenlänge von 450 nm

Über die Zusammensetzung der einzelnen Puffer macht der Hersteller keine Angaben.

Anhang 7: Weitere Elektropherogramme

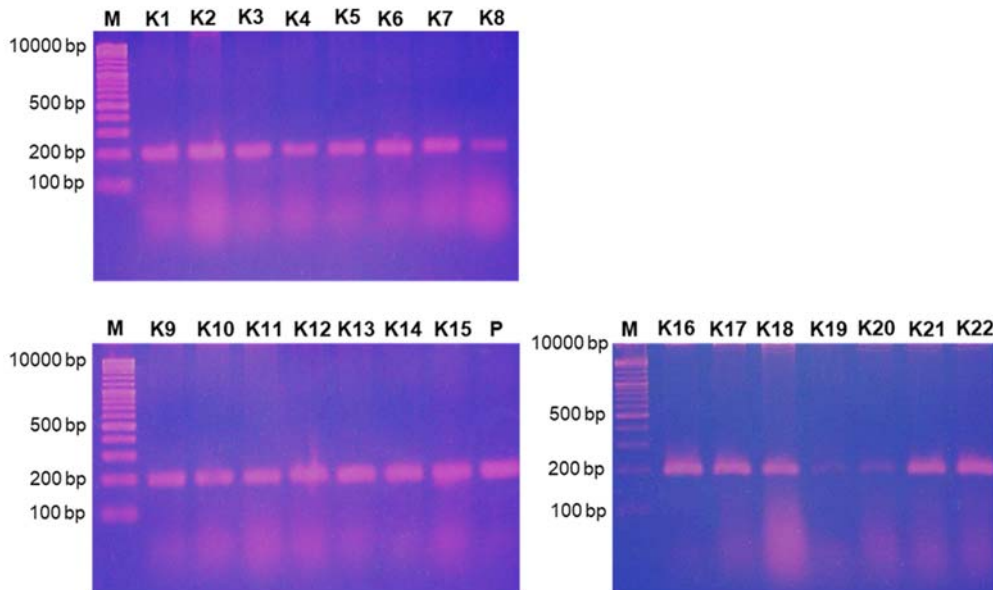


Abbildung 42: Elektropherogramme des pTargetF-ribA-Screenings nach CRISPR-Cas9-Event. Zu sehen sind die Elektropherogramme der 2%igen Agarosegele nach der Durchführung der Kolonie-PCR. Es wurden 22 *E. coli*-Kolonien (K1-K22) nach dem CRISPR-Cas9-Event auf das Vorhandensein des Plasmids pTargetF-ribA überprüft. Zusätzlich wurde in der PCR eine Positiv-Kontrolle (P) mitgeführt, welche als Template die isolierte Plasmid-DNA von pTargetF-ribA enthielt. Alle untersuchten Kolonien zeigten eine spezifische Bande bei etwa 200 bp und enthielten somit das Plasmid. DNA-Marker (M).

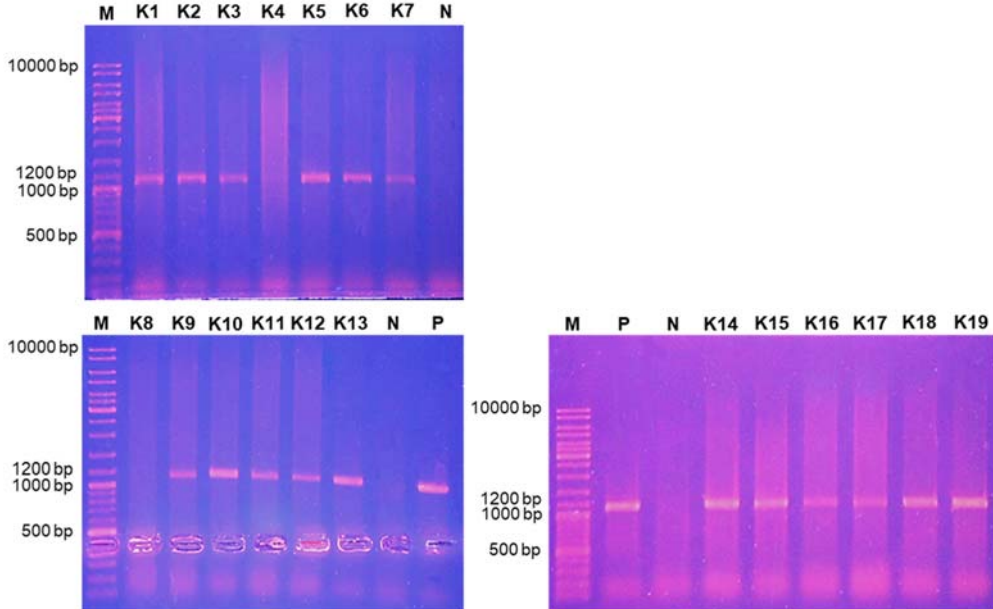


Abbildung 43: Elektropherogramme des pCas-Screenings nach CRISPR-Cas9-Event. Zu sehen sind die Elektropherogramme der 1%igen Agarosegele nach der Durchführung der Kolonie-PCR. Es wurden 19 *E. coli*-Kolonien (K1-K19) nach dem CRISPR-Cas9-Event auf das Vorhandensein des Plasmids pCas überprüft. Zusätzlich wurde in der PCR eine Positiv-Kontrolle (P) mitgeführt, welche als Template die isolierte Plasmid-DNA von pCas enthielt. Für die Negativ-Kontrolle (N) wurde eine Plasmid-freie *E. coli*-Kolonie verwendet. Mit Ausnahme von K4 und K8 sowie der Negativ-Kontrolle, zeigten alle untersuchten Kolonien eine spezifische Bande bei etwa 1100 bp und enthielten somit das Plasmid. DNA-Marker (M).

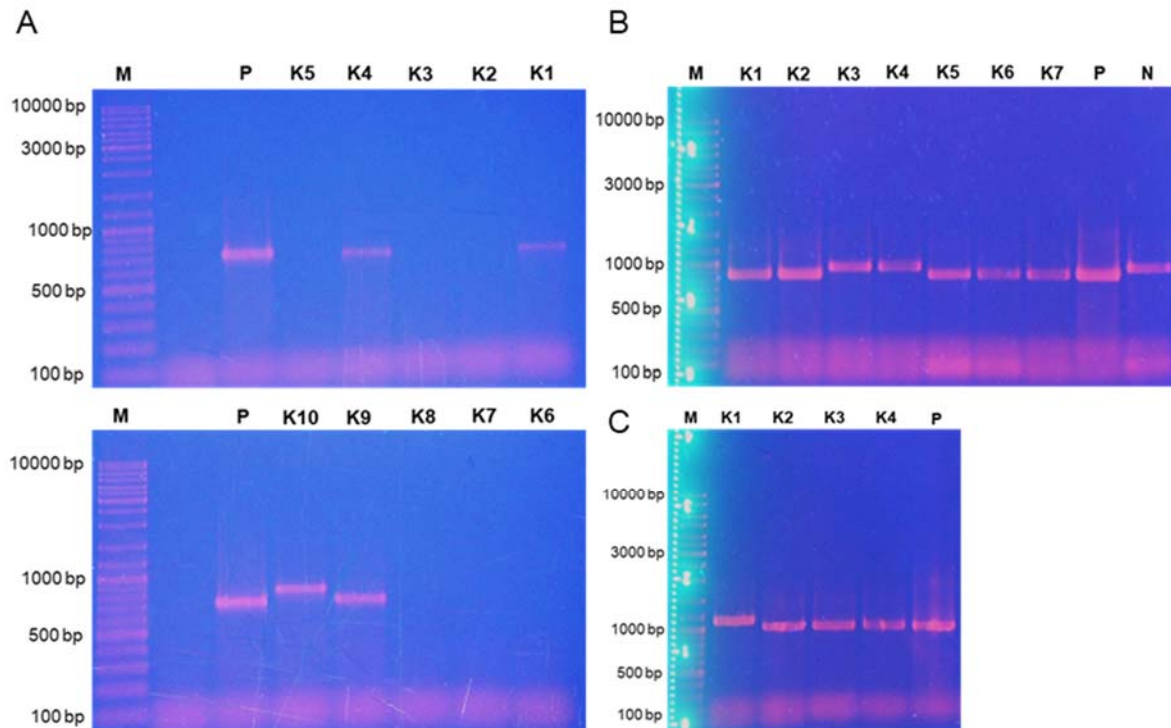


Abbildung 44: Elektropherogramme der Kolonie-PCRs im Anschluss an die CRISPR-Cas9-Events zum Knockout von *ycsE* (A), *yitU* (B) bzw. *ywtE* (C). Zu sehen sind die Elektropherogramme der 1%igen Agarosegele nach der Durchführung der Kolonie-PCRs. Es wurden 10 (A), 7 (B) bzw. 4 (C) Plasmid-freie *B. subtilis*-Kolonien (K1-K10) nach den CRISPR-Cas9-Events auf die entsprechende Mutation geprüft. Bei der Positiv-Kontrolle (P) handelte es sich um die jeweilige zur Genom Editierung verwendete Plasmid-DNA (pJOE8999-*ycsE*-DT, pJOE8999-*yitU*-DT bzw. pJOE8999-*ywtE*-DT). Die Kolonien K1, K4 und K9 (A), K1, K2 und K5-K7 (B) sowie K2-K4 (C) zeigten eine DNA-Bande auf der Höhe der jeweiligen Positiv-Kontrolle und deuteten auf eine erfolgreiche Mutation hin. Alle weiteren Kolonien wiesen entweder ein etwa 100 bp längeres Fragment auf oder es wurde keine sichtbare DNA-Bande erhalten. Negativ-Kontrolle (N), DNA-Marker (M).

Anhang 8: Ablaufschemata der SDM-PCR-Reaktionen und Lokalisierung der für die Klonierung der *Donor-Templates* in das Plasmid pJOE8999 genutzten Restriktionsschnittstellen

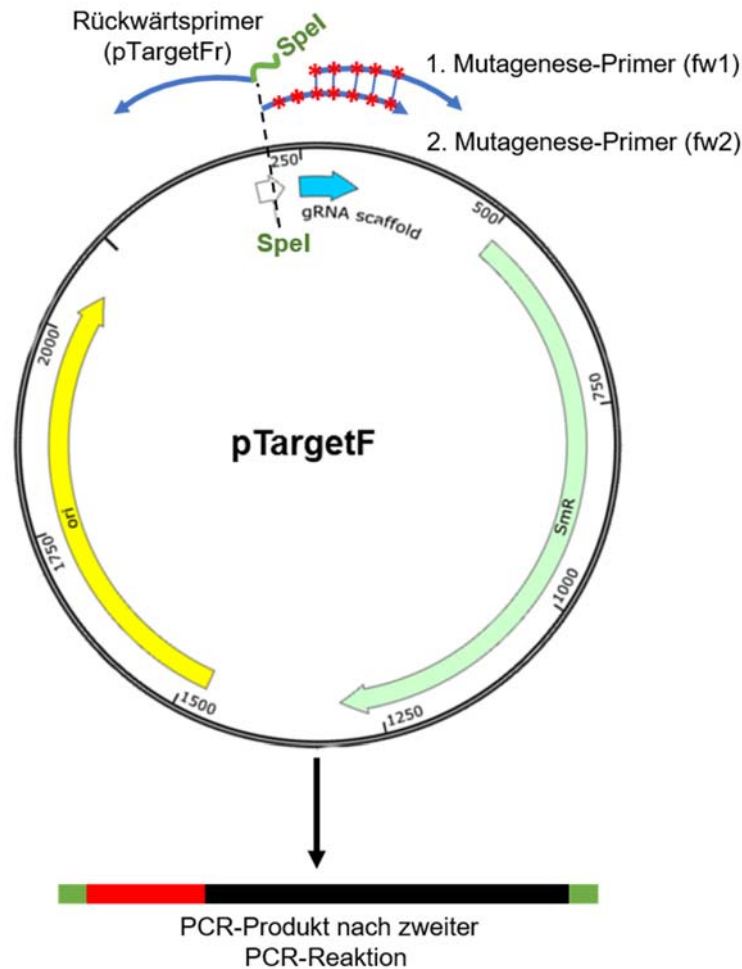


Abbildung 45: Schematische Darstellung der SDM-PCR-Reaktion zur Herstellung der Plasmide pTargetF-*ribB1/B2* und pTargetF-*ribC1/C2*. Die *Spel*-Restriktionsschnittstellen (A*CTAGT) sind in Grün dargestellt. Die roten Sternchen kennzeichnen die nicht-komplementären Nukleotide in den Oligonukleotid-Sequenzen der Mutagenese-Primer (fw1 und fw2). Die Mutagenese-Primer binden in der Region auf dem Plasmid, in der sich die DNA-Sequenzen der ursprünglichen crRNA und der tracrRNA befinden (hier: *gRNA scaffold*). Als Template der ersten SDM-PCR wurde Plasmid-DNA von pTargetF verwendet. Für die zweite SDM-PCR wurde das aufgereinigte (s. 7.2.2), lineare PCR-Produkt der ersten PCR verwendet, das bereits einen Teil der neuen crRNA-Sequenz enthielt und somit einen komplementären Bereich (hier als blaue Linien dargestellt) zum zweiten Mutagenese-Primer (fw2) aufwies. Als Endprodukt der zweiten SDM-PCR wurde lineare Plasmid-DNA (schwarz) mit der vollständigen DNA-Sequenz der jeweiligen crRNA (rot) und einer *Spel*-Restriktionsschnittstelle an beiden Enden (grün) erhalten. Die Vektorkarte wurde mit der Software SnapGene® erstellt.

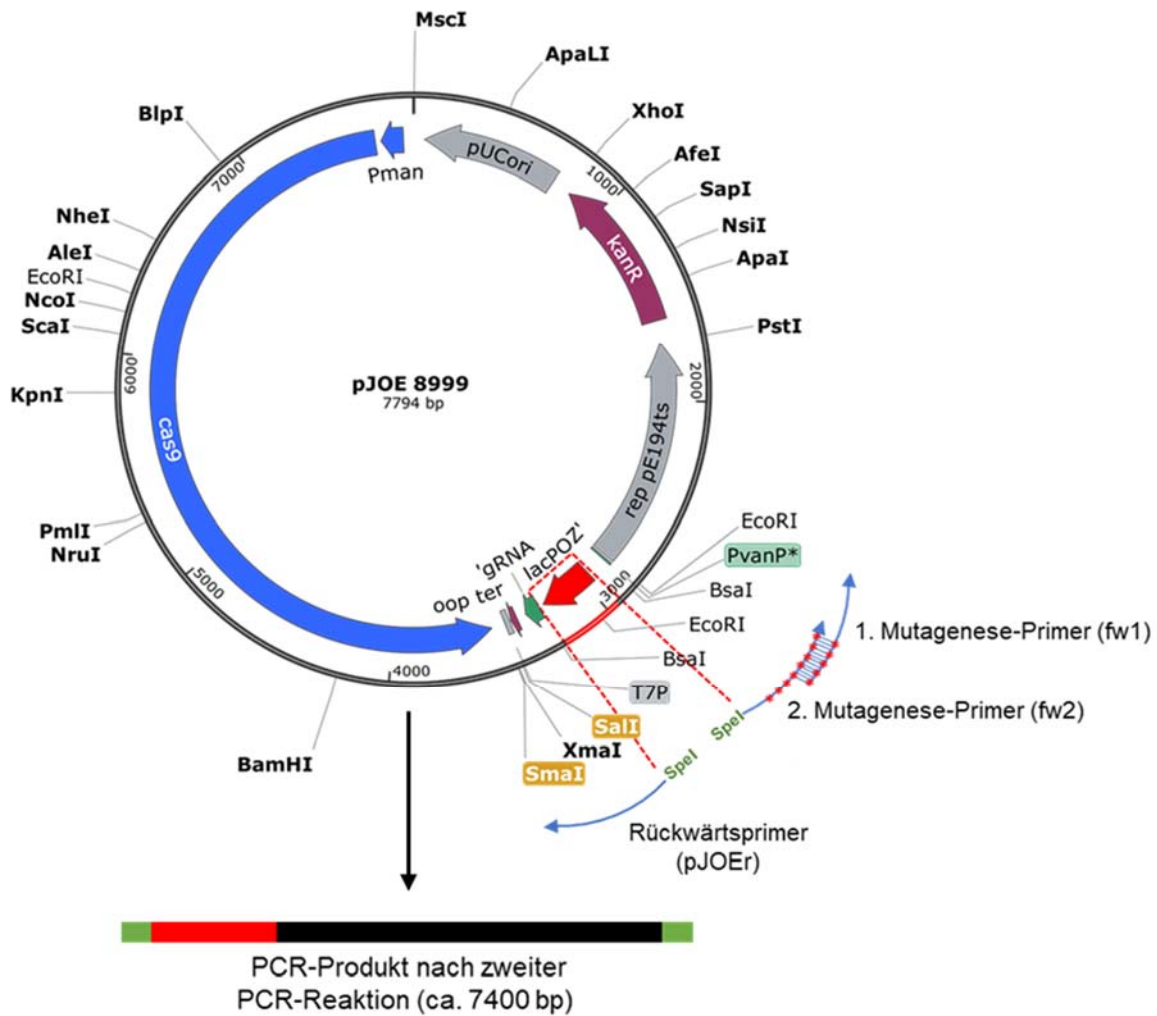


Abbildung 46: Schematische Darstellung der SDM-PCR-Reaktion zur Herstellung der Plasmide pJOE8999-ycsE, pJOE8999-yitU und pJOE8999-ywtE. Die SpeI-Restriktionsschnittstellen (A*CTAGT) sind in Grün dargestellt. Die roten Sternchen kennzeichnen die nicht-komplementären Nukleotide in den Oligonukleotid-Sequenzen der Mutagenese-Primer (fw1 und fw2). Die Mutagenese-Primer binden unmittelbar vor der Region auf dem Plasmid, in der sich die DNA-Sequenz der tracrRNA befindet (hier: *gRNA*). Die erste PCR wurde mit dem mutagenen Primer (fw1) durchgeführt, der den ersten Teil der 20 Basenpaare der crRNAs einführte sowie dem Rückwärts-Primer pJOEr, der eine SpeI-Restriktionsschnittstelle einführte. Für die zweite SDM-PCR wurde das aufgereinigte (s. 7.2.2), lineare PCR-Produkt der ersten PCR verwendet, das bereits einen Teil der neuen crRNA-Sequenz enthielt und somit einen komplementären Bereich (blaue Linien) zum zweiten Mutagenese-Primer (fw2) aufwies. Die *lacZ*-Gensequenz sollte in dieser Arbeit nicht genutzt werden und wurde daher nicht amplifiziert. Als Endprodukt der zweiten SDM-PCR wurde lineare, um ca. 350 bp reduzierte Plasmid-DNA (schwarz) mit der vollständigen DNA-Sequenz der jeweiligen crRNA (rot) und einer SpeI-Restriktionsschnittstelle an beiden Enden (grün) erhalten. Die Restriktionsschnittstellen (SmaI = CCC*GGG, SalI = G*TCGAC), welche für die spätere Klonierung der *Donor-Templates* verwendet wurden, sind in Gelb hervorgehoben. Die Vektorkarte wurde mit der Software SnapGene® erstellt.

Anhang 9: Ablaufschema der OE-PCR

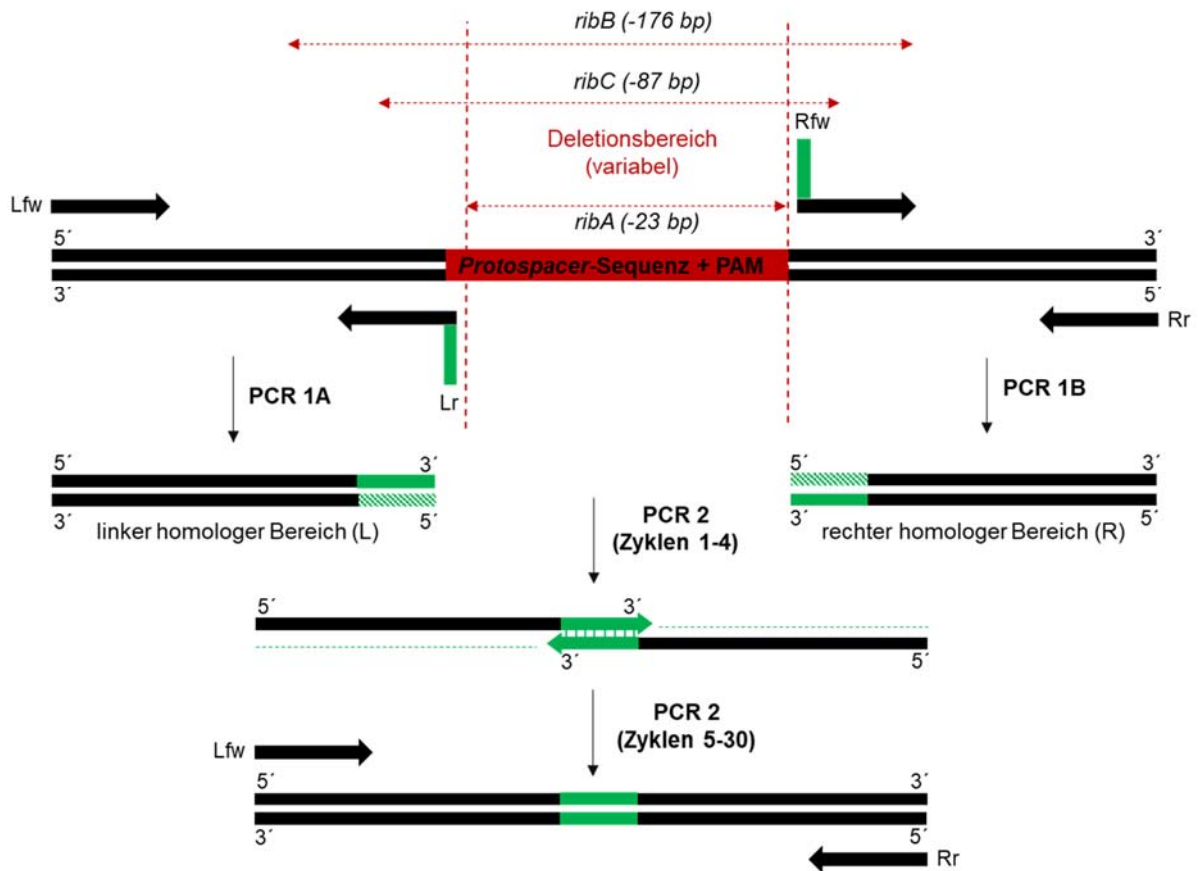


Abbildung 47: Schematische Darstellung der OE-PCR. Die Abbildung zeigt die Herstellung der *Donor-Templates* am Beispiel von *DTribA*, *DTribB* und *DTribC*. Die innerhalb der ersten beiden PCR-Reaktionen (1A und 1B) von den jeweiligen inneren Primern (Lr und Rfw) eingebrachten komplementären Sequenzen sind in Grün dargestellt. In der zweiten PCR-Reaktion (Zyklen 1-4) werden die beiden synthetisierten Einzelfragmente (L und R) denaturiert und hybridisieren an ihren komplementären Enden. Zur übersichtlicheren Darstellung werden hier nur die Hybridisierungen der Einzelstränge mit den freien 3'-Enden (grün) dargestellt, die während der Elongation von der Polymerase aufgefüllt werden. Die Fragmente mit den komplementären Sequenzen am 5'-Ende (grün-weiß schraffiert) können nicht elongiert werden. In den nachfolgenden PCR-Zyklen (Zyklen 5-30) binden die äußeren Primer (Lfw und Rr) an die entstandenen Kompletzfragmente (*Donor-Templates*) und initiieren ihre exponentielle Vervielfältigung. Die Abbildung zeigt die Flexibilität der OE-PCR-Technik: Insertionen können durch das Hinzufügen der gewünschten Sequenzen an den 5'-Enden der Primer Lr und Rfw (grün) eingebracht werden, die Größe des zu deletierenden Bereichs (rot-gestrichelte Pfeile) ist durch die Gestaltung der 3'-Enden der Primer (schwarz), die auf beiden Seiten der Deletion binden, beliebig veränderbar. Bei der Herstellung der *Donor-Templates* für *B. subtilis* wurden mit Hilfe der äußeren Primer (Lfw und Rr) Restriktionsschnittstellen für die Nukleasen Smal und Sall an den äußeren Enden der Fragmente eingebracht.

Anhang 10: MFE und Sekundärstruktur-Vorhersage der crRNA-Sequenz *ribC1*

Die Berechnung der MFE sowie die Strukturvorhersage der crRNA-Sequenzen erfolgte mittels des Vienna RNA Webservers in der Version 2.4.18. (s. 6.3, Tabelle 11). Nachfolgend werden die Ergebnisse für die crRNA-Sequenz von *ribC1* dargestellt:

RNAfold WebServer

Results for minimum free energy prediction

The optimal secondary structure in dot-bracket notation with a minimum free energy of -6.00 kcal/mol is given below.

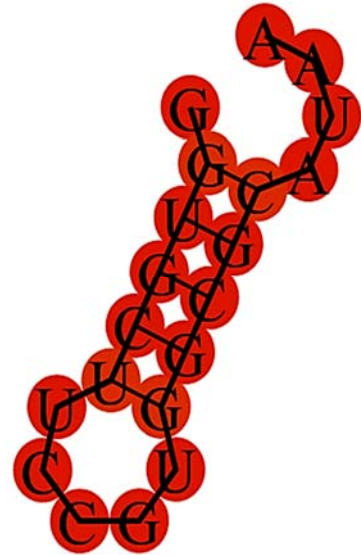


Abbildung 48: Sekundärstruktur-Vorhersage für die crRNA-Sequenz *ribC1*. Für die crRNA-Sequenz wurde eine MFE von -6,00 kcal/mol ermittelt und eine Sekundärstruktur in Form einer Haarnadel-Struktur vorhergesagt.

Anhang 11: Wachstumskurve *B. subtilis* NIG1121

Die Wachstumskurve für den Stamm *B. subtilis* NIG1121 wurde wie unter 7.1.1 beschrieben erstellt.

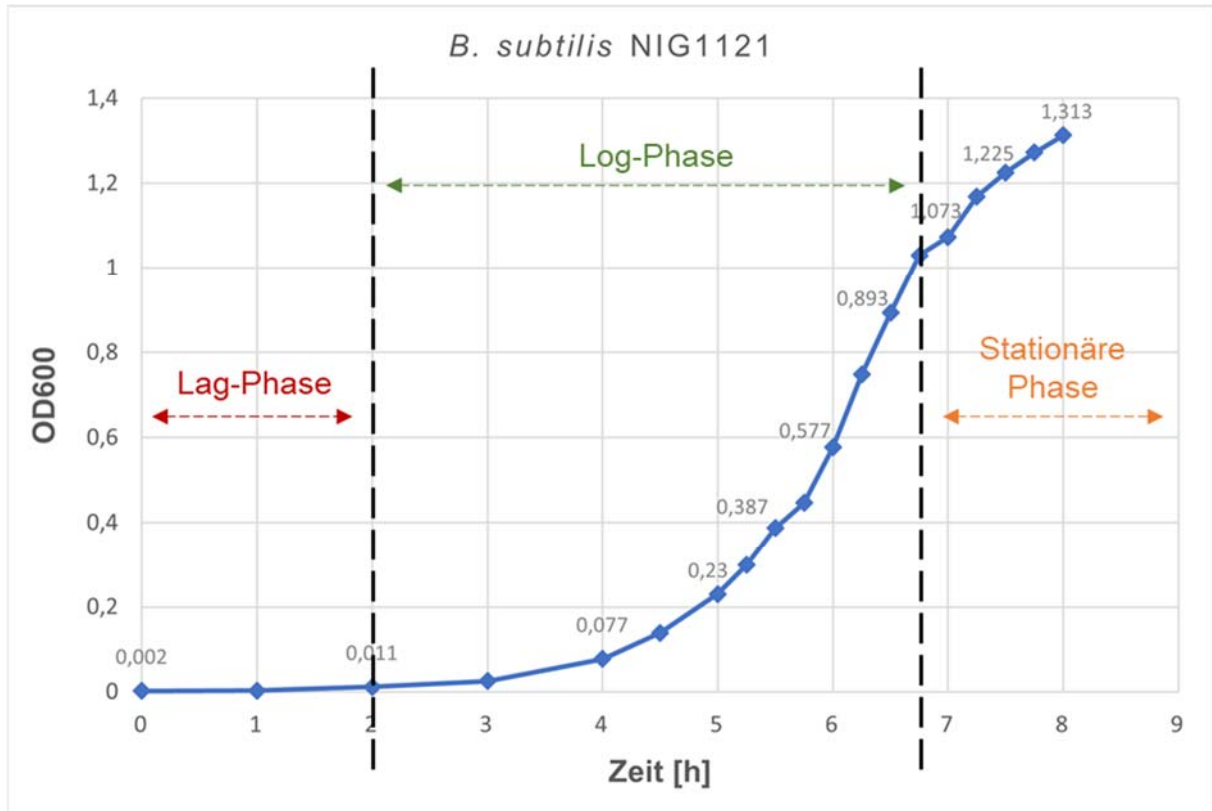


Abbildung 49: Wachstumskurve von *B. subtilis* NIG1121 bei 30 °C in LB-Medium. Die Latenzphase (Lag-Phase), die exponentielle Phase (Log-Phase) und die stationäre Phase wurden durch strichlierte Pfeile und Linien gekennzeichnet.

Anhang 12: Optimierung der Elektroporationsmethode für *B. subtilis*

Anhang 12.1: Bestimmung der Elektroporationseffizienz von *B. subtilis* unter Anwendung der Transformationsmethode nach Dower et al.

Die Herstellung der elektrokompetenten Zellen erfolgte zunächst analog zu der unter 7.1.2 beschriebenen Methode für *E. coli*. Für die Elektroporation wurden elektrische Feldstärken von 17 kV/cm bzw. 20 kV/cm eingesetzt. Es wurden jeweils 50 ng Plasmid-DNA (pJOE8999-Ursprungsplasmid) zur Transformation verwendet. Die Zellen wurden wie unter 7.2.9.2 weiter beschrieben, inkubiert und auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30 °C. Auf der Grundlage der gebildeten Kolonien wurde die Transformationseffizienz berechnet. Die Ergebnisse der Dreifachbestimmungen sind in Tabelle 48 zusammengefasst.

Tabelle 48: Elektroporationseffizienz der elektrokompetent hergestellten *B. subtilis*-Zellen unter Anwendung einer elektrischen Feldstärke von 17 kV/cm bzw. 20 kV/cm.

Elektrische Spannung [kV/cm]	Elektroporationseffizienz [cfu/μg]*
17	$2,4 \times 10^2$
20	$1,0 \times 10^2$

* Mittelwerte aus Dreifachbestimmung

Anhang 12.2: Erhöhung der Transformationsrate durch den Einsatz osmoprotektiver Substanzen und hoher elektrischer Feldstärken

Die Herstellung der elektrokompetenten Zellen erfolgte analog zu den in Anhang 12.1 und Abschnitt 7.1.2 beschriebenen Bedingungen. Wachstums-, Elektroporations- und *Recovery*-Medium wurden in Anlehnung an Meddeb-Mouelhi et al. (2012) durch Medien ersetzt, welche verschiedene osmoprotektive Substanzen enthielten (*D*-Mannitol, *D*-Sorbitol, Glycin-Betain). Die Zusammensetzung der verwendeten Medien wird in Abschnitt 6.9, Tabelle 15 aufgeführt. Die verwendeten Lösungen sind in Anhang 1.2, Tabelle 41 aufgeführt. Das Elektroporationsprotokoll ist in der unten aufgeführten Tabelle (Tabelle 49) zusammengefasst. Die Dreifachbestimmung des Versuches ergab eine mittlere Transformationsrate von $9,7 \times 10^2$ cfu/μg.

Tabelle 49: Protokoll zur Herstellung und Transformation elektrokompetenter Zellen unter Einsatz osmoprotektiver Substanzen und hoher elektrischer Feldstärken.**Herstellung der kompetenten Zellen**

Erntezeitpunkt	OD600 = 0,85
Wachstumsmedium	LBS
Elektroporationsmedium	SMGG
Recovery-Medium	LBSM
Elektroporation	
Zellvolumen	50 µL
Plasmid-DNA (Quantität)	50 ng
Elektrische Feldstärke	2000 V/mm
Entladungszeit	5 ms

Anhang 12.3: Weitere Erhöhung der Transformationsrate durch Zugabe von Zellhüllen-schwächenden Substanzen zum Wachstumsmedium

Die Herstellung der elektrokompetenten Zellen sowie die nachfolgende Elektroporation erfolgten größtenteils analog zu den in Anhang 12.2 und Abschnitt 7.1.2 beschriebenen Bedingungen. Die Zellen wurden in LBS-Medium kultiviert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 wurden den Kulturen eine oder mehrere der Zellhüllen-schwächenden Substanzen (Glycin, *DL*-Threonin und/oder Tween 80) aus sterilen Stammlösungen bis zu einer Endkonzentration von 0,64%, 10,2% bzw. 0,05% hinzugegeben. Die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Medienzusätze wird unter 6.9, Tabelle 15 aufgeführt. Die Ergebnisse der Dreifachbestimmungen sind in Tabelle 50 zusammengefasst.

Tabelle 50: Einfluss verschiedener Zellhüllen-schwächender Additive im Wachstumsmedium auf die Elektroporationseffizienz von *B. subtilis* NIG1121.

Zugabe Zellhüllen-schwächender Additive	Elektroporationseffizienz [cfu/µg]*
Glycin	$3,87 \times 10^3$
Tween 80	$1,69 \times 10^3$
<i>DL</i> -Threonin	-
Glycin + Tween 80	$3,15 \times 10^4$
Glycin + Tween 80 + <i>DL</i> -Threonin	$1,72 \times 10^4$

* Mittelwerte aus Dreifachbestimmung

Anhang 14: Visualisierung des zusätzlichen SNPs in den NGS-Daten der Tripledeletionsmutante

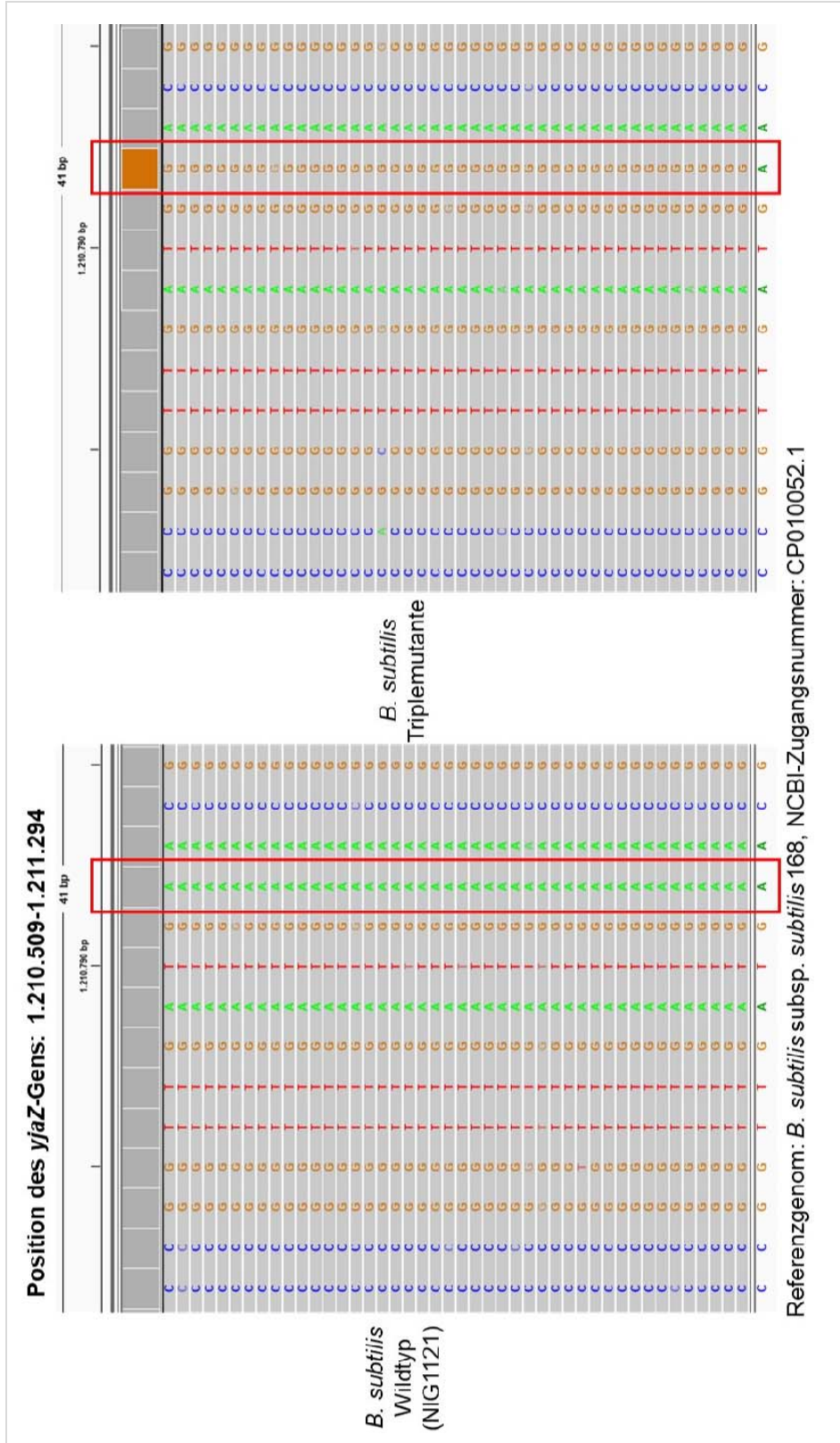


Abbildung 51: Visualisierung des mittels BCFtools und IGV-Software identifizierten SNPs im *yjaZ*-Gen der Tripledeletionsmutante. In der Abbildung ist zu sehen, dass der *B. subtilis* Wildtyp (links) an Position 1.210.792 des Genoms (Bereich des *yjaZ*-Gens) entsprechend des Referenzgenoms von *B. subtilis* 168 (Nukleotide unterhalb des grau hinterlegten Bereichs) ein Adenin-Nukleotid aufweist, während die NGS-Daten der Tripledeletionsmutante (rechts) an der gleichen Position ein Guanin-Nukleotid zeigen. Die Nukleotide wurden in beiden Sequenzen mit einem roten Rahmen hervorgehoben. Der SNP an dieser Position führt zu einer veränderten Peptidsequenz (Missense-Mutation). Aus dem Basentriplett GAA (Glutaminsäure) wird GGA (Glycin).

Anhang 15: REM-Aufnahmen des *B. subtilis* Wildtypen und der Deletionsmutanten

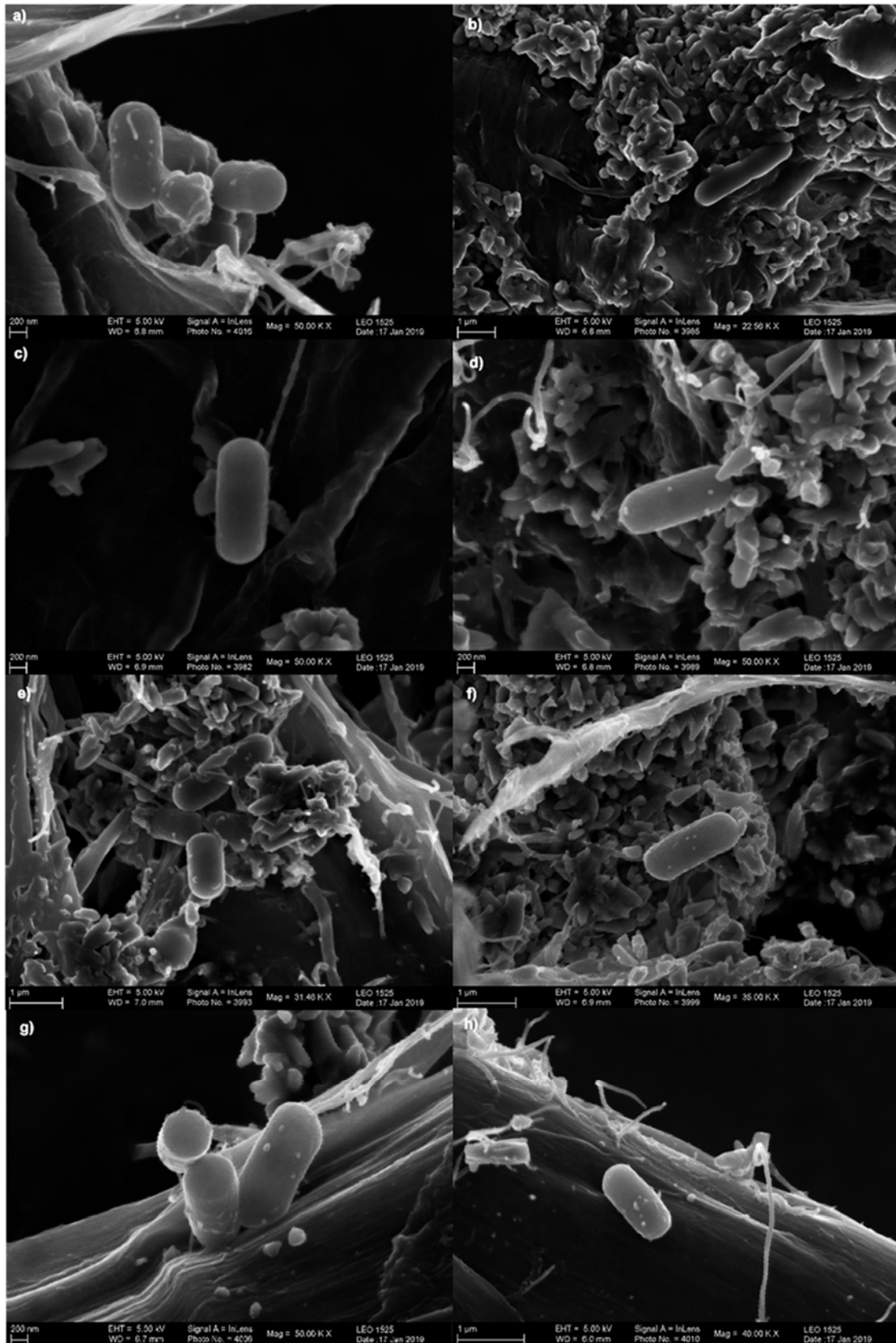
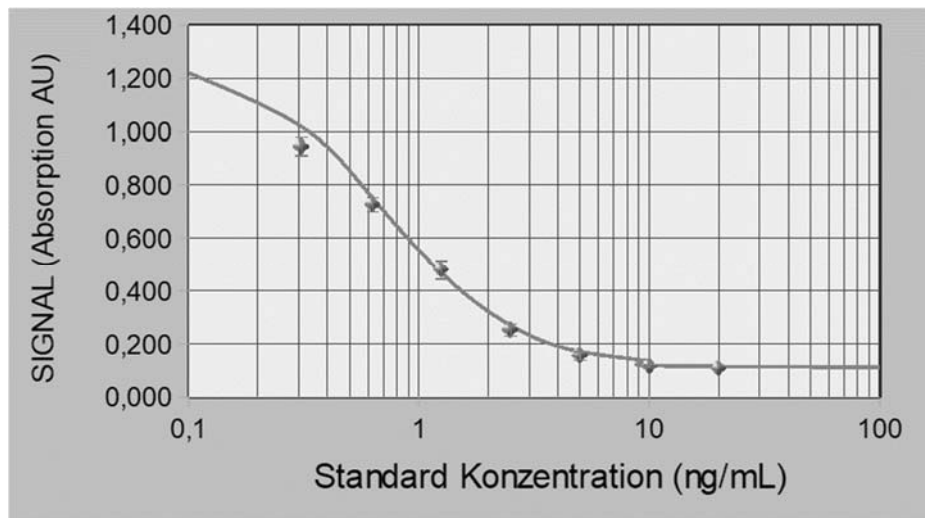


Abbildung 52: REM-Aufnahmen des LEO 1525 Gemini (23 000 bis 50 000-fache Vergrößerung). a) *B. subtilis* Wildtyp, b) $\Delta yitU$, c) $\Delta ycsE$, d) $\Delta ywtE$, e) $\Delta ycsE/\Delta yitU$, f) $\Delta ycsE/\Delta ywtE$, g) $\Delta yitU/\Delta ywtE$, h) $\Delta ycsE/\Delta yitU/\Delta ywtE$.

Anhang 16: Standardkurve und Messwerte des Riboflavin-ELISAs



Probenbezeichnung (Doppelbestimmung)	Absorption		Mittelwert	Konzentration	Verdünn.	Volumen	Einwaage	Ergebnis Riboflavin	
	1	2	AU	ng/mL	Faktor	mL	mg	ng/mg	ng/100mg Zellnassgewicht
Wildtyp	0,499		0,499	1,15	5	0,6	136,000	0,0254	2,541
Wildtyp	0,517		0,517	1,10	5	0,6	130,700	0,0252	2,524
$\Delta ycsE$	0,950	1,134	1,042	0,28	5	0,6	77,900	0,0110	1,10
$\Delta ycsE$	0,940	0,932	0,936	0,40	5	0,6	82,500	0,0144	1,44
$\Delta ywtE$	0,806		0,806	0,55	5	0,6	132,500	0,0125	1,25
$\Delta ywtE$	0,765		0,765	0,61	5	0,6	131,600	0,0139	1,39
$\Delta yitU$	0,883		0,883	0,46	5	0,6	126,100	0,0109	1,09
$\Delta yitU$	0,843		0,843	0,51	5	0,6	114,000	0,0133	1,33
$\Delta ycsE/\Delta ywtE$	0,797		0,797	0,57	5	0,6	91,800	0,0185	1,85
$\Delta ycsE/\Delta ywtE$	0,836		0,836	0,51	5	0,6	101,900	0,0152	1,52
$\Delta yitU/\Delta ywtE$	0,910		0,910	0,43	5	0,6	108,600	0,0118	1,18
$\Delta yitU/\Delta ywtE$	0,823		0,823	0,53	5	0,6	107,500	0,0148	1,48
$\Delta yitU/\Delta ycsE$	1,214		1,214	0,11 (< BG)	5	0,6	111,200	0,0029	0,29
$\Delta yitU/\Delta ycsE$	1,109		1,109	0,22 (< BG)	5	0,6	101,200	0,0064	0,64
$\Delta ycsE/\Delta yitU/\Delta ywtE$	1,113		1,113	0,21 (< BG)	5	0,6	117,800	0,0054	0,54
$\Delta ycsE/\Delta yitU/\Delta ywtE$	1,321		1,321	High (< BG)	5	0,6	128,900		

Abbildung 53: Standardkurve und Messwerte der Zellpellets im Riboflavin-ELISA.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Markus Fischer möchte ich für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die Bereitstellung des interessanten Themas und der Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen.

Frau Prof. Dr. Agnes Weiß danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. Josef Altenbuchner (Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart) danke ich für die Bereitstellung des CRISPR-Cas9 Vectors pJOE8999. Hierdurch wurden mir die an *B. subtilis* durchgeführten genetischen Veränderungen enorm erleichtert.

Meinen Diplomanden/Masteranten/Bacheloranten, Vivien Nemes, Anna Marieke Feldmann, Farshad Rostami, Lars Höft und Florian Neumann möchte ich für ihr Engagement und die hervorragende Zusammenarbeit danken.

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Boris Illarionov aussprechen, der mit mir sein Wissen und seine Erfahrungen insbesondere in den Fachgebieten der Molekularbiologie und Mikrobiologie geteilt hat und immer ein offenes Ohr bzw. wertvolle Tipps für mich hatte.

Meinen Arbeitskollegen im Institut für Lebensmittelchemie, insbesondere, Annika Honold, Bernadette Richter, Doreen Teske, Juliane Klare, Kristian von Wuthenau, Nicolas Cain, Stefanie Schelm und Torben Segelke möchte ich für die wunderbare Arbeitsatmosphäre, sehr viel gute Laune und interessante wissenschaftliche Diskussionen danken.

Meinen Freunden, vor allem Svenja, Marie, Andre und Bernadette danke ich für jegliche (mentale) Unterstützung.

Meinem Vater und Birgit danke ich dafür, dass sie mich immer ermutigt haben, das zu tun, was mich glücklich macht.

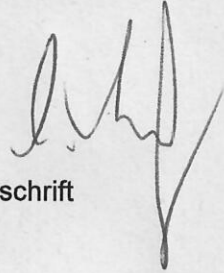
Meinem Mann danke ich für jegliche Rückenstärkung und die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, in denen er nie seinen Humor verliert.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

06.07.23

Datum, Unterschrift

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long vertical stroke at the end.