

**Untersuchungen zur Rolle
einer *clpA*-Mutation für die Entstehung
hoch fluorchinolonresistenter Mutanten
von *Escherichia coli***

An der Universität Hamburg eingereichte

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (*Dr. rer. nat.*) an der
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
Fachbereich Chemie,
Institut für Biochemie und Molekularbiologie

vorgelegt von

Alina Schwarz

– Hamburg 2023 –

Begutachtung:

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Peter Heisig
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. Daniel N. Wilson

Prüfungskommission:

- 1. Vorsitz:** Prof. Dr. Peter Heisig
- 2. Stellvertretender Vorsitz:** Prof. Dr. Wolfgang Streit
- 3. Mitglied:** Prof. Dr. Ralph Holl

Datum der Disputation: 31.08.2023

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2016 bis Dezember 2021 unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Heisig in der Abteilung für Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie am Institut für Biochemie und Molekularbiologie im Fachbereich Chemie der MIN-Fakultät der Universität Hamburg angefertigt.

Für meine Eltern

I. Publikationsliste

The impact of a novel ClpA mutation on MazEF antitoxin-toxin system in *Escherichia coli* in the presence of antibiotic stress.

A. Schwarz, A. Heisig, P. Heisig

6th Joint Conference of the DGHM & VAAM, Leipzig, Germany, 08 – 11 March 2020,

281-MSRP Microbial Stress Response, Poster

II. Inhaltsverzeichnis

I.	PUBLIKATIONSLISTE	I
II.	INHALTSVERZEICHNIS	II
III.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VII
IV.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XV
V.	TABELLENVERZEICHNIS	XIX
VI.	FORMELVERZEICHNIS.....	XXI
1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	ABSTRACT	3
3	EINLEITUNG UND AKTUELLER WISSENSCHAFTLICHER KENNTNISSTAND	5
3.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i>	9
3.1.1	<i>Die Bedeutung von E. coli als Krankheitserreger</i>	11
3.2	STRUKTUR UND WIRKUNG VON FLUORCHINOLONEN	13
3.3	RESISTENZMECHANISMEN GEGENÜBER FLUORCHINOLONEN	19
3.3.1	<i>Chromosomal codierte FQ-Resistenz durch eine veränderte Zielstruktur</i>	20
3.3.2	<i>Chromosomal codierte FQ-Resistenz durch eine reduzierte Wirkstoffakkumulation in der Bakterienzelle</i>	21
3.3.3	<i>Plasmid-vermittelte FQ-Resistenz</i>	24
3.4	SELEKTION HOCH FLUORCHINOLONRESISTENTER <i>ESCHERICHIA COLI</i> MUTANTEN <i>IN-VITRO</i>	26
3.5	DIE ATPASE CLPA	27
3.6	PROTEASEN	29
3.6.1	<i>Aufbau und Funktion des ClpAP-Komplexes</i>	33
4	ZIELSETZUNG UND PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT	37
5	ERGEBNISSE	38
5.1	CHARAKTERISIERUNG DER <i>CLPA</i> -MUTATION DER MUTANTE <i>E. COLI</i> MIVA	38
5.2	KONSTRUKTION VERSCHIEDENER PLASMIDE ZUR KOMPLEMENTATION DER <i>CLPA</i> -MUTATION.....	41
5.3	KONSTRUKTION GENOMISCHER <i>CLPA</i> -MUTANTEN MIT DEM CRISPR/ <i>CAS9</i> -SYSTEM	44
5.3.1	<i>Mutagenese von E. coli WT mit der clpA-Mutation aus E. coli MIVa</i>	44
5.3.1.1	Konstruktion von pKDsgRNA-HPclpA.....	45
5.3.1.2	Überprüfung der N ₂₀ -Sequenz	47

5.3.1.3	Untersuchung der Mutanten auf das Vorliegen ausschließlich der gewünschten <i>clpA</i> -Mutation	48
5.3.2	<i>Mutagenese von E. coli MIVa mit der clpA-Wildtypsequenz aus E. coli WT</i>	49
5.3.2.1	Direkte Mutagenese	49
5.3.2.1.1	Konstruktion von pKDsgRNA-HPclpA-MIVa	49
5.3.2.1.2	Überprüfung der N ₂₀ -Sequenz	51
5.3.2.1.3	Untersuchung der Mutanten auf das Vorliegen ausschließlich der gewünschten <i>clpA</i> -Mutation	52
5.3.2.1.4	Genotypische Charakterisierung der <i>clpA</i> -Mutanten	53
5.3.2.2	Indirekte Mutagenese über die Zwischenstufe der <i>E. coli MIVa clpA</i> (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14	55
5.3.2.2.1	Konstruktion von pKDsgRNA-HPclpA-Mut14	55
5.3.2.2.2	Überprüfung der N ₂₀ -Sequenz	56
5.3.2.2.3	Untersuchung der Mutanten auf das Vorliegen ausschließlich der gewünschten <i>clpA</i> -Mutation	58
5.3.3	<i>Mutagenese von E. coli MIII mit der clpA-Mutation aus E. coli MIVa</i>	60
5.3.3.1	Untersuchung der Mutanten auf das Vorliegen ausschließlich der gewünschten <i>clpA</i> -Mutation	60
5.4	PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DER KOMPLEMENTIERTEN STÄMME UND DER GENOMISCHEN CLPA-MUTANTEN JEWEILS IM VERGLEICH ZU DEN VERWANDTEN REFERENZSTÄMMEN	61
5.4.1	<i>In-vivo Funktionstest von ClpA</i>	61
5.4.2	<i>Wachstumsverhalten dargestellt mit dem oCelloScope™</i>	64
5.4.3	<i>Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit</i>	68
5.4.3.1	Aminoglykosid MHK	69
5.4.3.2	Verschiedene MHK-Werte der genomischen <i>clpA</i> -Mutante	69
5.5	AUSWIRKUNGEN DER CLPA-MUTATION AUF DAS MAZEF ANTITOXIN-TOXIN SYSTEM GEZEIGT ANHAND DES WACHSTUMSVERHALTENS	70
5.5.1	<i>Hemmung der DNA-Replikation</i>	71
5.5.2	<i>Hemmung der Transkription</i>	74
5.5.3	<i>Hemmung der Translation</i>	76
5.6	AUSWIRKUNGEN DER CLPA-MUTATION AUF DAS MAZEF ANTITOXIN-TOXIN SYSTEM ANHAND VON EXPRESSIONSANALYSEN.....	78
5.7	AUSWIRKUNGEN DER CLPA-MUTATION IM ZUSAMMENHANG MIT ROS ANHAND VON EXPRESSIONSANALYSEN	84
5.8	AUSWIRKUNGEN DER CLPA-MUTATION AUF DEN SUPERSPIRALISIERUNGSGRAD DER BAKTERIENZELLEN.....	92
6	DISKUSSION	96
6.1	CHARAKTERISIERUNG DER CLPA-MUTATION	96
6.1.1	<i>Komplementation der clpA-Mutation</i>	99
6.1.2	<i>Konstruktion genomischer clpA-Mutanten mit dem CRISPR/Cas9-System</i>	101
6.1.2.1	Etablierung der Anwendung des no-SCAR Systems.....	102
6.1.2.2	Auswahl einer geeigneten sgRNA in Bezug auf die Targetspezifität.....	104
6.1.2.3	Auswahl eines geeigneten Oligonukleotids	107
6.1.2.4	Betrachtung der Effizienz der genomischen Mutagenese	111
6.2	EINFLUSS DER CLPA-MUTATION AUF DAS WACHSTUMSVERHALTEN	114
6.3	EINFLUSS DER CLPA-MUTATION AUF DIE ANTIBIOTIKAEMPFINDLICHKEIT.....	116

6.4	AUSWIRKUNGEN DER <i>CLPA</i> -MUTATION AUF DAS MAZEF ANTITOXIN-TOXIN SYSTEM	118
6.5	AUSWIRKUNGEN DER <i>CLPA</i> -MUTATION IM ZUSAMMENHANG MIT ROS	125
6.6	AUSWIRKUNGEN DER <i>CLPA</i> -MUTATION AUF DEN SUPERSPIRALISIERUNGSGRAD DER BAKTERIENZELLEN.....	136
7	AUSBLICK	140
8	EXPERIMENTELLER TEIL (MATERIAL UND METHODEN)	143
8.1	MATERIAL	143
8.1.1	<i>Bakterien</i>	143
8.1.2	<i>Plasmide</i>	148
8.1.3	<i>Oligonukleotide</i>	149
8.1.4	<i>Größenmarker für DNA</i>	151
8.1.5	<i>Enzyme</i>	152
8.1.6	<i>Kits</i>	154
8.1.7	<i>Chemikalien</i>	154
8.1.8	<i>Antibiotika</i>	156
8.1.9	<i>Puffer und Lösungen</i>	157
8.1.10	<i>Nährmedien und -agar</i>	158
8.1.11	<i>Geräte und sonstige Materialien</i>	158
8.1.12	<i>Software</i>	163
8.2	METHODEN	165
8.2.1	<i>Arbeiten mit Bakterien</i>	165
8.2.1.1	Lagerung und Kultivierung der Bakterienstämme	165
8.2.1.1.1	Stammhaltung	165
8.2.1.1.2	Anzucht und Zellernte.....	165
8.2.1.1.3	Kryokonservierung.....	166
8.2.1.2	Bestimmung der Lebendkeimzahl (KBE-Bestimmung)	166
8.2.1.3	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	167
8.2.1.4	Wachstumsversuche mit dem oCelloScope™	168
8.2.1.5	<i>In-vivo</i> Funktionstest von ClpA	169
8.2.1.6	Bestimmung des Superspiralisierungsgrades über den Qsc-Wert.....	171
8.2.2	<i>Arbeiten mit DNA</i>	173
8.2.2.1	Isolierung von DNA	173
8.2.2.1.1	Isolierung von chromosomaler DNA (Koch-Methode).....	173
8.2.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (Minipräparation)	174
8.2.2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA mittels Monarch® Plasmid-Kit (Minipräparation)	175
8.2.2.2	Amplifikation von DNA	176
8.2.2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	176
8.2.2.2.2	Fusions-PCR: SOEing	181
8.2.2.2.3	Inverse PCR: <i>Round-the-horn</i> Klonierung	182
8.2.2.2.4	Sequenzspezifische PCR: ARMS	184
8.2.2.3	Aufreinigung und Konzentrierung von DNA	189

8.2.2.3.1	Phenol/Chloroform-Extraktion	189
8.2.2.3.2	Ethanol-Präzipitation	190
8.2.2.3.3	Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	190
8.2.2.4	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren (Agarose-Gelelektrophorese).....	191
8.2.2.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen	192
8.2.2.5.1	Konzentrationsabschätzungen im Agarosegel	193
8.2.2.5.2	Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung (NanoDrop™).....	193
8.2.2.6	Enzymatische Modifizierung von DNA.....	194
8.2.2.6.1	Restriktion von DNA	194
8.2.2.6.2	Ligation von DNA	195
8.2.2.7	Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	197
8.2.2.7.1	CaCl ₂ -kompetente Bakterienzellen	198
8.2.2.7.2	Elektrokompetente Bakterienzellen	199
8.2.2.8	Übertragung von DNA durch Transformation von Bakterienzellen	199
8.2.2.8.1	Calciumchlorid-Methode	200
8.2.2.8.2	Elektroporation.....	201
8.2.2.9	Sequenzierung von DNA	201
8.2.2.9.1	Sanger-Sequenzierung	201
8.2.2.9.2	Pyrosequencing®	204
8.2.2.9.3	Next-Generation Sequencing.....	206
8.2.2.10	Genomische Mutagenese mit dem CRISPR/Cas9-System	208
8.2.2.10.1	Zwei-Plasmid-System	209
8.2.2.10.2	Übertragung der Mutation durch ein Oligonukleotid	213
8.2.2.10.3	Plasmid Curing.....	219
8.2.3	Arbeiten mit RNA	220
8.2.3.1	Zellernte für die RNA-Isolierung	221
8.2.3.2	Isolierung von Gesamt-RNA mit DNase-Behandlung und Aufreinigung	221
8.2.3.3	Qualitätsbestimmung der RNA	223
8.2.3.4	Quantitative <i>real-time</i> PCR (RT-qPCR)	223
8.2.3.4.1	Primer-Design	223
8.2.3.4.2	cDNA-Synthese (<i>Reverse Transkriptase</i> (RT) Reaktion)	224
8.2.3.4.3	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR)	225
8.2.3.4.4	Bestimmung der Genexpression.....	227
9	LITERATURLISTE	229
10	ANHANG	256
10.1	GEFAHRENSTOFFHINWEISE	256
10.2	SEKUNDÄRSTRUKTURANALYSE DER LANGEN OLIGONUKLEOTIDE DER GENOMISCHEN MUTAGENESE MIT DEM CRISPR/Cas9-SYSTEM	261
10.2.1	Oligonukleotid <i>clpA_1702delA_noSCAR</i>	261
10.2.2	Oligonukleotid <i>clpA_1702insA_noSCAR</i>	264

10.3	ERGEBNISSE DER SANGER-SEQUENZIERUNG DER GENOMISCHEN <i>CLPA</i> -MUTANTEN, KONSTRUIERT MIT DEM CRISPR/Cas9-SYSTEM	267
10.3.1	<i>Mutagenese von E. coli WT mit der clpA-Mutation aus E. coli MIVa</i>	267
10.3.2	<i>Mutagenese von E. coli MIVa mit der clpA-Wildtypsequenz aus E. coli WT</i>	273
10.3.2.1	Direkte Mutagenese	273
10.3.2.2	Indirekte Mutagenese über die Zwischenstufe der <i>E. coli MIVa clpA</i> (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14	276
10.3.3	<i>Mutagenese von E. coli MIII mit der clpA-Mutation aus E. coli MIVa</i>	277
10.4	ERGEBNISSE DER GENOMSEQUENZIERUNG.....	281
10.5	ERGEBNISSE DER SEQUENZSPECIFISCHEN PCR: ARMS	292
10.5.1	<i>Mutagenese von E. coli WT mit der clpA-Mutation aus E. coli MIVa</i>	292
10.5.2	<i>Mutagenese von E. coli MIVa mit der clpA-Wildtypsequenz aus E. coli WT</i>	293
10.5.2.1	Direkte Mutagenese	293
10.5.2.2	Indirekte Mutagenese über die Zwischenstufe der <i>E. coli MIVa clpA</i> (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14	297
10.5.3	<i>Mutagenese von E. coli MIII mit der clpA-Mutation aus E. coli MIVa</i>	301
10.6	ROHDATEN DER QUANTITATIVEN <i>REAL-TIME</i> PCR (RT-qPCR).....	302
10.6.1	<i>Expressionsanalysen zur Untersuchung der Auswirkungen der clpA-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System</i>	302
10.6.2	<i>Expressionsanalysen zur Untersuchung der Auswirkungen der clpA-Mutation im Zusammenhang mit ROS</i>	304
10.7	ROHDATEN DER BESTIMMUNG DES SUPERSPIRALISIERUNGSGRADES ÜBER DEN QSC-WERT.....	307
11	DANKSAGUNG	310
12	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	313

III. Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

AAA+	Oberfamilie der ATPasen (engl.: <i>ATPases associated with diverse cellular activities</i>)
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACS	engl.: <i>American Chemical Society</i> , geben u. a. internationalen Standard zur Spezifizierung von Chemikalien nach Qualität und Reinheit an
ad	auf (lat.)
ADEPs	Acyldepsipeptide (Antibiotikaklasse)
ÄZQ	Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin
AIEC	adhärentinvasive <i>E. coli</i>
AK	Arbeitskreis
Amp ^R	Ampicillinresistenz
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ARMS	sequenzspezifische PCR (engl.: <i>amplification refractory mutation system</i>)
ARS	Antibiotika-Resistenz-Surveillance, Datenbank des Robert Koch-Instituts
AS	Aminosäure(n)
aSD	Anti-Shine-Dalgarno
aTC	Anhydrotetracyclin
ATP	Adenosintriphosphat
AVS	Antibiotika-Verbrauchs-Surveillance, Datenbank des Robert Koch-Instituts
BCA	spezieller Algorithmus des oCelloScope™ (engl.: <i>background corrected absorption</i>)
BCL	<i>Base-Call</i> -Dateien während des Next-Generation Sequencing
bp	Basenpaare (engl.: <i>base pairs</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CCLR	Cell Culture Lysis Reagent (Firma: Promega Corporation)
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary</i> oder <i>copy DNA</i>)
Clm ^R	Chloramphenicolresistenz
CLP	Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen (engl.: <i>Classification, Labelling and Packaging of substances and mixtures</i>)
CRISPR	engl.: <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CRP	Transkriptionsfaktor (engl.: <i>cAMP receptor protein</i>)
Ct-Wert	Schwellenwert in der real-time PCR (engl.: <i>cycle threshold</i>)

Δ	Deletion
DAEC	diffus adhätierende <i>E. coli</i>
DART	Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie
DDD	definierte Tagesdosen eines Medikamentes (engl.: <i>defined daily doses</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
dH ₂ O	Reinstwasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
<i>DNase</i>	Desoxyribonuklease
DNDi	engl.: <i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA (engl.: <i>double stranded DNA</i>)
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EAEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
EB	Elutionspuffer (engl.: <i>elution buffer</i>)
ECDC	engl.: <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EMBO	engl.: <i>European Molecular Biology Organization</i>
engl.	englische Sprache
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
<i>et al.</i>	und andere (lat.: <i>et alii</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	und so weiter (lat.: <i>et cetera</i>)
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
ExPEC	extraintestinal pathogene <i>E. coli</i>
FAO	engl.: <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FASTA	textbasiertes Format in der Bioinformatik im 1-Buchstaben-Code zur Darstellung bzw. zum Speichern einer Nukleinsäure- oder Proteinsequenz
FASTQ	Kombination des FASTA-Formates (s. o.) mit Angabe des <i>quality score</i> , Format von NGS-Daten (Cock et al. 2010)
FNR	Transkriptionsfaktor (engl.: <i>fumarate and nitrate reductase regulation</i>)
FQ	Fluorchinolon (engl.: <i>fluoroquinolone</i>)
<i>fw</i>	engl.: <i>forward</i>
GAP-AMR	engl.: <i>Global Action Plan on Antimicrobial Resistance</i>
GARDP	engl.: <i>Global Antibiotic Research and Development Partnership</i>
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GFP	engl.: <i>green fluorescent protein</i>
ggf.	gegebenenfalls
GHS	engl.: <i>Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals</i>
GK	Glycerinkultur(nummer)
k.o.	engl.: <i>knockout</i>

GTE(-Puffer)	Glucose-Tris-EDTA(-Puffer)
h	Stunde(n)
H-NS	hitzestabiles DNA-bindendes Regulatorprotein (engl.: <i>heat-stable nucleoid-structuring</i> bzw. <i>histone-like nucleoid-structuring</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>)
IFA	Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung
inkl.	inklusiv(e)
Jg.	Jahrgang
kb	Kilobasen (1.000 bp)
KBE	Kolonie bildende Einheiten
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KMR-Stoffe	krebserzeugende, keimzellmutagene und reproduktionstoxische Stoffe
LAR	Luciferase Assay Reagent (Firma: Promega Corporation)
lat.	lateinische Sprache
LB	Komplexmedium nach G. Bertani, Salzgehalt nach Miller (engl.: <i>lysogeny broth</i>)
Lsg.	Lösung
M	molar (mol/L)
M9Glu	Minimalmedium mit M9-Salzen und Glucose als Kohlenstoffquelle
max.	maximal
Mb	Megabasen (1.000.000 bp)
MFS	Effluxpumpenfamilie (engl.: <i>major facilitator superfamily</i>)
MH	Nährmedium nach J. H. Mueller und J. Hinton v. a. zur Antibiotikaresistenzbestimmung
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute(n)
MIN	Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
MRE	multiresistente(r) Erreger
MRGN	multiresistente gramnegative Stäbchen
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NAC	engl.: <i>no amplification control</i>
Nac	Transkriptionsfaktor (engl.: <i>nitrogen assimilation control</i>)
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NBD	Nukleotid-Bindungsdomäne
NEB	New England BioLabs GmbH
NGS	Next-Generation Sequencing
NI	Standard-Nährmedium I (= NI-Medium)
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid
NTC	engl.: <i>no template control</i>
NTEC	nekrotoxische <i>E. coli</i>
OD _{xnm}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x Nanometern
OIE	Weltorganisation für Tiergesundheit (engl.: <i>World Organisation for Animal Health</i>) (früher: <i>Office international des épizooties</i>)

o. J.	ohne Jahresangabe
OMP(s)	Porine (engl.: <i>outer membrane protein(s)</i>)
Oqx	Olaquinox
ORF	offener Leserahmen (engl.: <i>open reading frame</i>)
ori	Replikationsursprung (engl.: <i>origin of replication</i>)
P	Promotor
p. a.	analysenrein (lat.: <i>pro analysi</i>)
PAM	engl.: <i>protospacer adjacent motif</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PgrR	Transkriptionsfaktor (engl.: <i>peptide glycan recycling regulator</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch (lat.: <i>European Pharmacopoeia</i>)
PMQR	Plasmid-vermittelte Chinolon-Resistenz (engl.: <i>plasmid-mediated quinolone resistance</i>)
PRP	Proteinfamilie mit bestimmter Pentapeptid-Struktur, z. B. Qnr-Proteine (engl.: <i>pentapeptide repeat protein</i>)
QRDR	engl.: <i>quinolone resistance-determining region</i>
Qsc	Maß zur Bestimmung des Superspiralisierungsgrades der DNA (engl.: <i>Quotient of supercoiling</i>)
REACH	Registrierung, Bewertung und Zulassung von Chemikalien (engl.: <i>Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals</i>)
RKI	Robert Koch-Institut
RLU	engl.: <i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
<i>RNase</i>	Ribonuklease
RND	Effluxpumpenfamilie (engl.: <i>resistance-nodulation-division</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur (20 °C) oder reverse Transkriptase
RT-qPCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
<i>rv</i>	engl.: <i>reverse</i>
σ	Sigmafaktor
S.	Seite
SBS	Sequenziermethode von Illumina® (engl.: <i>Sequencing by Synthesis</i>)
sec	Sekunde(n)
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl.: <i>single nucleotide polymorphism</i>)
s. o.	siehe oben
SOD(s)	Superoxid-Dismutase(n)
SOEing	Fusions-PCR (engl.: <i>splicing by overlap extension</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (engl.: <i>single stranded DNA</i>)
STM	engl.: <i>stress translation machinery</i>
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TCA cycle	Citratzyklus (engl.: <i>tricarboxylic acid cycle</i>)
Tet ^R	Tetracyclinresistenz

T _M	Schmelztemperatur (engl.: <i>melting temperature</i>)
Topo	Topoisomerase
TRGS	Technische Regeln für Gefahrstoffe
ts	temperatursensitiv
U	Einheit(en) (engl.: <i>unit(s)</i>)
u. a.	unter anderem
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
ÜNK	Übernachtkultur
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UV	ultraviolett
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
vs.	gegenüber (engl.: <i>versus</i>)
Wdh.	Wiederholung
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: <i>World Health Organization</i>)
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

Abkürzungen der DNA-Basen

A	Adenin
T	Thymin
C	Cytosin
G	Guanin
U	Uracil (RNA)

(Berg et al. 2018, S. 5, 129)

Abkürzungen der modifizierten DNA-Basen

(Oligonukleotide mit Phosphothioat verknüpften Nucleosiden)

F	A-Phosphothioat
O	C-Phosphothioat
E	G-Phosphothioat
Z	T-Phosphothioat

(Thermo Fisher Scientific o. J.)

Abkürzungen der Aminosäuren (3-Buchstaben-Code und 1-Buchstaben-Code)

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
Asparagin oder Asparaginsäure	Asx	B
Glutamin oder Glutaminsäure	Glx	Z

(Berg et al. 2018, S. 41)

Genbezeichnungen und Funktionen

<i>aac(6')-Ib-cr</i>	codiert für eine Aminoglykosid Acetyltransferase, die auch eine Ciprofloxacin-Resistenz („cr“) vermittelt
<i>aadA</i>	codiert für die Aminoglykosid-Adenyltransferase AAD(3'')(9)
<i>acnA</i>	codiert für die Aconitase A bzw. Hydratase im Citratzyklus
<i>acnB</i>	codiert für die Aconitase B bzw. Dehydratase im Citratzyklus
<i>acrA</i>	codiert für das Membranfusionsprotein AcrA der Effluxpumpe AcrAB-TolC
<i>acrB</i>	codiert für den Protonen-Antiporter AcrB der Effluxpumpe AcrAB-TolC
<i>acrR</i>	codiert für den lokalen Transkriptionsrepressor AcrR des <i>acrAB</i> -Operons
<i>ahpC</i>	codiert für die Peroxidase-Komponente der Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase
<i>ahpF</i>	codiert für die Reduktase-Komponente der Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase
<i>araC</i>	codiert für das L-Arabinose regulierende Protein AraC
<i>arcA</i>	codiert für den Response Regulator ArcA des Zweikomponentensystems ArcAB

<i>beta</i>	codiert für eine Rekombinase des λ -Red-Systems
<i>bla</i>	codiert für die Serin- β -Lactamase TEM
<i>capR</i>	= <i>lon</i> , s. u.
<i>cas9</i>	codiert für die Endonuklease <i>Cas9</i> aus <i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>cat</i>	codiert für die Chloramphenicol-Acetyltransferase
<i>ccpA</i>	codiert für einen Transkriptionsrepressor (<i>catabolite control protein A</i>), wird auch als <i>ycjW</i> bezeichnet
<i>clpA</i>	codiert für eine AAA+ ATPase und das Chaperon ClpA
<i>clpP</i>	codiert für eine Serin-Protease
<i>clpQ</i>	codiert für eine Protease mit einem Threonin im aktiven Zentrum, wird auch als <i>hslV</i> bezeichnet
<i>clpS</i>	codiert für einen Spezifitätsadapter des Proteasekomplexes ClpAP
<i>clpX</i>	codiert für eine AAA+ ATPase und das Chaperon ClpX
<i>clpY</i>	codiert für eine AAA+ ATPase, wird auch als <i>hslU</i> bezeichnet
<i>dnaQ</i>	codiert für die Untereinheit ϵ der DNA-Polymerase III
<i>dps</i>	codiert für das Protein Dps (<i>DNA-binding protein from starved cells</i>)
<i>exo</i>	codiert für eine 5' \rightarrow 3' Exonuklease des λ -Red-Systems
<i>fimC</i>	codiert für das periplasmatische Chaperon FimC, welches an der Pilusbiogenese beteiligt ist
<i>ftsH</i>	codiert für die Protease FtsH
<i>gam</i>	codiert für einen Inhibitor der RecBCD Nuklease; Bestandteil des λ -Red-Systems
<i>gfp</i>	codiert für das grün fluoreszierende Protein GFP
<i>gyrA</i>	codiert für die A-Untereinheit der Gyrase
<i>gyrB</i>	codiert für die B-Untereinheit der Gyrase
<i>hslU</i>	= <i>clpY</i> , s. o.
<i>hslV</i>	= <i>clpQ</i> , s. o.
<i>katE</i>	codiert für die Katalase bzw. Hydroperoxidase II
<i>katG</i>	codiert für die Katalase bzw. Hydroperoxidase I
<i>lon</i>	codiert für die Protease Lon, wird auch als <i>capR</i> bezeichnet
<i>luc</i>	codiert für die Luciferase des nordamerikanischen Leuchtkäfers <i>Photinus pyralis</i>
<i>marA</i>	codiert für den Transkriptionsaktivators MarA (<i>multiple antibiotic resistance</i>)
<i>marR</i>	codiert für den Repressor MarR des <i>mar</i> -Operons (<i>multiple antibiotic resistance</i>)
<i>mazE</i>	codiert für das Antitoxin MazE des Toxin-Antitoxin-Systems
<i>mazF</i>	codiert für das Toxin MazF des Toxin-Antitoxin-Systems
<i>micF</i>	codiert für die kleine regulatorische <i>antisense</i> RNA <i>micF</i>
<i>ompA</i>	codiert für das Porin A der äußeren Membran (<i>outer membrane protein</i>)
<i>ompC</i>	codiert für das Porin C der äußeren Membran (<i>outer membrane protein</i>)
<i>ompF</i>	codiert für das Porin F der äußeren Membran (<i>outer membrane protein</i>)
<i>oxyR</i>	codiert für den Transkriptionsfaktor OxyR (<i>oxidative stress regulator</i>)
<i>parC</i>	codiert für die A-Untereinheit der Topoisomerase IV
<i>qnr</i>	codiert für die Qnr-Schutzproteine (<i>quinolone resistance</i>) der Typ-II-Topoisomerasen
<i>recA</i>	codiert für das DNA-Rekombination/Reparatur Protein RecA
<i>repA</i>	codiert für das <i>copy-number</i> regulierende Protein RepA, Replikationinitiatorprotein
<i>repA101 (ts)</i>	codiert für eine temperatursensitive Variante des <i>copy-number</i> regulierenden Proteins RepA
<i>rob</i>	codiert für den Transkriptionsregulator Rob (<i>right origin-binding</i>)

<i>rplJ</i>	codiert für das ribosomale Protein L10 der 50S-Untereinheit
<i>rplL</i>	codiert für das ribosomale Protein-Dimer L7/L12 der 50S-Untereinheit
<i>rpoB</i>	codiert für die β -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase
<i>rpoC</i>	codiert für die β' -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase
<i>rpoS</i>	codiert für den Sigmafaktor σ^s der DNA-abhängigen RNA-Polymerase
<i>sdhC</i>	codiert für ein Membranprotein der Succinat-Dehydrogenase im Citratzyklus
<i>soxR</i>	codiert für den Transkriptionsfaktor bzw. Regulator SoxR (<i>superoxide response protein</i>)
<i>soxS</i>	codiert für den Transkriptionsfaktor bzw. Aktivator SoxS (<i>superoxide response protein</i>)
<i>tet</i>	codiert für eine Tetracyclin-Effluxpumpe
<i>tetR</i>	codiert für den Tetracyclin Repressor TetR
<i>tolC</i>	codiert für den Tunnel TolC der äußeren Membran der Effluxpumpe AcrAB-TolC
<i>topA</i>	codiert für die DNA Topoisomerase I
<i>upp</i>	codiert für die Uracil Phosphoribosyltransferase
<i>yafV</i>	codiert für eine ω -Amidase
<i>yccJ</i>	codiert für ein Protein bislang unbekannter Funktion; im Operon mit <i>wrbA</i> , welches für eine NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase codiert = <i>ccpA</i> , s. o.
<i>ycjW</i>	
<i>ycjX</i>	codiert für ein Protein bislang unbekannter Funktion, welches jedoch unter Stressbedingungen aktivierbar ist
<i>ylbE</i>	codiert für Protein bislang unbekannter Funktion
<i>yqiD</i>	codiert für Protein bislang unbekannter Funktion

IV. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 3.1–1: Resistenzsituation für <i>Escherichia coli</i> gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation in Europa (modifiziert nach: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) o. J.).....	10
ABBILDUNG 3.1–2: Resistenzsituation für <i>Escherichia coli</i> gegenüber Carbapenemen in Europa (modifiziert und tabellarisch ergänzt nach: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) o. J.).....	11
ABBILDUNG 3.1–3: Resistenzsituation für <i>Escherichia coli</i> gegenüber Fluorchinolonen in Europa (modifiziert nach: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) o. J.).....	13
ABBILDUNG 3.2–1: Struktur-Wirkungs-Beziehung der Fluorchinolone (modifiziert und ergänzt nach: Domagala 1994; Pham/Ziora/Blaskovich 2019).....	14
ABBILDUNG 3.2–2: Strukturformel des Fluorchinolons Ciprofloxacin.....	16
ABBILDUNG 3.3–1: Schematische Darstellung der Resistenzmechanismen gegenüber Fluorchinolonen bei <i>E. coli</i> (modifiziert und ergänzt nach: Aldred/Kerns/Osheroff 2014; Correia et al. 2017; Grkovic/Brown/Skurray 2002).....	20
ABBILDUNG 3.5–1: Schematische Darstellung der ATPase ClpA von <i>Escherichia coli</i> (modifiziert nach: Duran/Weaver/Lucius 2017; Guo et al. 2002b; Kress/Mutschler/ Weber-Ban 2009; Zolkiewski 2006).....	28
ABBILDUNG 3.6–1: Schematische Darstellung des Proteasekomplexes ClpAP von <i>Escherichia coli</i> (modifiziert nach: Duran/Weaver/Lucius 2017; Guo et al. 2002b; Kessel et al. 1995; Singh/Guo/Maurizi 1999).....	34
ABBILDUNG 5.1–1: Schematische Darstellung des Gens <i>clpA</i> von <i>E. coli</i> WT und der Mutante <i>E. coli</i> MIVa.....	39
ABBILDUNG 5.1–2: Vergleich der Fluoreszenzintensität der beiden getesteten Mutanten.....	40
ABBILDUNG 5.2–1: Schematische Darstellung des Inserts des Plasmids pHPAS10-01.2 (nach: Dougan et al. 2002; Gottesman/Clark/Maurizi 1990).....	42
ABBILDUNG 5.2–2: Schematische Darstellung des Inserts des Plasmids pHPAS10-01.3 (nach: Dougan et al. 2002; Gottesman/Clark/Maurizi 1990).....	43
ABBILDUNG 5.2–3: Schematische Darstellung des Inserts des Plasmids pHPAS10-01.4 (nach: Dougan et al. 2002; Gottesman/Clark/Maurizi 1990).....	44
ABBILDUNG 5.3–1: Auswahl der N ₂₀ -Sequenz für das Plasmid pKDsgRNA-HPclpA.....	45
ABBILDUNG 5.3–2: Konstruktion des Inserts für das Plasmid pKDsgRNA-HPclpA mittels SOEing.....	46
ABBILDUNG 5.3–3: Pyrogramm des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA.....	48
ABBILDUNG 5.3–4: Konstruktion des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-MIVa mittels <i>Round-the-horn</i> Klonierung.....	50
ABBILDUNG 5.3–5: Pyrogramm des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-MIVa.....	51

ABBILDUNG 5.3–6: Ausschnitt der Sequenzierungsergebnisse der direkten Mutagenese von <i>E. coli</i> MIVa.....	53
ABBILDUNG 5.3–7: Schematische Darstellung der Deletion der <i>clpA</i> -Mutante #21	54
ABBILDUNG 5.3–8: <i>In-vivo</i> Funktionstest von ClpA mit der <i>clpA</i> -Mutante #21.....	54
ABBILDUNG 5.3–9: Konstruktion des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-Mut14 mittels <i>Round-the-horn</i> Klonierung	56
ABBILDUNG 5.3–10: Pyrogramm des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-Mut14	57
ABBILDUNG 5.3–11: Ausschnitt der Sequenzierungsergebnisse der indirekten Mutagenese von der CRISPR-Mutante #14	59
ABBILDUNG 5.4–1: <i>In-vivo</i> Funktionstest von ClpA der komplementierten Stämme inklusive Kontrollen bzw. Referenzstämmen	62
ABBILDUNG 5.4–2: <i>In-vivo</i> Funktionstest von ClpA der CRISPR-Mutante <i>E. coli</i> WT ClpA-Ala569Argfs*12	63
ABBILDUNG 5.4–3: <i>In-vivo</i> Funktionstest von ClpA der CRISPR-Mutante <i>E. coli</i> MIII ClpA-Ala569Argfs*12	64
ABBILDUNG 5.4–4: Wachstumsverhalten der Stämme des Komplementationsexperimentes	65
ABBILDUNG 5.4–5: Wachstumsverhalten der CRISPR-Mutante <i>E. coli</i> WT ClpA-Ala569Argfs*12 in LB-Medium	66
ABBILDUNG 5.4–6: Wachstumsverhalten der CRISPR-Mutante <i>E. coli</i> WT ClpA-Ala569Argfs*12 in M9Glu-Medium	67
ABBILDUNG 5.4–7: Wachstumsverhalten der CRISPR-Mutante <i>E. coli</i> MIII ClpA-Ala569Argfs*12 im Vergleich zu den Referenzstämmen	68
ABBILDUNG 5.5–1: Wachstumsverhalten unter Zugabe des Antibiotikums Nalidixinsäure.....	72
ABBILDUNG 5.5–2: Wachstum nach acht Stunden mit bzw. ohne Nalidixinsäure	73
ABBILDUNG 5.5–3: Wachstumsverhalten unter Zugabe des Antibiotikums Rifampicin	74
ABBILDUNG 5.5–4: Wachstum nach acht Stunden mit bzw. ohne Rifampicin	75
ABBILDUNG 5.5–5: Wachstumsverhalten unter Zugabe des Antibiotikums Spectinomycin	76
ABBILDUNG 5.5–6: Wachstum nach acht Stunden mit bzw. ohne Spectinomycin	77
ABBILDUNG 5.6–1: Relative Genexpression des Operons mit den Genen <i>rplJ</i> , <i>rplL</i> , <i>rpoB</i> und <i>rpoC</i> bezogen auf <i>E. coli</i> WT	79
ABBILDUNG 5.6–2: Relative Genexpression des Operons mit den Genen <i>rplJ</i> , <i>rplL</i> , <i>rpoB</i> und <i>rpoC</i> der Mutante <i>E. coli</i> MIII bezogen auf <i>E. coli</i> MIII ClpA-Ala569Argfs*12.....	81
ABBILDUNG 5.6–3: Relative Genexpression des Operons mit den Genen <i>rplJ</i> , <i>rplL</i> , <i>rpoB</i> und <i>rpoC</i> der Mutante <i>E. coli</i> MIII bezogen auf <i>E. coli</i> MIVa.....	81
ABBILDUNG 5.6–4: Relative Genexpression der Gene <i>rplJ</i> und <i>upp</i> von <i>E. coli</i> WT bezogen auf <i>E. coli</i> WT ClpA-Ala569Argfs*12	83
ABBILDUNG 5.7–1: Relative Genexpression des Gens <i>clpX</i> bezogen auf <i>E. coli</i> WT.....	85
ABBILDUNG 5.7–2: Relative Genexpression des Gens <i>katE</i> bezogen auf <i>E. coli</i> WT (links) bzw. <i>E. coli</i> MIII (rechts).....	86
ABBILDUNG 5.7–3: Relative Genexpression der Katalasen bzw. Peroxidasen bezogen auf <i>E. coli</i> WT	87
ABBILDUNG 5.7–4: Relative Genexpression des Gens <i>ahpC</i> bezogen auf <i>E. coli</i> WT (links) bzw. <i>E. coli</i> MIII (rechts).....	89
ABBILDUNG 5.7–5: Relative Genexpression des Gens <i>dps</i> bezogen auf <i>E. coli</i> WT	90

ABBILDUNG 5.7–6: Relative Genexpression der Gene <i>acnB</i> und <i>sdhC</i> bezogen auf <i>E. coli</i> WT	91
ABBILDUNG 5.8–1: Superspiralisierungsgrad der Referenzstämme als Qsc-Wert absolut (links) und prozentual (rechts)	93
ABBILDUNG 5.8–2: Superspiralisierungsgrad des Stammes <i>E. coli</i> WT und der Mutante <i>E. coli</i> WT ClpA-Ala569Argfs*12	94
ABBILDUNG 5.8–3: Superspiralisierungsgrad des Stammes <i>E. coli</i> WT und der Mutanten <i>E. coli</i> MIII, MIVa und MIII ClpA-Ala569Argfs*12	95
ABBILDUNG 6.1–1: Sekundärstrukturen mit ihren zugehörigen ΔG -Werten (modifiziert nach: Zuker o. J.).....	109
ABBILDUNG 6.4–1: Schematische Darstellung der Wirkung des MazEF Antitoxin-Toxin Systems im Zusammenhang mit dem Proteasekomplex ClpAP und unter Einwirkung verschiedener Antibiotikaklassen (modifiziert und ergänzt nach: Engelberg-Kulka/Hazan/ Amitai 2005; Engelberg-Kulka et al. 2004; Illigmann et al. 2021; Lee/Lee 2016)	120
ABBILDUNG 8.1–1: Bandenmuster der verwendeten Größenmarker	152
ABBILDUNG 8.2–1: Plasmidkarte von pRepA(1-70)GFP für den <i>in-vivo</i> Funktionstest von ClpA	170
ABBILDUNG 8.2–2: Vergleich der Fluoreszenzintensität der Mutanten	171
ABBILDUNG 8.2–3: Schematischer Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion (nach: Thermo Fisher Scientific Inc. o. J.).	177
ABBILDUNG 8.2–4: Schematischer Ablauf einer Fusions-PCR mithilfe der SOEing-Technik (nach: Hilgarth/Lanigan 2020, Figure 1; Horton et al. 1989, Figure 1).	182
ABBILDUNG 8.2–5: Inverse PCR: <i>Round-the-horn</i> Klonierung (nach: Reisch/Prather 2017, Figure 31.8.5)	184
ABBILDUNG 8.2–6: Schematische Darstellung des Prinzips der sequenzspezifischen PCR: ARMS.....	186
ABBILDUNG 8.2–7: Schematische Darstellung der Ligation eines Inserts mit einem Vektor nach der jeweiligen Behandlung mit der Restriktionsendonuklease <i>HindIII</i>	197
ABBILDUNG 8.2–8: Plasmidkarte von pCas9-CR4	210
ABBILDUNG 8.2–9: Plasmidkarte von pKDsgRNA-ack.....	211
ABBILDUNG 8.2–10: Darstellung von crRNA und tracrRNA bzw. single chimeric RNA im Zusammenspiel mit <i>Cas9</i> (Jinek et al. 2012, Fig. 5. (A))	212
ABBILDUNG 8.2–11: Modell zur Veranschaulichung der Richtung der Replikation (nach: Bhagwat et al. 2016, Fig. S2).....	215
ABBILDUNG 8.2–12: Verknüpfung der Oligonukleotide (Merck KGaA - Sigma-Aldrich® o. J., Figure 1).....	217
ABBILDUNG 10.2–1: Sekundärstruktur 1 von Oligonukleotid clpA_1702delA_noSCAR mit einem ΔG von -9,91 kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.).....	261
ABBILDUNG 10.2–2: Sekundärstruktur 2 von Oligonukleotid clpA_1702delA_noSCAR mit einem ΔG von -9,41 kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.).....	262
ABBILDUNG 10.2–3: Sekundärstruktur 3 von Oligonukleotid clpA_1702delA_noSCAR mit einem ΔG von -9,27 kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.).....	262
ABBILDUNG 10.2–4: Sekundärstruktur 4 von Oligonukleotid clpA_1702delA_noSCAR mit einem ΔG von -9,18 kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.).....	263

ABBILDUNG 10.2–5: Sekundärstruktur 5 von Oligonukleotid <i>clpA_1702delA_noSCAR</i> mit einem ΔG von -8,91 kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.).....	263
ABBILDUNG 10.2–6: Sekundärstruktur 1 von Oligonukleotid <i>clpA_1702insA_noSCAR</i> mit einem ΔG von -9,28 kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.).....	264
ABBILDUNG 10.2–7: Sekundärstruktur 2 von Oligonukleotid <i>clpA_1702insA_noSCAR</i> mit einem ΔG von -8,78 kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.).....	264
ABBILDUNG 10.2–8: Sekundärstruktur 3 von Oligonukleotid <i>clpA_1702insA_noSCAR</i> mit einem ΔG von -8,64 kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.).....	265
ABBILDUNG 10.2–9: Sekundärstruktur 4 von Oligonukleotid <i>clpA_1702insA_noSCAR</i> mit einem ΔG von -8,55 kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.).....	265
ABBILDUNG 10.2–10: Sekundärstruktur 5 von Oligonukleotid <i>clpA_1702insA_noSCAR</i> mit einem ΔG von -8,44 kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.).....	266
ABBILDUNG 10.3–1: Ausschnitt der Sanger-Sequenzierung des Gens <i>clpA</i> (Bereich der Mutation).....	267
ABBILDUNG 10.3–2: Ausschnitt der Sanger-Sequenzierung des Gens <i>clpA</i> (Übergänge des Oligonukleotids).....	267
ABBILDUNG 10.3–3: Elektropherogramm der CRISPR <i>clpA</i> -Mutante #20.....	270
ABBILDUNG 10.3–4: Elektropherogramm der CRISPR <i>clpA</i> -Mutante #24.....	273
ABBILDUNG 10.3–5: Ausschnitt der Sanger-Sequenzierung des Gens <i>clpA</i>	275
ABBILDUNG 10.3–6: Ausschnitt der Sanger-Sequenzierung des Gens <i>clpA</i>	277
ABBILDUNG 10.3–7: Ausschnitt der Sanger-Sequenzierung des Gens <i>clpA</i>	277
ABBILDUNG 10.3–8: Elektropherogramm der CRISPR <i>clpA</i> -Mutante #50.....	280
ABBILDUNG 10.4–1: Ausschnitt der Genomsequenzierung von GK 4686 und GK 575 (<i>clpA</i>).....	282
ABBILDUNG 10.4–2: Ausschnitt der Genomsequenzierung von GK 4686 und GK 575 (<i>ylbE</i>).....	283
ABBILDUNG 10.4–3: Ausschnitt der Genomsequenzierung von GK 4686 und GK 575 (<i>upstream</i> von <i>yqiD</i>).....	284
ABBILDUNG 10.4–4: Ausschnitt der Genomsequenzierung von GK 4686 und GK 575 (<i>upstream</i> von <i>yafV</i>).....	285
ABBILDUNG 10.4–5: Ausschnitt der Genomsequenzierung von GK 4686 und GK 575 (<i>upstream</i> von <i>ycjX</i> bzw. <i>ccpA</i>).....	285
ABBILDUNG 10.4–6: Elektropherogramm <i>E. coli</i> MIVa <i>upstream</i> des Gens <i>ccpA</i> (5'-Primer).....	288
ABBILDUNG 10.4–7: Ausschnitt des Elektropherogramms <i>E. coli</i> MIVa <i>upstream</i> des Gens <i>ccpA</i> (5'-Primer).....	288
ABBILDUNG 10.4–8: Elektropherogramm <i>E. coli</i> MIVa <i>upstream</i> des Gens <i>ccpA</i> (3'-Primer).....	290
ABBILDUNG 10.4–9: Alignment der <i>E. coli</i> MIVa Sequenzierungsdaten gegen den <i>E. coli</i> WT (GK 571).....	291
ABBILDUNG 10.5–1: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der <i>clpA</i> -Mutation.....	292
ABBILDUNG 10.5–2: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der <i>clpA</i> -Mutation.....	293
ABBILDUNG 10.5–3: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der <i>clpA</i> -Mutation.....	294
ABBILDUNG 10.5–4: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der <i>clpA</i> -Mutation.....	295
ABBILDUNG 10.5–5: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der <i>clpA</i> -Mutation.....	297
ABBILDUNG 10.5–6: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der <i>clpA</i> -Mutation.....	299
ABBILDUNG 10.5–7: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der <i>clpA</i> -Mutation.....	301

V. Tabellenverzeichnis

TABELLE 5.4–1: Kanamycin MHK-Werte	69
TABELLE 5.4–2: MHK-Werte der verschiedenen Antibiotika	70
TABELLE 5.6–1: Relative Genexpression des Operons mit den Genen <i>rplJ</i> , <i>rplL</i> , <i>rpoB</i> und <i>rpoC</i> bezogen auf <i>E. coli</i> WT	80
TABELLE 5.6–2: Ergebnisse des Zweistichproben t-Tests als p-Werte als Maß der statistischen Signifikanz	82
TABELLE 5.7–1: Relative Genexpression der Katalasen bzw. Peroxidasen bezogen auf <i>E. coli</i> WT	88
TABELLE 6.1–1: GC-Gehalt der N ₂₀ -Sequenzen der verwendeten pKDsgRNA-Plasmide	105
TABELLE 6.1–2: Sekundärstrukturanalyse der langen Oligonukleotide	107
TABELLE 8.1–1: Verwendete Bakterienstämme bzw. Mutanten	143
TABELLE 8.1–2: Verwendete Plasmide	148
TABELLE 8.1–3: Verwendete Oligonukleotide	149
TABELLE 8.1–4: Verwendete Größenmarker in der Gelelektrophorese	152
TABELLE 8.1–5: Verwendete Enzyme mit zugehörigem Puffer	152
TABELLE 8.1–6: Verwendete Kits	154
TABELLE 8.1–7: Verwendete Chemikalien	154
TABELLE 8.1–8: Verwendete Antibiotika	156
TABELLE 8.1–9: Verwendete Puffer und Lösungen	157
TABELLE 8.1–10: Verwendete Nährmedien und -agar	158
TABELLE 8.1–11: Verwendete Geräte und sonstige Materialien	158
TABELLE 8.1–12: Verwendete Software	163
TABELLE 8.2–1: Standard PCR-Ansatz mit der DreamTaq™ DNA Polymerase	179
TABELLE 8.2–2: Standard PCR-Programm mit der DreamTaq™ DNA Polymerase	179
TABELLE 8.2–3: Standard PCR-Ansatz mit der Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase	179
TABELLE 8.2–4: Standard PCR-Programm mit der Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase	180
TABELLE 8.2–5: Standard PCR-Ansatz mit der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	180
TABELLE 8.2–6: Standard PCR-Programm mit der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	180
TABELLE 8.2–7: Übersicht zur Auswahl der beabsichtigten Veränderung des vorletzten Nukleotids des ARMS-Primers (nach: Little 1995, Table 9.8.1)	186
TABELLE 8.2–8: Wahl des beabsichtigt veränderten Nukleotids an vorletzter Position des ARMS-Primers bei unterschiedlich starker Destabilisierung (nach: Little 1995, Table 9.8.3)	187
TABELLE 8.2–9: PCR-Ansatz der ARMS-PCR zur Detektion der CRISPR-Mutante mit der <i>clpA</i> -Mutation aus <i>E. coli</i> MIVa	187

TABELLE 8.2–10: PCR-Programm der ARMS-PCR zur Detektion der CRISPR-Mutante mit der <i>clpA</i> -Mutation aus <i>E. coli</i> MIVa.....	188
TABELLE 8.2–11: PCR-Ansatz der ARMS-PCR zur Detektion der CRISPR-Mutante mit der <i>clpA</i> -Wildtyp-Variante ausgehend von <i>E. coli</i> MIVa	188
TABELLE 8.2–12: PCR-Programm der ARMS-PCR zur Detektion der CRISPR-Mutante mit der <i>clpA</i> -Wildtyp-Variante ausgehend von <i>E. coli</i> MIVa	188
TABELLE 8.2–13: PCR-Ansatz der ARMS-PCR zur Detektion der CRISPR-Mutante mit der <i>clpA</i> -Wildtyp-Variante ausgehend von der CRISPR-Mutante #14 aus der indirekten Mutagenese	188
TABELLE 8.2–14: PCR-Programm der ARMS-PCR zur Detektion der CRISPR-Mutante mit der <i>clpA</i> -Wildtyp-Variante ausgehend von der CRISPR-Mutante #14 aus der indirekten Mutagenese	189
TABELLE 8.2–15: Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Nukleinsäuren	194
TABELLE 8.2–16: Standard-Ansatz für das Cycle Sequencing	202
TABELLE 8.2–17: Temperatur-Programm für PCR-Produkte	203
TABELLE 8.2–18: Temperatur-Programm für Plasmid-DNA.....	203
TABELLE 8.2–19: Wahl der Sequenz des Oligonukleotids je nach Lage und Orientierung des Zielgens im Genom von <i>E. coli</i> WT (GK 571) um dem <i>lagging strand</i> zu korrespondieren.....	215
TABELLE 8.2–20: Standard-Ansatz cDNA-Synthese	225
TABELLE 8.2–21: Standard-Ansatz der Kontrolle (NAC).....	225
TABELLE 8.2–22: Standard-Programm für cDNA-Synthese und NAC.....	225
TABELLE 8.2–23: Standard-Ansatz der quantitativen <i>real-time</i> PCR	227
TABELLE 8.2–24: Standard-Programm der quantitativen <i>real-time</i> PCR	227
TABELLE 10.1–1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten KMR-Stoffe der Kategorien I und II gemäß der CLP-Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (nach: Institut für Arbeitsschutz (IFA) der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV) 2022)	256
TABELLE 10.1–2: Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS mit Gefahrensymbol, H- und P-Sätzen	257
TABELLE 10.4–1: <i>Track List Variants</i> vs. GK 571 <i>known</i> vs. GK 575 <i>known</i>	281
TABELLE 10.4–2: <i>Track List Variants</i> vs. GK 571 <i>known</i> vs. GK 4686 <i>known</i>	282
TABELLE 10.6–1: Ct-Werte der quantitativen <i>real-time</i> PCR (RT-qPCR) (Rohdaten)	302
TABELLE 10.6–2: Ct-Werte der quantitativen <i>real-time</i> PCR (RT-qPCR) (Rohdaten)	304
TABELLE 10.6–3: Ct-Werte der quantitativen <i>real-time</i> PCR (RT-qPCR) (Rohdaten)	304
TABELLE 10.7–1: Rohdaten der Lumineszenz-Messung der Referenzstämme.....	307
TABELLE 10.7–2: Rohdaten der Lumineszenz-Messung der CRISPR-Mutante <i>E. coli</i> WT ClpA-Ala569Argfs*12	308
TABELLE 10.7–3: Rohdaten der Lumineszenz-Messung der CRISPR-Mutante <i>E. coli</i> MIII ClpA-Ala569Argfs*12	308

VI. Formelverzeichnis

FORMEL 8.2–1: Bestimmung der Lebendkeimzahl (KBE/mL)	166
FORMEL 8.2–2: Bestimmung des Superspiralisierungsgrades über den Qsc (Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013) ..	171
FORMEL 8.2–3: Luciferase vermittelte Biolumineszenz-Reaktion (Promega Corporation 2015b)	172
FORMEL 8.2–4: Berechnung der Schmelztemperatur T_M eines Standardprimers	179
FORMEL 8.2–5: Modifizierte Version des Lambert-Beer'schen Gesetzes der NanoDrop™ Software zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	193
FORMEL 8.2–6: Berechnung des ΔCt	228
FORMEL 8.2–7: Berechnung des $\Delta\Delta Ct$	228
FORMEL 8.2–8: Berechnung der relativen Genexpression	228

1 Zusammenfassung

Antibiotikaresistenz stellt bereits seit Beginn der antibakteriellen Therapie ein schwerwiegendes Problem dar. So ermittelte eine aktuelle Studie zur Weltgesundheit, dass im Jahr 2019 1,27 Millionen Todesfälle direkt auf antimikrobielle Resistenzen zurückzuführen waren (Murray et al. 2022). Für das Jahr 2050 wurde ein Anstieg auf jährlich zehn Millionen Todesfälle prognostiziert (O'Neill 2016). Angesichts der Jahrmillionen langen Coevolution von Antibiotikaproduzenten und antibiotikaempfindlichen Bakterien in der Umwelt, ist die rasante Anpassung letzterer durch die Resistenzentwicklung nachvollziehbar. Daher versprach der Ansatz, synthetische Antibiotika wie Fluorchinolone zu entwickeln, zumindest eine deutliche Verlangsamung der Resistenzentwicklung zu erreichen. Weiterhin war auch nicht zu erwarten, dass Enzyme für eine Inaktivierung der Fluorchinolone in der Natur vorhanden sind. Auch galt übertragbare Resistenz als sehr unwahrscheinlich. So blieb in den ersten zehn Jahren klinischer Anwendung der Anteil klinisch fluorchinolonresistenter Isolate von z.B. *Escherichia coli* unter 5 %, stieg dann aber deutlich (> 30 %) in den Folgejahren an. Dies bestätigt die langjährigen Erfahrungen, wonach resistente Bakterien gegen chemisch-modifizierte Antibiotika einer bereits genutzten Klasse zeitnah, jedoch gegen neueingeführte Antibiotika einer bislang nicht verwendeten Klasse erst mit einer zeitlichen Verzögerung nach der Markteinführung zunehmen (Heisig 2019). Somit stellt – neben der Kombination zweier Wirkstoffklassen als „dual-target“ Strategie – ein „top-to-bottom“ Ansatz mit der Identifizierung neuer Zielstrukturen für die Entwicklung neuartiger Antibiotika zukünftig eine vielversprechende biologisch-genetische Alternative zur bisher vordringlich eingesetzten chemisch-synthetischen Strategie einer konsekutiven Wirkstoff-Modifizierung dar.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit bestand daher darin, eine im Rahmen eines *in-vitro* Selektionsexperiments (Heisig/Tschorny 1994), ausgehend von einem fluorchinolonempfindlichen Humanisolat von *Escherichia coli* (WT), identifizierte neuartige, bislang nicht im Zusammenhang mit Antibiotikaresistenz stehende potenzielle Zielstruktur zu charakterisieren und deren Rolle bei der Resistenzentwicklung zu analysieren. Hierfür wurden die Genome konsekutiver Mehrschrittmutanten von WT zunächst sequenziert und die in den jeweiligen Selektionsschritten erworbenen Mutationen identifiziert (Heisig, A., Heisig, P., Manuskript in Vorbereitung). In dieser Arbeit wurde eine dieser Mutationen im Gen *clpA* mittels CRISPR/Cas9-Technologie dazu einzeln in dem Isolat WT und in verschiedenen Mehrschrittselektanden zum einen zur phänotypischen Charakterisierung eingeführt. Durch genotypische Analysen der *clpA*-Mutation wurde *in frame* ein vorzeitiges Stop-Codon ermittelt, woraus ein um 179 Aminosäuren verkürztes Protein ClpA resultierte. Zur Analyse der Funktionalität verschiedener Varianten dieser ATPase wurde ein *in-vivo* Funktionstest von ClpA (Hoskins/Kim/Wickner 2000) in verschiedenen Mutanten eingesetzt. Erstmalig konnte damit in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass es sich bei der *clpA*-Mutation der Selektionsmutante *E. coli* MIVa um eine Knockout-

Mutation handelt. Mit diesem Funktionstest konnte auch gezeigt werden, dass sich die k.o.-Mutation durch eine zweite funktionsfähige *clpA*-Genkopie komplementieren lässt. Außerdem konnte damit die Funktionalität von ClpA von zwei verschiedenen, zuvor mit dem CRISPR/Cas9-System generierten, genomischen *clpA*-Mutanten (*E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12) überprüft werden. Beide Experimente zeigten unter normalen Bedingungen keinen Einfluss der *clpA*-Mutation auf die Wachstumsgeschwindigkeit. Die MHK des Aminoglykosid-Antibiotikums Kanamycin verringerte sich nur geringfügig in den *clpA*-Mutanten und durch die Komplementation mit einem plasmidcodierten Wildtypgen *clpA* wurde die Antibiotikaresistenz teilweise wiedererlangt. Dieser leichte Effekt auf die Antibiotikaresistenz war eindeutig, jedoch nicht fluorochinolonspezifisch.

Durch die Induktion des MazEF Antitoxin-Toxin Systems von *E. coli* durch Antibiotika drei verschiedener Klassen, konnte die jeweils signifikant höhere Überlebensrate bei *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 im Vergleich zum WT durch die Anwendung des oCelloScope™ ermittelt werden (8 h nach Antibiotikaexposition). Außerdem zeigte die quantitative *real-time* PCR eine verringerte Genexpression der Gene *rplJ* und *rplL* bei den *clpA*-Mutanten verglichen mit Stämmen mit *clpA*-Wildtypgen. Der Einfluss dieser Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System konnte also gezeigt werden (Abhängigkeit zwischen *rplJ*-Expression und MazF Anwesenheit (Culviner/Laub 2018), verminderter MazE-Abbau durch ClpAP und damit gesteigerte Neutralisation der Endoribonuklease MazF in der Mutante).

Eine weitere quantitative *real-time* PCR bestimmte eine erhöhte Expression des Gens *katE* bei *clpA*-Mutanten (*E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa bezogen auf isogene Stämme mit *clpA*-Wildtypgen). Dies deutet darauf hin, dass durch verstärktes Abfangen hoher H₂O₂-Mengen (Aufregulation der Katalase) das Bakterium unter ROS-Einfluss seinem vermeintlichen Nachteil durch die *clpA*-Mutation (verminderter Dps-Abbau, geringere Menge an freiem Eisen, verminderte Regeneration oxidierter Eisen-Schwefel-Cluster) (Sen/Zhou/Imlay 2020) entgegenwirken kann. Dies und die Tatsache, dass diese *clpA*-Mutation unter Fluorchinolon-Exposition selektiert wurde (Heisig/Tschorny 1994), unterstützen die Hypothese von Kohanski *et al.*, die einen globalen Zusammenhang zwischen der bakteriziden Wirkung von Antibiotika und der Induktion von ROS postulieren (Kohanski *et al.* 2007). Sowohl in Gegenwart der Antibiotika als auch unter Anwesenheit von ROS sorgt diese *clpA*-Mutation für einen Überlebensvorteil.

Zuletzt wurde anhand vorliegender Daten ein verminderter negativer Superspiralisierungsgrad der DNA der *clpA*-Mutanten (*E. coli* MIVa und *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12) bezogen auf ihre isogenen Referenzstämme ermittelt. Auffallend zeigte die DNA der Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 dagegen eine signifikante Erhöhung des negativen Superspiralisierungsgrades der DNA. Ausblickend soll in weiteren Experimenten basierend auf der Analyse der aktuell erfolgten Genomsequenzierung dieser Mutanten, bei der weitere zusätzliche Mutationen identifiziert werden konnten, die Rolle die-

ser im Entwicklungsprozess einer veränderten Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und/oder ROS untersucht werden.

2 Abstract

Antibiotic resistance is already a serious problem since the beginnings of antibiotic therapy. A recent study on global health showed that in 2019 1.27 million deaths were directly attributable to resistance (Murray et al. 2022). In 2050 the global forecast will be 10 million deaths per year (O'Neill 2016). Due to coevolution of antibiotic producers and antibiotic-susceptible bacteria in environment over millions of years, the rapid adaptation through resistance of this bacteria is plausible. First the synthetic antibiotics, for example fluoroquinolones, conveyed hopes for a significant deceleration of resistance development. Further it was not expected that there are naturally occurring enzymes that inactivate the agents. Also, there were no transferable resistance genes known. So, in the first ten years of clinical use only under 5 % of the clinical isolates of *Escherichia coli* have been quinolone resistant, but then in the following years it increased significantly (> 30 %). This confirmed long-term experiences that resistant bacteria increase contemporary towards chemically modified antibiotics of a known class, whereby increase of pathogens resistant towards antibiotics belonging to novel classes occurs with a time delay after launch (Heisig 2019). In addition to the combination of drugs of two antibiotic classes as a "dual-target" strategy, a "top-to-bottom" strategy with the identification of new target structures for the development of novel antibiotics represents a promising biological-genetic alternative, not to limit to the chemical-synthetic strategy of consecutive drug modification.

Thus, the focus of this thesis was to characterize a novel potential target structure and to analyze its impact on resistance development. This structure was identified within an experiment, in which mutants were selected from a quinolone-susceptible *Escherichia coli* human isolate (WT) in vitro (Heisig/Tschorny 1994). The sequencing of the genome of the consecutive mutants of WT enabled to identify new acquired mutations (Heisig, A., Heisig, P., manuscript in preparation). In this thesis one of these mutations in the gene *clpA* was used to perform a genome editing by CRISPR/Cas9 in the genome of WT alone and in the genome of multistep selectands firstly for phenotypic analysis. By genotypic analysis a premature stop codon due to frameshift resulting in a protein ClpA reduced by 179 amino acids was determined. To analyze the functionality of different variants of the ATPase ClpA an in vivo functional assay of ClpA (Hoskins/Kim/Wickner 2000) was used with the different mutant strains. For the first time in this work, it was verified with this that the *clpA* mutation of *E. coli* MIVa is a knockout mutation. Also, the assay showed that the k.o. mutation was complementable

with a second functional *clpA* gene copy. In addition, this assay verified the functionality of the protein ClpA within two genomic mutants (*E. coli* WT ClpAAla569Argfs*12 and *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12), which were generated with the CRISPR/Cas9 system before. Both experiments showed no impact of the *clpA* mutation on the growth rate under normal conditions. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the aminoglycoside antibiotic kanamycin decreased only marginally in the *clpA* mutants and by complementation with the plasmid-encoded *clpA*⁺ gene the antibiotic resistance of the resulting strains partly regained again. This small effect on antibiotic resistance was significant but not specific to quinolones.

Induction of the MazF-MazE toxin-antitoxin system of *E. coli* using antibiotics of three different classes a significantly higher survival rate of *E. coli* WT ClpAAla569Argfs*12 respectively compared with the wild-type was detectable using the oCelloScope™ assay (8 h after antibiotic exposure). Furthermore, a quantitative real-time PCR showed for genes *rplJ* and *rplL* of *clpA* mutants a decreased gene expression compared to isogenic *clpA*⁺ parents. Thus, the impact of this mutation on the MazF-MazE toxin-antitoxin system could be demonstrated (dependence between the expression of *rplJ* and the presence of MazF (Culviner/Laub 2018), reduced degradation of MazE by ClpAP and, thereby, enhanced neutralisation of the endoribonuclease MazF in the mutant).

A further quantitative real-time PCR determined an increased expression of the gene *katE* in *clpA* mutants (*E. coli* WT ClpAAla569Argfs*12 and *E. coli* MIVa compared with their isogenic *clpA*⁺ strains). This suggests that the bacteria under the influence of ROS counteract the supposed disadvantage that arises due to the *clpA* mutation (reduced proteolysis of Dps, diminished amount of free iron, reduced reactivation of the oxidized iron-sulfur clusters) (Sen/Zhou/Imlay 2020) by the increased scavenge of high amounts of H₂O₂ (upregulation of the catalase). This and the fact that the *clpA* mutation was selected during the exposure to fluoroquinolones (Heisig/Tschorny 1994) support the hypothesis of Kohanski *et al.* who postulated a global connection between bactericidal effects of antibiotics and the induction of ROS (Kohanski *et al.* 2007). In the presence of antibiotics as well as in the presence of ROS this *clpA* mutation provides an advantage in survival.

Finally, by the data presented it was shown that the degree of negative DNA supercoiling of the *clpA* mutants (*E. coli* MIVa and *E. coli* WT ClpAAla569Argfs*12) is reduced compared with their isogenic *clpA*⁺ reference strains. In contrast, the DNA of the mutant *E. coli* MIII ClpAAla569Argfs*12 presented a significant increase in the global degree of DNA supercoiling. Based on the analysis of a recent whole genome sequencing of these mutants, in which further additional mutations could be identified, subsequent experiments are to be performed to investigate the role of these mutations in the process of development of altered susceptibility to antibiotics and/or ROS.

3 Einleitung und aktueller wissenschaftlicher Kenntnisstand

Antibiotika zählen seit vielen Jahren zu den verordnungstärksten Wirkstoffgruppen der ambulanten Arzneimittelverordnungen gesetzlich Krankenversicherter. Das Verordnungsvolumen wird dabei in definierten Tagesdosen erfasst, sogenannten DDD (*defined daily doses*). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es sich in der Regel um akute Infektionen mit kurzer Behandlungsdauer handelt, bei denen die Antibiotika eingesetzt werden. Somit ist generell von einem geringeren Verordnungsvolumen auszugehen als bei Arzneimittelgruppen gegen chronische Krankheiten, wie beispielsweise Herzkreislauf-Erkrankungen bzw. Diabetes mellitus. Das Verordnungsvolumen der Antibiotika betrug in Deutschland im Jahre 2014 448 Millionen DDD in der Humanmedizin. Dies entsprach 45 Millionen Verordnungen an Antibiotika. Erhoben wurden diese Daten anhand des GKV (Verband der Gesetzlichen Krankenversicherung) Arzneimittelindex, einem Projekt des Wissenschaftlichen Instituts der AOK (WidO), und beziehen sich auf die 86 % der Deutschen, die im Jahr 2014 gesetzlich krankenversichert waren. In die Klasse der Chinolone konnten 34,5 Millionen DDD zugeordnet werden (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit/Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2016, S. 9). Eine Besonderheit bei den Antibiotikaverordnungen zeigte sich im Jahr 2020. Dort wurde ein Rückgang im Vergleich zu den Vorjahren verzeichnet. Durchschnittlich um 27 % lagen die verordneten Packungsmengen bei den Antibiotika unter den in den Vorjahren üblichen Mengen. Hervorzuheben sind besonders die drei Monate April, Mai und Dezember 2020. Dort wurden ca. 40 % weniger Packungsmengen verordnet als zuvor üblich. Jedoch ist dies nicht als positiver Erfolg des bedachteren Einsatzes der Antibiotika zu verzeichnen, sondern als Ausnahme zu betrachten. Es handelte sich bei diesen besonderen Monaten um die Zeit des Lockdowns während der COVID-19-Pandemie, sodass nicht von normalen Umständen ausgegangen werden konnte. Es ist anzunehmen, dass durch die Kontaktbeschränkungen nicht nur die Übertragung des Coronavirus, sondern auch von anderen Erregern, beispielsweise Bakterien, minimiert wurde. Demzufolge war es seltener nötig diese bakteriellen Infektionen mit Antibiotika zu behandeln. Des Weiteren wurde ein Anteil der bakteriellen Infektionen erst gar nicht behandelt, weil die Erkrankten den Besuch einer Arztpraxis oder Apotheke in der Zeit des Lockdowns mieden, um die COVID-19 Ansteckungsgefahr zu reduzieren (Telschow et al. 2021, S. 268-269).

Generell sind Antibiotika gut verträgliche Arzneimittel, da sie ausschließlich an bakteriellen Zellbestandteilen angreifen und somit keine Wirkung auf menschliche körpereigene Strukturen besitzen. Dennoch gibt es wenige unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW), die im Zusammenhang mit einer Antibiotikatherapie stehen. Dazu zählen beispielsweise die allergische Reaktion auf den Wirkstoff selbst. Dabei sind vor allem die β -Lactam-Antibiotika dafür bekannt solche immunologisch vermittelten Arzneimittelüberempfindlichkeitsreaktionen hervorzurufen (Wurpts et al. 2019). In einer

spanischen Studie zeigten 7 % der Patienten eine solche bestätigte allergische Reaktion (Doña et al. 2012). Eine weitere typische UAW wird durch die Verdrängung der Normalflora im Darm oder auch im Intimbereich ausgelöst. Dies ist vor allem unter dem Einsatz von Breitspektrumantibiotika zu verzeichnen. Das veränderte Mikrobiom kann in der Folge der Auslöser für Magen-Darm-Beschwerden, wie Durchfall oder auch Pilz-Infektionen im Intimbereich sein. Dennoch werden die Antibiotika generell als sichere Arzneimittel eingestuft (Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (ÄZQ) 2020a). Sie sind bei einem passenden Einsatz sogar in der Lage Leben zu retten, beispielsweise indem sie verhindern, dass sich die Erreger einer bakteriellen Infektion wie einer Lungenentzündung oder einer Harnwegsentzündung über den Blutkreislauf im ganzen Körper verbreiten und zu einer lebensbedrohlichen Sepsis mit Organversagen führen (Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (ÄZQ) 2020a).

Ein unsachgemäßer bzw. übermäßiger Gebrauch der Antibiotika birgt jedoch eine große Gefahr. So kann eine zu niedrige Dosierung oder ein vorzeitiger Therapieabbruch die Entstehung von Resistenzen fördern. Auch eine falsche Anwendung, z. B. bei einer Infektion hervorgerufen durch Viren, begünstigt diese Entwicklung bei Zellen der bakteriellen Normalflora. Allgemein gilt, dass das Risiko für die Entwicklung und Ausbreitung von resistenten Bakterien mit der häufigen Verwendung steigt. Vermeintlich harmlosere Folgen ergeben sich daraus, dass die Infektionen länger andauern und die Wahrscheinlichkeit für stationäre Aufenthalte steigt. Problematischer wird es, wenn die bakteriellen Infektionen schwieriger zu behandeln sind, z. B., wenn die Erreger nicht auf das Antibiotikum ansprechen. So können diese ursprünglich gut behandelbaren Infektionen dann lebensbedrohlich werden. Dramatisch wird es in der Folge, wenn sich multiresistente Erreger (MRE) entwickeln, die bereits gegen verschiedene Antibiotikaklassen widerstandsfähig sind (Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (ÄZQ) 2020b). Bei den nosokomial erworbenen Infektionen werden die wichtigsten multiresistenten Erreger unter dem Akronym „ESKAPE“ zusammengefasst (Rice 2008):

Enterococcus faecium

Staphylococcus aureus

Klebsiella pneumoniae

Acinetobacter baumannii

Pseudomonas aeruginosa

Enterobacter Spezies

Bei den ersten beiden Spezies handelt es sich um grampositive Bakterien. Die übrigen vier sind gramnegative Bakterien. Mehrfachresistente Vertreter dieser gramnegativen Bakterien werden noch näher klassifiziert im Hinblick auf ihre Empfindlichkeit für Acylaminopenicilline, Cephalosporine der 3. und 4. Generation, Carbapeneme und Fluorchinolone. Je nachdem ob eine Resistenz gegen drei bzw. alle vier dieser Klassen vorliegt, wird ein Erreger entsprechend in die Kategorie 3-MRGN bzw. 4-

MRGN, dreifach multiresistente bzw. vierfach multiresistente gramnegative Stäbchen, eingeteilt. Beim Vorliegen von 3-MRGN kann oftmals noch mit Carbapenemen behandelt werden (Robert Koch-Institut (RKI) 2012; Robert Koch-Institut (RKI) 2019c).

Die Zunahme multiresistenter Erreger stellt eine besondere Last für das Gesundheitssystem dar. In einer Studie wurde dazu der Zeitraum von 2007 bis 2015 betrachtet. In diesem Zeitraum hat sich in Europa die Anzahl an Infektionen, die durch antibiotikaresistente Erreger ausgelöst wurden, mehr als verdoppelt. Auch bei der Anzahl der Todesfälle wurde ein starker Anstieg verzeichnet. So vervierfachte sich beispielsweise die Zahl der Todesfälle bei Infektionen durch *Escherichia coli* (*E. coli*) (vgl. Kapitel 3.1), die eine Resistenz gegen Cephalosporine der 3. Generation aufwies. Insgesamt wurde in der Studie ermittelt, dass es in der Europäischen Union (EU) jährlich etwa 670 000 Infizierte mit antibiotikaresistenten Erregern gibt und ca. 33 000 Menschen daran sterben. In Deutschland sind es allein knapp 55 000 Infizierte und fast 2 400 Todesfälle pro Jahr (Cassini et al. 2019). Eine weitere Studie nimmt Bezug auf die weltweite Situation. Im Jahr 2019 wurden global gesehen 4,95 Millionen Todesfälle mit Infektionen mit resistenten Bakterien assoziiert. Davon waren 1,27 Millionen Todesfälle direkt auf antimikrobielle Resistenzen zurückzuführen (Murray et al. 2022). Prognostiziert wird bei einem ähnlichen Voranschreiten der Resistenzsituation, ohne dass weitere Maßnahmen ergriffen werden, dass bis zum Jahre 2050 die Zahl der Todesfälle durch Resistenzen weltweit auf jährlich zehn Millionen ansteigen könnte. Umgerechnet würde dann alle drei Sekunden ein Mensch daran sterben (O'Neill 2016). Dies stellt einen dringenden Appell dar, möglichst schnell Maßnahmen zu ergreifen, um ein solches Ausmaß zu unterbinden. Eine bekannte Problematik besteht darin, dass es sich bei den Infektionen, die mit Antibiotika behandelt werden, in der Regel um akute Erkrankungen handelt. Damit ist im Vergleich zu chronischen Erkrankungen, die beispielsweise das Herz-Kreislauf-System oder den Stoffwechsel wie bei Diabetes mellitus betreffen, nur eine kurze Behandlungsdauer zu erwarten (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit/Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2016). Aus wirtschaftlicher Perspektive entsteht daher kein Anreiz für die Industrie sich mit der Forschung neuer antibiotischer Wirkstoffe zu beschäftigen. Die Entwicklung von Arzneimitteln zur Behandlung von chronischen Erkrankungen ohne Resistenzentwicklung sind entsprechend deutlich stärker gewinnversprechend (Telschow et al. 2021). Auch die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) berichtet von der unzureichenden Entwicklung neuer Antibiotika und warnt davor, dass damit die Herausforderungen durch die Zunahme in der Entwicklung und Verbreitung antimikrobieller Resistenzen in der Zukunft nicht ausreichend bewältigt werden können (World Health Organization 2021). Durch diese Prognosen wurde erreicht, dass das Thema Antibiotikaresistenz auch auf politischer Ebene eine erhöhte Aufmerksamkeit erlangt hat. Es wurden dadurch verschiedene globale und auch nationale Strategien zur Bekämpfung der Antibiotikaresistenzen entwickelt. Die Grundlage stellt der „*Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*“ (GAP-

AMR) dar (World Health Organization 2015). Dieser Plan bildet ein Gemeinschaftsprojekt der Weltgesundheitsorganisation (WHO), der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO) und der Weltorganisation für Tiergesundheit (OIE) (Abu Sin et al. 2018) und ist somit ein Teil des One-Health-Konzeptes, bei dem betont wird, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt besteht (Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung o. J.; Robert Koch-Institut (RKI) 2019b). Die Mitgliedsstaaten stimmten im Jahr 2015 dem globalen Plan zu und garantierten, daraus nationale Pläne zu entwickeln und umzusetzen (Abu Sin et al. 2018). In Deutschland wurde bereits im selben Jahr ein schon 2008 angefertigter eigener nationaler Plan dementsprechend überarbeitet und veröffentlicht: DART 2020 (Bundesministerium für Gesundheit/Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft/Bundesministerium für Bildung und Forschung 2015). Unter DART verbirgt sich das Konzept der „Deutschen Antibiotika-Resistenzstrategie“ der Bundesregierung. Dafür entwickelte das Bundesministerium für Gesundheit (BMG) zusammen mit den Bundesministerien für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) bzw. Bildung und Forschung (BMBF) 2008 bereits einige Maßnahmen, um die Antibiotikaresistenzen zu reduzieren. Ein Aspekt bezog sich in erster Linie auf die Überwachung des Antibiotikaverbrauches (Abu Sin et al. 2018). So wird dieser vom Robert Koch-Institut deutschlandweit in den Krankenhäusern überwacht und in der Antibiotika-Verbrauchs-Surveillance (AVS) dokumentiert. Zusätzlich werden dabei auch in der Antibiotika-Resistenz-Surveillance (ARS) die Daten zur Resistenzentwicklung ermittelt (Robert Koch-Institut (RKI) 2019a). Im September 2022 wurden beide Datenbanken mit den Werten für das Jahr 2021 ergänzt und können rückwirkend bis 2015 bzw. 2008 abgerufen werden (Robert Koch-Institut (RKI) 2022; ARS Datenbank: Robert Koch-Institut (RKI) o. J.; AVS Datenbank: Robert Koch-Institut (RKI) o. J.). Außerdem wird als ein Teil von DART auch der Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin dokumentiert. Dazu erfasst die Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. zusammen mit dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) diese Daten und veröffentlicht sie im Bericht „GERMAP“ (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit/Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2016; Robert Koch-Institut (RKI) 2019a). In der 2015 veröffentlichten Strategie DART 2020 wurden die Inhalte überarbeitet und für die aktuelle Lage optimiert. Die Ziele wurden in sechs Kernpunkten zusammengefasst (Bundesministerium für Gesundheit/Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft/Bundesministerium für Bildung und Forschung 2015). Vor allem sollte das One-Health-Konzept weiter etabliert werden. Aber auch die Forschung sollte unterstützt werden, sodass dadurch ein neuer Anreiz in der Entwicklung neuer Antinfektiva geboten werden kann (Bundesministerium für Gesundheit 2022a). Dem aktuellen Abschlussbericht aus April 2022 zur DART 2020 geht hervor, dass dadurch bereits Fortschritte in dem Antibiotikaverbrauch und in den Antibiotikaresistenzraten zu verzeichnen sind. Einen deutlichen

Rückgang der Antibiotikaabgabemengen wurde in der Tiermedizin verzeichnet, nämlich um 59 % in der Zeitspanne von 2011 bis 2020. In der Humanmedizin ist in Deutschland der Antibiotikaverbrauch bezogen auf Europa zwar als niedrig einzustufen, jedoch ist der Verbrauch von Breitspektrumantibiotika, zu denen auch die (Fluor)Chinolone angehören, im Vergleich weiterhin hoch. Verbesserungsbedarf besteht ebenfalls in den Punkten, dass das gut etablierte Surveillance-System in Bezug auf den Antibiotikaverbrauch im stationären Bereich auf den ambulanten Sektor ausgeweitet werden müsste, da diesem der Großteil der Antibiotikaverordnungen zugrunde liegen und darin, dass der Fokus auf den sachgerechten Einsatz der Antibiotika gelegt werden müsste. Außerdem sollte der Umweltaspekt in Bezug auf die Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen mit einbezogen werden, sowie internationale Kooperationen zu schaffen, um weitere Erfolge in der Eindämmung der Antibiotikaresistenzen zu erlangen. Diese Punkte werden Teil der neuen Folgestrategie DART 2030 sein, bei der auch wiederum die Forschung innovativer Wirkstoffe gezielt gefördert werden soll (Bundesministerium für Gesundheit/Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft/Bundesministerium für Bildung und Forschung 2022; Rabold et al. 2022). Als Beispiel für eine Förderung kann hierfür bereits die Partnerschaft „*Global Antibiotic Research and Development Partnership*“ (GARDP) angeführt werden, eine Initiative der WHO und der Organisation „*Drugs for Neglected Diseases initiative*“ (DNDi), die die Entwicklung neuer Therapien zur Bekämpfung arzneimittelresistenter Infektionen (finanziell) fördert und das Ziel verfolgt bis zum Jahr 2025 fünf solcher Behandlungen bereitstellen zu können (Bundesministerium für Bildung und Forschung o. J. ; Global Antibiotic Research and Development Partnership (GARDP) o. J.). Das BMBF hat der GARDP für den Zeitraum von 2018 bis 2022 50 Millionen Euro aus seinem Haushalt zur Verfügung gestellt, um die Erforschung und Entwicklung neuer Antibiotika zu forcieren (Bundesministerium für Gesundheit 2022b).

3.1 *Escherichia coli*

Zu den in der Einleitung bereits erwähnten 3-MRGN bzw. 4-MRGN zählen auch *Escherichia coli* Isolate. Die bereits oben zitierte Studie verzeichnete in Europa zwischen den Jahren 2007 und 2015 einen Anstieg von etwa 70 000 auf knapp 286 000 Infizierte mit *E. coli* Bakterien, die resistent gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation waren. Dies entspricht einem Anstieg um den Faktor vier. Bei den Infektionszahlen mit Carbapenem-resistenten *E. coli* Isolaten ist die absolute Anzahl geringer (2007: 543 Infektionen, 2015: 2616 Infektionen), jedoch liegt der relative Anstieg bereits bei einem Faktor von fast fünf. Bei der Anzahl der Todesfälle, die durch die Infektionen mit Drittgenerationscephalosporin- bzw. Carbapenem-resistenten *E. coli* ausgelöst wurden, ist die Zunahme dieser Todesfälle bei beiden Antibiotikaklassen entsprechend gleich hoch (Cassini et al. 2019, Table 2). Eine dramatische

Einleitung und aktueller wissenschaftlicher Kenntnisstand

Entwicklung zu vermehrt 4-MRGN *Escherichia coli* Isolaten ist daher zu erwarten. Somit kann *E. coli* durchaus als Problemkeim bezeichnet werden.

Auch anhand der Europakarten des „European Centre for Disease Prevention and Control“ wird für *E. coli* das steigende Ausmaß der Resistenzen gegenüber den Cephalosporinen der 3. Generation ersichtlich (vgl. Abbildung 3.1–1) (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) o. J.). Deutschland liegt europaweit dabei im Mittelfeld mit einem Anteil von *E. coli* Isolaten, die resistent gegenüber den Cephalosporinen der 3. Generation sind, von 8,4 % im Jahr 2010 und 10,4 % für 2020.

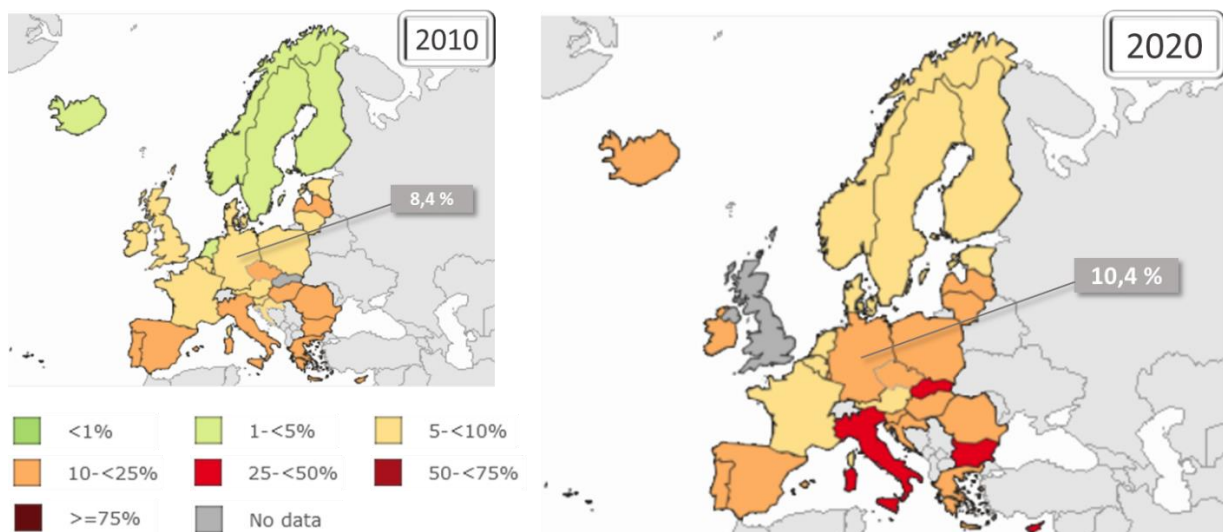


Abbildung 3.1–1: Resistenzsituation für *Escherichia coli* gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation in Europa (modifiziert nach: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) o. J.)

Dargestellt wurde die Resistenzsituation für die Bakterienspezies *Escherichia coli* und die Antibiotikaklasse der Cephalosporine der 3. Generation in Europa für die Jahre 2010 und 2020. Der prozentuale Anteil der resistenten Isolate wurde dabei farblich hervorgehoben (vgl. Abstufungen in der Legende). Für Deutschland wurden die prozentualen Werte in dieser Abbildung zusätzlich näher spezifiziert: Im Jahre 2010 waren 8,4 % der getesteten *Escherichia coli* Isolate resistent gegenüber den Cephalosporinen der 3. Generation und im Jahre 2020 waren es 10,4 %. Zusammengestellt wurde diese Abbildung mit der interaktiven Karte „Surveillance Atlas of Infectious Diseases“ des „European Centre for Disease Prevention and Control“ (ECDC), einer Einrichtung der Europäischen Union. Vorgenommene Einstellungen: Health topic: Antimicrobial resistance, Subpopulation: *Escherichia coli*, Subpopulation: Third-generation cephalosporins, Indicator: R – resistant isolates, percentage, Time: 2010 bzw. 2020. (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) o. J.)

Bei den Carbapenemen ist im Vergleich zu den Cephalosporinen der 3. Generation die Resistenzsituation aktuell noch gut, sodass eine prozentuale Darstellung der resistenten Isolate in einer Europakarte keine Unterschiede optisch darstellen kann. Daher wurde in der Abbildung 3.1–2 die absolute Anzahl der Carbapenem-resistenten *Escherichia coli* Isolate dargestellt. Dabei wird in dem betrachteten Zeitraum von 2010 bis 2020 bereits ein Unterschied sichtbar. Besonders hervorzuheben sind die drastischen Entwicklungen in Spanien und vor allem in Italien.

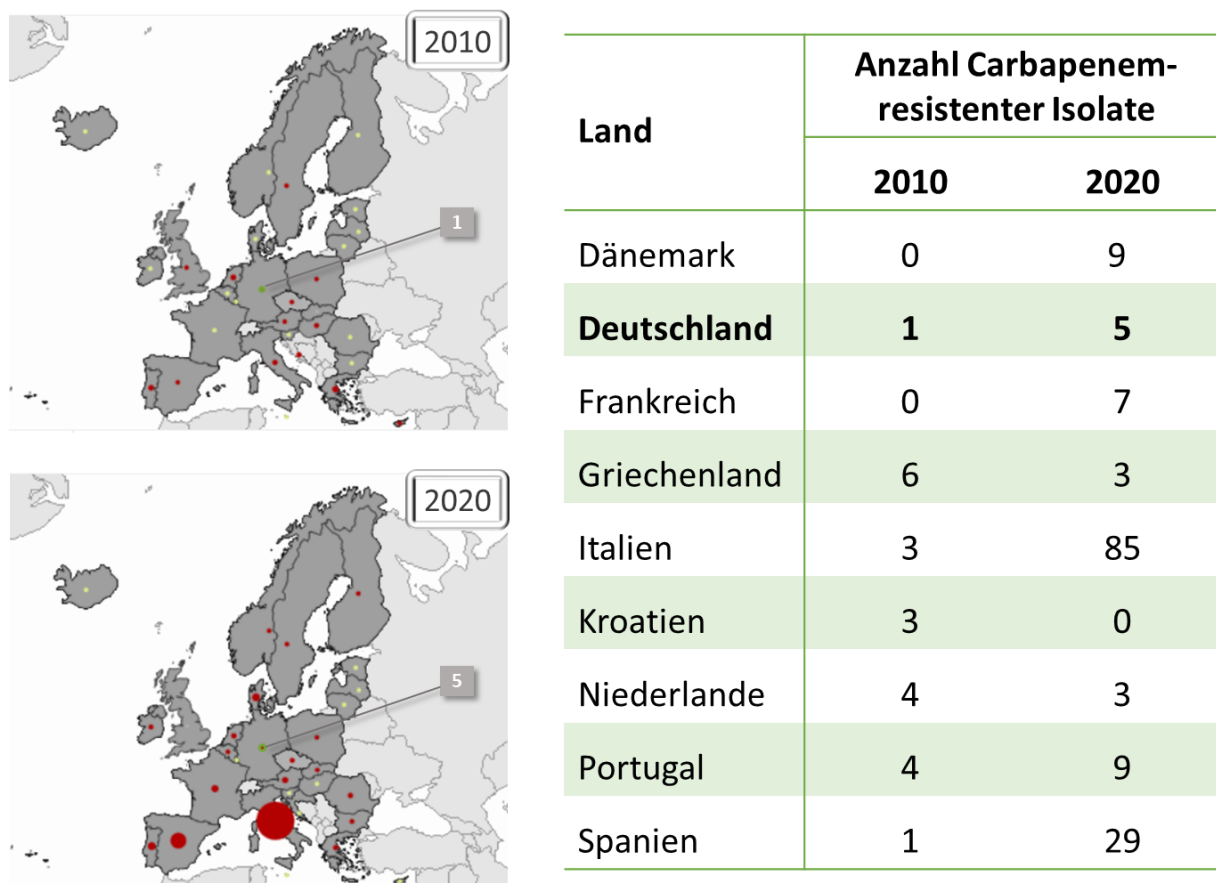


Abbildung 3.1–2: Resistenzsituation für *Escherichia coli* gegenüber Carbapenemen in Europa (modifiziert und tabellarisch ergänzt nach: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) o. J.)

Dargestellt wurde die Resistenzsituation für die Bakterienspezies *Escherichia coli* und die Antibiotikaklasse der Carbapeneme in Europa für die Jahre 2010 und 2020. Die Anzahl der resistenten Isolate wurde dabei sowohl farblich als auch mit dem unterschiedlichen Durchmesser der Kreise hervorgehoben. Für Deutschland wurde die Anzahl der Isolate im linken Teil dieser Abbildung zusätzlich näher spezifiziert: Im Jahre 2010 war einer der getesteten *Escherichia coli* Isolate resistent gegenüber Carbapenemen und im Jahre 2020 waren es fünf. Im rechten Teil der Abbildung wurde für eine Auswahl an europäischen Ländern für die beiden Jahre 2010 und 2020 jeweils die Anzahl der Carbapenem-resistenten *E. coli* Isolate tabellarisch aufgeführt. Zusammengestellt wurde diese Abbildung mit der interaktiven Karte „Surveillance Atlas of Infectious Diseases“ des „European Centre for Disease Prevention and Control“ (ECDC), einer Einrichtung der Europäischen Union. Vorgenommene Einstellungen: Health topic: Antimicrobial resistance, Subpopulation: *Escherichia coli*, Subpopulation: Carbapenems, Indicator: R – resistant isolates, Time: 2010 bzw. 2020. (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) o. J.)

3.1.1 Die Bedeutung von *E. coli* als Krankheitserreger

Allgemein gesehen handelt es sich bei *Escherichia coli* um ein gramnegatives stäbchenförmiges Bakterium, welches systematisch zur Familie der *Enterobacteriaceae* aus der Klasse der *Gammaproteobacteria* gehört (Jang et al. 2017). Es zählt zu den fakultativ anaeroben Organismen und kolonisiert bei Menschen und anderen Warmblütern typischerweise den unteren Teil des Gastrointestinaltraktes, vor allem das Colon (Martinez-Medina 2021). In die Umwelt kann *E. coli* über das Abwasser und die darin enthaltenden Fäkalien gelangen. Unter optimalen Wachstumsbedingungen kann *E. coli* sich etwa alle 20 Minuten teilen. Seit der Entdeckung im Jahre 1886 wurden viele Untersuchungen durchgeführt, sodass *Escherichia coli* mittlerweile zu einem der am besten erforschten Bakterien zählt und

auch einen beliebten Laborkeim darstellt (Jang et al. 2017). Im Jahr 1997 wurde die erste vollständige Genomsequenz veröffentlicht (Blattner et al. 1997), woraufhin in den laufenden Jahren mehrere Tausend sequenzierte *E. coli* Genome folgten (Jang et al. 2017).

Hinsichtlich der Humanpathogenität unterscheidet man obligat pathogene von fakultativ pathogenen *E. coli* Isolaten. Die obligat pathogenen *E. coli* verursachen meist Darminfektionen mit Diarrhoen und werden aufgrund ihres unterschiedlichen Pathotyps noch in acht Untergruppen kategorisiert: Enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), diffus adhärierende *E. coli* (DAEC), nekrotoxische *E. coli* (NTEC) und adhärenthinvasive *E. coli* (AIEC) (Levine 1987; Martinez-Medina 2021).

Anders als bei den obligat pathogenen Vertretern, die für intrainestinale Infektionen verantwortlich sind, handelt es sich bei den fakultativ pathogenen *E. coli* um Kommensale der humanen Darmflora, die nur außerhalb ihres Habitats Infektionen auslösen. Diese werden auch mit dem Akronym „ExPEC“ (extraintestinal pathogene *E. coli*) bezeichnet, also *E. coli*, die außerhalb des Darms vorkommen und dort zu Infektionen, sogenannten extraintestinalen Infektionen, führen. Dazu zählen typischerweise Harnwegsinfektionen, Neugeborenenmeningitis oder auch Pneumonien (Russo/Johnson 2000). Die überwiegende Mehrheit der unkomplizierten Harnwegsinfektionen wird durch ExPEC verursacht (Poolman/Wacker 2016). Die Behandlung solcher Harnwegsinfektionen sollte gemäß der anerkannten S3-Leitlinie „Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten“ erfolgen. Dabei werden die Fluorchinolone explizit nicht als Mittel der ersten Wahl empfohlen (Deutsche Gesellschaft für Urologie 2017). Auswertungen der Krankenkassendaten zeigen jedoch, dass die Antibiotikaverordnungen stark von diesen Empfehlungen abweichen. Im Jahr 2012 wurden beispielsweise in der antibiotischen Therapie von Harnwegsinfektionen 48 % Fluorchinolone verordnet. Auch weitere häufig verordnete Antibiotika waren nicht leitlinienkonform. Daraus ergibt sich das zwei Drittel der unkomplizierten Harnwegsinfektionen nicht gemäß der Leitlinie behandelt wurden (Lichtinger/Greifenberg/Gessner 2020). Generell sind jedoch in den letzten zehn Jahren in Deutschland die Verordnungen von Fluorchinolonen zurückgegangen (Kern 2021, S. 208, Abb. 11.2). Dies wirkt sich bereits positiv auf die Resistenzsituation für *Escherichia coli* gegenüber den Fluorchinolonen in Deutschland aus. Jedoch sollte dieser Zustand global betrachtet werden, wie es die folgende Abbildung 3.1–3 verdeutlicht.

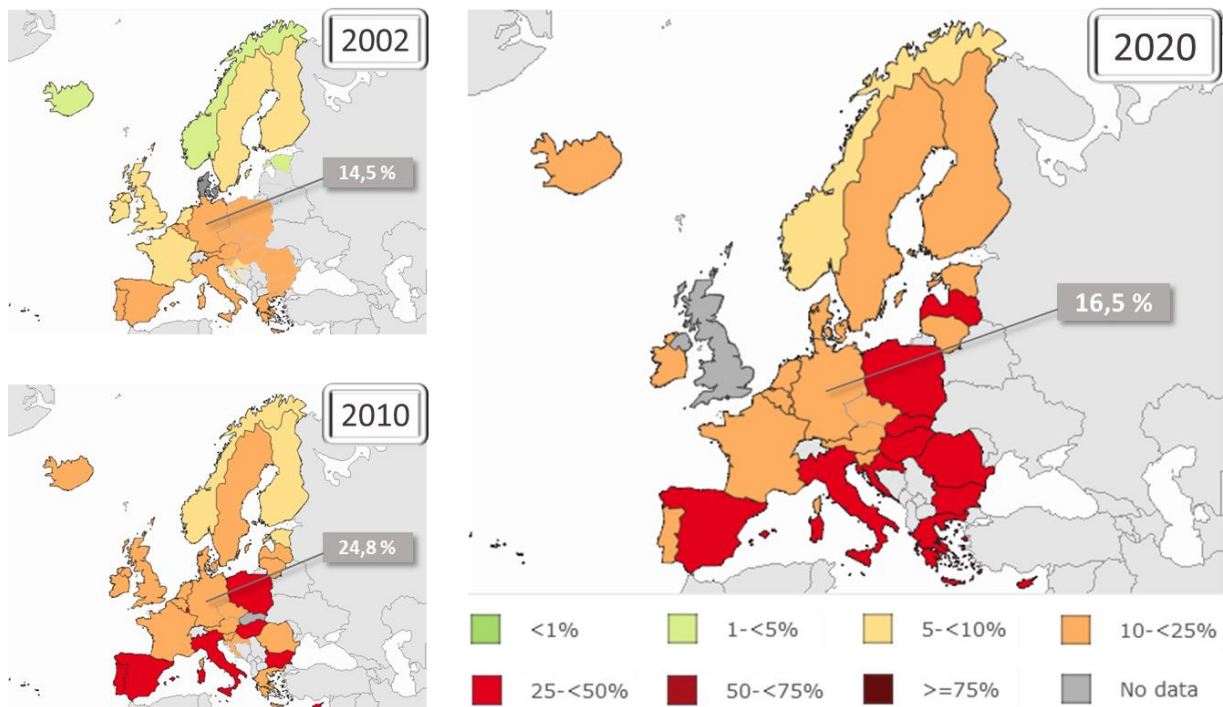


Abbildung 3.1–3: Resistenzsituation für *Escherichia coli* gegenüber Fluorchinolonen in Europa (modifiziert nach: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) o. J.)

Dargestellt wurde die Resistenzsituation für die Bakterienspezies *Escherichia coli* und die Antibiotikaklasse der Fluorchinolone in Europa für die Jahre 2002, 2010 und 2020. Der prozentuale Anteil der resistenten Isolate wurde dabei farblich hervorgehoben (vgl. Abstufungen in der Legende). Für Deutschland wurden die prozentualen Werte in dieser Abbildung zusätzlich näher spezifiziert: Im Jahre 2002 waren 14,5 % der getesteten *Escherichia coli* Isolate resistent gegenüber Fluorchinolonen, im Jahre 2010 waren es 24,8 % und 2020 16,5 %. Zusammengestellt wurde diese Abbildung mit der interaktiven Karte „Surveillance Atlas of Infectious Diseases“ des „European Centre for Disease Prevention and Control“ (ECDC), einer Einrichtung der Europäischen Union. Vorgenommene Einstellungen: Health topic: Antimicrobial resistance, Subpopulation: *Escherichia coli*, Subpopulation: Fluoroquinolones, Indicator: R – resistant isolates, percentage, Time: 2002 bzw. 2010 bzw. 2020. (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) o. J.)

Bei der Betrachtung der Europakarten in der Abbildung 3.1–3 wird deutlich, dass sich die Resistenzsituation für *E. coli* gegenüber den Fluorchinolonen in den zwei Jahrzehnten stark verschärft hat. Zwar ist in Deutschland im Jahr 2020 ein Rückgang des Anteils der fluorchinolonresistenten *E. coli* Isolate von 24,8 % auf 16,5 % über einen Zeitraum von zehn Jahren zu verzeichnen, jedoch ist global gesehen weiterhin ein Anstieg erkennbar. Dies unterstreicht die weiterhin hohe Bedeutung der Erforschung von Mechanismen der Entwicklung fluorchinolonresistenter *Escherichia coli* Bakterien.

3.2 Struktur und Wirkung von Fluorchinolonen

Die Fluorchinolone (FQ; engl.: *fluoroquinolone*) stellen eine eigene Klasse antimikrobieller Wirkstoffe dar. Sie werden synthetisch hergestellt und sind nicht von einem Naturstoff, wie es beispielsweise bei den Penicillinen der Fall ist, abgeleitet worden. Als Ausgangsverbindung der Chinolone wird das 1,8-Naphthyridinderivat Nalidixinsäure gesehen (Bush et al. 2020). Diese Substanz wurde im Jahre

markierten Reste R_1 und R_7 haben einen Einfluss auf die generelle Wirksamkeit der Fluorchinolone, wohingegen die hellblau hinterlegten Reste R_5 bzw. R_8 spezielle Veränderungen des Wirkspektrums beeinflussen können. Nähere Einzelheiten dazu sind in diesem Kapitel beschrieben.

Die Abbildung 3.2–1 schematisiert die Grundstruktur der Fluorchinolone. Dabei ist zu erkennen, dass die rot hinterlegte Carboxygruppe am C3-Atom bzw. die Carbonylgruppe am C4-Atom des Grundgerüsts essenziell für die antibakterielle Wirkung der Fluorchinolone sind (Domagala 1994). Über diese beiden Gruppen interagieren die Fluorchinolone mit ihrem Target, der Untereinheit A der Gyrase. Genauer sind die beiden Aminosäurereste Serin an Position 83 (Ser-83) und die Asparaginsäure an Position 87 (Asp-87) (Zählung und Aminosäurereste am Beispiel von *E. coli*) an dieser Interaktion beteiligt (Aldred/Kerns/Osheroff 2014; Drlica et al. 2009). Des Weiteren sind die beiden rot hinterlegten Gruppen mit dafür verantwortlich, dass das Fluorchinolone in die Bakterienzelle gelangt, da sie mit Magnesiumkationen Chelatkomplexe eingehen können und dadurch die Dissoziation bzw. Diffusion ermöglichen (Chapman/Georgopapadakou 1988). Bei dem orange gekennzeichneten Rest R_2 handelt es sich normalerweise um ein Wasserstoffatom. Aufgrund der räumlichen Nähe zur Bindestelle mit der Gyrase sollte es sich um eine kleine Gruppe handeln. Eine seltene Ausnahme zum Wasserstoff wird mit einem ankondensierten Isothiazolonring zur Säurefunktion am C_3 toleriert. Der Wirkstoff A-62824 zeigt *in-vitro* bei grampositiven und gramnegativen Bakterien eine erhöhte Wirksamkeit, die jedoch *in-vivo* stark abnimmt (Domagala 1994; Petersen 2001). Das grün markierte Fluoratom begründet den Namen der Wirkstoffklasse Fluorchinolone und gehört dementsprechend ebenfalls essenziell zu dem Grundgerüst. Durch den Fluorsubstituenten ergibt sich eine enorme Aktivitätssteigerung. Die Gyrase wird dadurch über das zehnfache stärker inhibiert und die MHK verbessert sich um bis zu dem Hundertfachen (Domagala 1994). Bei den Resten R_1 , R_5 , R_7 und R_8 handelt es sich nicht um für die Wirkung essenzielle Komponenten, allerdings kann über sie die Wirkstärke, das Wirkspektrum oder die Pharmakokinetik beeinflusst bzw. optimiert werden. Sobald R_1 eine Cyclopropylgruppe darstellt, ist die antibakterielle Wirkung am besten. Ein Beispiel, bei dem dieser Substituent genutzt wird, ist das Fluorchinolone Ciprofloxacin (vgl. Abbildung 3.2–2). Wie der Struktur-Wirkungs-Beziehung in Abbildung 3.2–1 zu entnehmen ist, können auch eine 2,4-Difluorogruppe bzw. eine *tert*-Butylgruppe den Substituenten R_1 bilden, jedoch vermindert sich im Vergleich zu einer Cyclopropylgruppe dadurch die Wirkstärke des Fluorchinolons (Domagala 1994). Die 2,4-Difluorogruppe als Substituent verbessert hingegen die Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs (Pham/Ziora/Blaskovich 2019). Ein Sauerstoff- oder Stickstoffatom als R_1 reduzieren dagegen generell die Aktivität des Fluorchinolons. Das bereits erwähnte Ciprofloxacin trägt neben der Cyclopropylgruppe noch einen weiteren Substituenten am Grundgerüst, und zwar einen Piperazinrest an der Position R_7 (vgl. Abbildung 3.2–2), der die Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Bakterien erhöht. Ein Pyrrolidinrest als Substituent an dieser Position vermittelt hingegen ein verbessertes Wirkspektrum gegenüber den grampositiven

Bakterien (Sanchez et al. 1988). Dabei kann eine Abstufung getroffen werden; die höchste Wirkstärke weisen azabicyclische Substituenten an der Position R_7 auf, wie es bei dem Fluorchinolone Moxifloxacin vorkommt, gefolgt von Pyrrolidinresten und abschließend methylierten Piperazinresten (Pham/Ziora/Blaskovich 2019). Substitutionen am R_5 tragen auch zu einer verbesserten Wirkung gegenüber den grampositiven Bakterien bei. Eine Methylierung bringt leichte Effekte, eine stärkere Verbesserung wird durch eine Hydroxygruppe erreicht und eine Aminogruppe erhöht am besten den Effekt in der Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien. Stellen die Substituenten an der Position R_8 ein Chlor- bzw. Fluoratom oder eine Methoxygruppe dar, kann das Wirkspektrum der Fluorchinolone auf anaerobe Bakterien erweitert werden. In seltenen Fällen liegt ein Ringschluss zwischen den Substituenten R_8 und R_1 vor, als Beispiel kann Ofloxacin als Racemat bzw. das Enantiomer und die pharmakologisch aktive Form davon, Levofloxacin, angeführt werden (Domagala 1994).

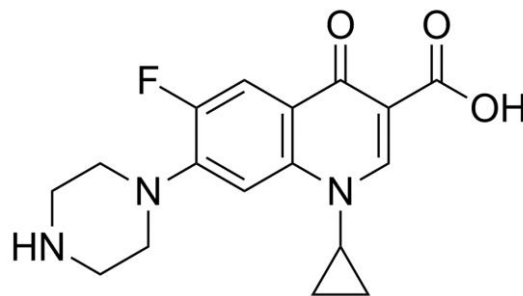


Abbildung 3.2–2: Strukturformel des Fluorchinolons Ciprofloxacin

Das Antibiotikum Ciprofloxacin gehört zur zweiten Generation der Fluorchinolone. Im Vergleich zu dem Grundgerüst der Fluorchinolone (vgl. Abbildung 3.2–1) trägt der Wirkstoff zwei Substituenten. Zum einen die Cyclopropylgruppe als Rest R_1 zur generellen Steigerung der antibakteriellen Wirkung und zum anderen das Piperazin als Rest R_7 . Dadurch wird die Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Bakterien stark erhöht.

Wie oben bereits erwähnt haben die Fluorchinolone als Zielstruktur die bakteriellen Typ-II-Topoisomerasen Topoisomerase II (DNA Gyrase) und Topoisomerase IV (Topo IV). Beide bilden jeweils ein Heterotetramer in der Form A_2B_2 . Für die A-Untereinheiten von Gyrase bzw. Topo IV codieren die Gene *gyrA* bzw. *parC*, für die jeweiligen B-Untereinheiten die Gene *gyrB* bzw. *parE* (Peng/Marians 1993; Swanberg/Wang 1987). Die Funktion von Topoisomerasen allgemein besteht in der Änderung des topologischen Zustandes zirkulär geschlossener DNA-Doppelstränge. Diese Zustände sind folgendermaßen definiert: relaxiert – superspiralisiert. Die beiden DNA-Stränge liegen in einer Doppelhelix vor, bei der sie alle 10,5 bp einmal umeinander gewunden vorliegen und dort einmal miteinander verknüpft sind. Dies beschreibt den physiologischen Zustand der DNA, die sogenannte B-Konformation. Das DNA-Molekül bzw. seine helikale Achse liegt planar in einer Ebene, sobald die Zahl der Umwindungen gleich derjenigen der Verknüpfungen ist. Dieser Zustand beschreibt

topologisch den relaxierten Zustand der DNA-Doppelstränge. Wird die Zahl der Verknüpfungen verändert, streckt sich das DNA-Molekül aus der Ebene hinaus. Die DNA-Doppelhelix (spiralförmig) bildet selbst auch eine Spirale. Es entsteht eine Superspiralisierung, die als negativ bezeichnet wird, wenn die Zahl der Verknüpfungen der DNA-Einzelstränge reduziert wird. Durch den topologischen Zustand der Superspiralisierung wird zum einen das Chromosom komprimiert, damit es Platz in der Bakterienzelle hat, und zum anderen erleichtert die negative Superspiralisierung die Abläufe von Replikation und Transkription (Abu Mraheil 2004; Heisig 2001; Sinden 1994; Watson/Crick 1953).

Gyrase führt negative Superspiralisierung in relaxierte DNA ein. Dazu benötigt sie Energie in Form von ATP (Gellert et al. 1976). Topoisomerase IV kann sowohl negative als auch positive Superspiralisierung relaxieren, wobei dabei die positive Superspiralisierung präferiert wird (Crisona et al. 2000). Jedoch ist sie nicht in der Lage, negative Superspiralisierung einzuführen (Peng/Marians 1995). Dafür ist Topo IV deutlich aktiver bei der Dekatenierung, also der Trennung der beiden miteinander wie Kettenglieder („Catenane“) verbundenen ringförmigen Tochterchromosomen nach erfolgter Replikation (Bush/Evans-Roberts/Maxwell 2015; Zechiedrich/Cozzarelli 1995). Der Mechanismus der Topologieänderung durch die Typ-II-Topoisomerasen beruht auf einer Mehrschrittreaktion mit (1) Bindung zweier DNA-Segmente, dem G-Segment (engl.: *gate*) und dem T-Segment (engl.: *transported*), (2) der Spaltung des G-Segments unter Ausbildung zweier Phosphodiesterbindungen zwischen GyrA-Untereinheiten und den 5'-Phosphatresten, (3) dem Transfer des T-Segments durch das geöffnete G-Segment, sowie (4) der Religation der beiden gespaltenen DNA-Stränge unter ATP-abhängiger Konformationsänderung der B-Untereinheiten und (5) der Regeneration des Enzyms. Am Beispiel der Gyrase erklärt, wird zunächst das G-Segment von den A-Untereinheiten gebunden. Außerdem sorgen die A-Untereinheiten dafür, dass der DNA-Doppelstrang so positioniert wird, dass das T-Segment den B-Untereinheiten präsentiert wird. Durch die Bindung von ATP an den B-Untereinheiten, verschließen sich die beiden B-Untereinheiten so, dass das T-Segment darin eingeschlossen wird. Das G-Segment wird nun vorübergehend geöffnet, es kommt an dieser Position zum kontrollierten Bruch beider DNA-Stränge. Die jeweiligen Enden des G-Segments werden von der Gyrase-Untereinheit kovalent gebunden. Nun kann das T-Segment das „Gate“ (geöffnetes G-Segment) passieren. Im Anschluss wird das G-Segment sofort wieder religiert. Durch ein zweites ATP wird das Enzym wieder in seinen Ausgangszustand versetzt und kann erneut weitere negative Superspiralisierung einführen (Bush et al. 2020; Bush/Evans-Roberts/Maxwell 2015). Die Fluorchinolone binden an den Komplex aus Enzym und den kovalent gebundenen Enden des geöffneten G-Segments. Dabei nutzen sie den Vorteil, dass die DNA in dem Zustand eine andere Struktur aufweist. Sie können am Doppelstrangbruch die DNA interkalieren. Die Carboxygruppe und die Carbonylgruppe des Fluorchinolons interagieren mit den beiden Aminosäureresten Serin an Position 83 und Asparaginsäure an Position 87 der A-Untereinheit. Dadurch wird eine Konformationsänderung ausgelöst. Zusätzlich ragt der Rest R₇ des

Fluorchinolons, welcher sich strukturell gegenüber der Carboxygruppe bzw. Carbonylgruppe befindet, bei dieser Interaktion aus der DNA-Struktur heraus. Dadurch wird vermieden, dass sich die DNA-Basen der beiden Enden des geöffneten G-Segments zur Religation finden (Aldred/Kerns/Osheroff 2014; Bush et al. 2020; Drlica et al. 2009; Laponogov et al. 2009). Somit bleibt durch die Fluorchinolone zum einen die Topoisomerase an der DNA gebunden, sodass im weiteren Verlauf das Enzym nicht mehr in der Lage ist, die Topologie der DNA zu verändern. Als Folge werden dadurch unter der Anwesenheit der Fluorchinolone die Replikation und die Transkription in der Bakterienzelle inhibiert (Wentzell/Maxwell 2000; Willmott et al. 1994). Zum anderen können die verursachten Doppelstrangbrüche für das Bakterium letal sein, wenn sie stabilisiert bleiben (Bush et al. 2020; Malik/Zhao/Drlica 2006).

Ergänzend zu diesem Wirkprinzip der Fluorchinolone wird mittlerweile bereits seit längerer Zeit diskutiert, dass ihre vollständige bakterizide Wirkung auf der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species* (ROS)) basiert. Die generierten Doppelstrangbrüche sorgen initial dafür, dass die Replikation innehält. Dies sorgt erst einmal initial für eine bakterio-statische Wirkung. Der schlussendlich induzierte Zelltod (= bakterizide Wirkung) wird dabei zunächst über die Bildung von reaktiven Superoxid-Anionen (O_2^-) ausgelöst. Diese oxidieren Eisen-Schwefel-Cluster als prosthetische Gruppe einer Reihe essenzieller Enzyme, wodurch Eisen (Fe^{2+}) frei wird. Dieses wird jedoch auch für die Regenerierung bzw. Reparatur der oxidierten Eisen-Schwefel-Cluster benötigt. Durch die wiederholte Oxidation der Eisen-Schwefel-Cluster durch die reaktiven Superoxid-Anionen (O_2^-) und deren anschließende Reparatur wird ein abweichender Gehalt an freiem Eisen (Fe^{2+}) begünstigt. Das Verhältnis von freiem Eisen zu gebundenen Eisen ist verändert, wobei ein Pool an freiem Eisen entsteht. Dadurch wird wiederum eine vermehrt ablaufende Fenton-Reaktion, bei der Hydroxyl-Radikale ($\bullet OH$) gebildet werden, begünstigt (Dwyer et al. 2007). Als Folge werden durch die dabei verstärkt gebildeten Hydroxyl-Radikale sowohl die DNA als auch Membranlipide und Proteine beschädigt. Die DNA-Schäden führen zunächst zu einem Stillstand der Replikation. Das Reparaturprotein RecA wird durch diese in einigen Bereichen nun vorliegende einzelsträngige DNA aktiviert. Die SOS *response* wird initiiert (Farr/Kogoma 1991; Witkin 1976). Letztendlich wird durch die verstärkt gebildeten Hydroxyl-Radikale der Zelltod ausgelöst (Dwyer et al. 2007). Der zuvor angenommene Mechanismus der Inhibition der Gyrase als einzige Ursache für eine bakterizide Wirkung der Fluorchinolone, wurde somit um den Einfluss von ROS als Bestandteil des bakteriziden Wirkmechanismus erweitert. Die Arbeitsgruppe um James J. Collins weitete ihre These, dass die bakterizide Wirkung erst durch den Einfluss der ROS entsteht, noch auf weitere bakterizid wirkende Antibiotikaklassen aus, wie die Aminoglykosid-Antibiotika und die β -Lactam-Antibiotika. Sie arbeiteten ein Model aus, wonach die initiale Interaktion des Antibiotikums mit seinem Target die Oxidation von NADH in der Atmungskette stimuliert. Dies wiederum ist abhängig von der NADH-Bildung im Citratzyklus, also einem effizienten Metabolismus.

Dies geschieht über eine Aufregulation der NADH Dehydrogenase I-Aktivität. Das Verhältnis von NAD^+ zu NADH steigt dabei an, was jedoch auf einen starken relativen Rückgang von NADH bzw. einen erhöhten Verbrauch von NADH bei der Exposition mit bakteriziden Antibiotika zurückzuführen ist (Kohanski et al. 2007). Diese Hyperaktivierung der Atmungskette begünstigt darauf die Bildung von Superoxid-Anionen (O_2^-) (Imlay/Fridovich 1991), wodurch Eisen-Schwefel-Cluster oxidiert und letztendlich über die Fenton-Reaktion vermehrt Hydroxyl-Radikale ($\bullet\text{OH}$) gebildet werden, welche für die direkte bakterizide Wirkung verantwortlich sind (Kohanski et al. 2007). Weiterhin zeigte die Arbeitsgruppe, dass unter strikt anaeroben Bedingungen die bakterizide Wirkung der drei Antibiotika Ampicillin, Gentamicin und Norfloxacin abgeschwächt wird (Dwyer et al. 2014). Demnach tragen also ROS mit zu der antimikrobiellen bzw. bakteriziden Wirkung bei.

3.3 Resistenzmechanismen gegenüber Fluorchinolonen

Bei den Fluorchinolonen (FQ) handelt es sich, wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, um rein synthetisch hergestellte Antibiotika, welche sich nicht von einem Naturstoff ableiten. Dieser Aspekt birgt zunächst einen Vorteil in der Resistenzentwicklung, da beispielsweise vor dem ersten Einsatz der Fluorchinolone kein Selektionsdruck vorlag und dementsprechend bis zu dem Zeitpunkt keine Evolution von Bakterien, welche resistent gegenüber den Fluorchinolonen sind, stattfand (Heisig 2019). Mittlerweile wurden jedoch verschiedene Mechanismen beschrieben, die die Bakterien resistent gegenüber den Fluorchinolonen werden lassen. Unterteilt werden dabei drei verschiedene Kategorien: Chromosomal codierte FQ-Resistenz durch eine veränderte Zielstruktur und durch eine reduzierte Wirkstoffakkumulation in der Bakterienzelle sowie Plasmid-vermittelte FQ-Resistenz (Aldred/Kerns/Osherooff 2014; Correia et al. 2017; Wiedemann/Heisig 1994). Diese verschiedenen Resistenzmechanismen werden in den folgenden Kapiteln anhand des gramnegativen Bakteriums *Escherichia coli* näher dargestellt und sind bereits schematisch in Abbildung 3.3–1 zusammengefasst. Generell treten diese Veränderungen nicht nur einzeln auf; die Kombination verschiedener Mechanismen vermittelt dabei erst eine hohe Fluorchinolonresistenz von klinischer Relevanz (Aldred/Kerns/Osherooff 2014; Correia et al. 2017; Hopkins/Davies/Threlfall 2005).

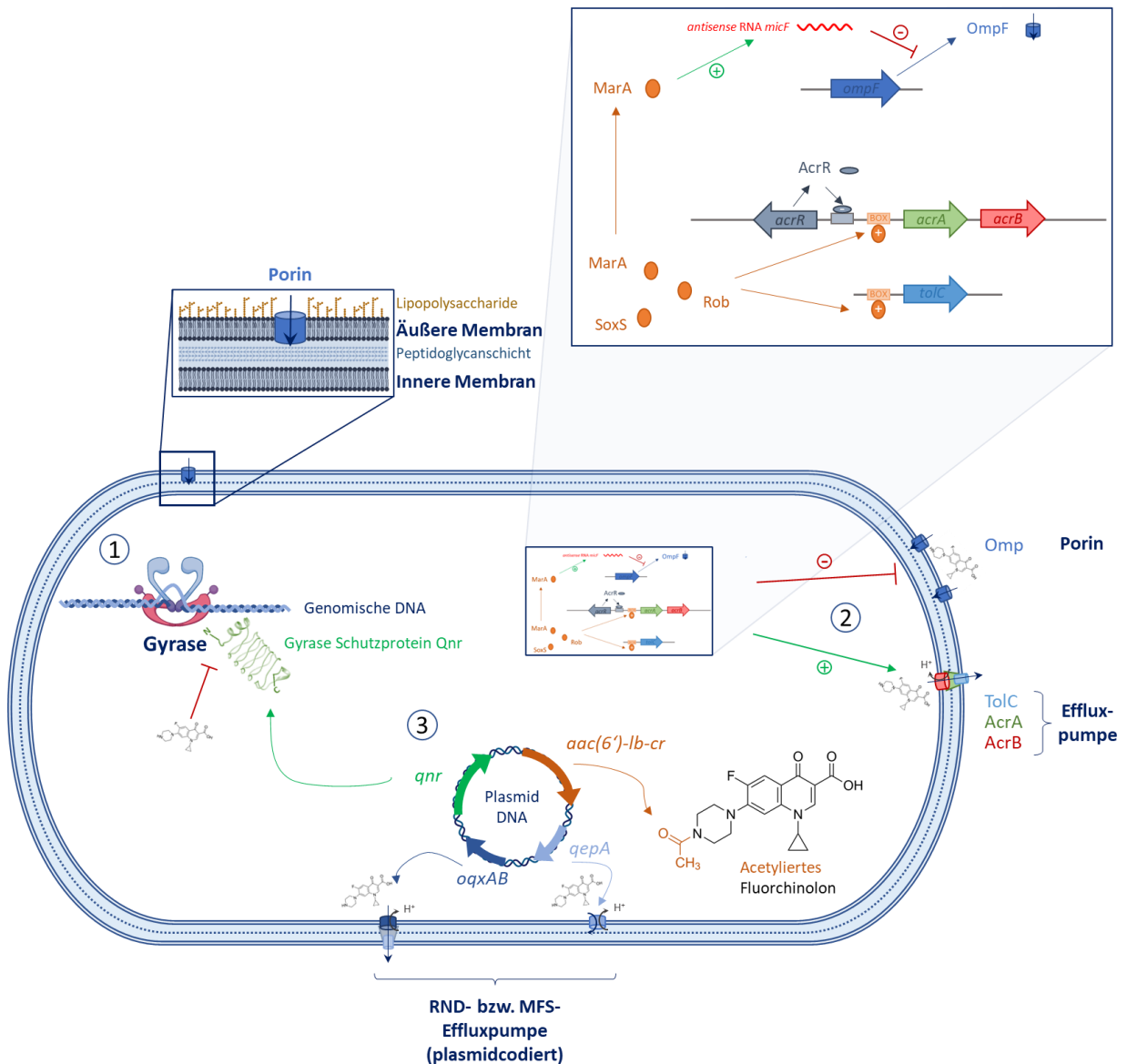


Abbildung 3.3–1: Schematische Darstellung der Resistenzmechanismen gegenüber Fluorchinolonen bei *E. coli* (modifiziert und ergänzt nach: Aldred/Kerns/Osheroff 2014; Correia et al. 2017; Grkovic/Brown/Skurray 2002)

Dargestellt sind die verschiedenen Resistenzmechanismen, die bei *E. coli* gegenüber den Fluorchinolonen bekannt sind. Eine jeweilige detaillierte Beschreibung dieser einzelnen Mechanismen findet sich in Kapitel 3.3 bzw. den dazugehörigen Unterkapiteln wieder. (1) Chromosomal codierte FQ-Resistenz durch eine veränderte Zielstruktur, hier am Beispiel der Gyrase. (2) Chromosomal codierte FQ-Resistenz durch eine reduzierte Wirkstoffakkumulation in der Bakterienzelle über zwei Möglichkeiten: Verminderter Influx über eine reduzierte Anzahl an Porinen und außerdem ein verstärkter Efflux über eine veränderte Regulation der Effluxpumpen. Die Regulation betreffender Gene ist ebenfalls schematisiert und in Kapitel 3.3.2 ausführlicher beschrieben. (3) Plasmid-vermittelte FQ-Resistenz über drei Möglichkeiten: *Qnr*-Proteine, das FQ-modifizierende Enzym AAC(6′)-Ib-cr und die Plasmid-codierten Effluxpumpen *QepA* und *OqxAB*.

3.3.1 Chromosomal codierte FQ-Resistenz durch eine veränderte Zielstruktur

Der häufigste vorkommende Mechanismus, der eine Resistenz gegenüber den Fluorchinolonen vermittelt, ist auf Mutationen in den Genen, welche für die Typ-II-Topoisomerasen Gyrase und Topoisomerase IV codieren und den Angriffspunkten der Fluorchinolone entsprechen, zurückzuführen (Correia et al. 2017). Diese sogenannten Targetmutationen betreffen dabei meistens die Gene *gyrA*

und *parC*; weniger kommt es zu Resistenzmutationen in den Genen *gyrB* und *parE* (Hooper/Jacoby 2016). Einzelne Mutationen einer Typ-II-Topoisomerase können die Resistenz gegenüber Fluorchinolonen auf bis zu das Zehnfache erhöhen. Liegt hingegen eine Doppelmutation in einer Typ-II-Topoisomerase vor bzw. gibt es eine Mutation in beiden Enzymen („*dual target concept*“), so kann die Resistenz auf das Hundertfache gesteigert werden (Aldred/Kerns/Osheroff 2014; Heisig 1996). Werden diese einzelnen Targetmutationen näher betrachtet, wird ersichtlich, dass sie jeweils in einer bestimmten Region des jeweiligen Gens auftreten, der sogenannten QRDR (engl.: *quinolone resistance-determining region*). Für *Escherichia coli* liegt diese Region im Protein GyrA zwischen den Aminosäuren 67 und 106. Bei dem Protein ParC liegt diese Region vergleichbar zwischen den Aminosäuren 63 und 102 (Hooper/Jacoby 2016; Yoshida et al. 1990). Mutationen in der QRDR, die in dem Bereich zu einem Aminosäureaustausch führen, sorgen für eine veränderte Proteinstruktur des Targetenzym und damit für eine abweichende Bindungsaffinität zwischen dem Fluorchinolon und der DNA-bindenden Typ-II-Topoisomerase (Redgrave et al. 2014). Am häufigsten, mit über 90 %, tritt bei *E. coli* eine Veränderung an Position 83 (Serin) des Proteins GyrA auf, gefolgt von der Mutation am Codon 87 (Asparaginsäure) (Aldred/Kerns/Osheroff 2014; Morgan-Linnell et al. 2009; Oram/Fisher 1991; Ruiz et al. 1995). Dabei wird durch eine *gyrA*-Mutation an Ser-83 die katalytische Aktivität der Gyrase in Abwesenheit von Fluorchinolonen nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu verringert sich diese jedoch um das 5-10-fache bei einer *gyrA*-Mutation an Asp-87 bereits ohne das Einwirken der Fluorchinolone (Aldred/Kerns/Osheroff 2014; Barnard/Maxwell 2001; Hiasa 2002). In der zweiten Zielstruktur der Fluorchinolone, Topo IV, kommt es zu Veränderungen des Proteins ParC, sofern mindestens bereits eine *gyrA*-Mutation vorliegt. Dabei sind in der QRDR die Positionen 78 (Glycin), 80 (Serin) und 84 (Glutaminsäure) von ParC betroffen. Das Ser-80 von ParC ist dabei homolog zu Ser-83 in GyrA (Heisig 1996; Heisig 2001).

3.3.2 Chromosomal codierte FQ-Resistenz durch eine reduzierte Wirkstoffakkumulation in der Bakterienzelle

Ein weiterer häufig verbreiteter Mechanismus, der einen Einfluss auf die Resistenz ausübt, besteht in der Reduzierung der Wirkstoffakkumulation am Wirkort. Dabei spielen bei gramnegativen Bakterien zwei Faktoren eine Rolle. Zum einen kann der Influx, also der Transport durch die äußere Membran, vermindert sein, zum anderen kann der Efflux aus der Zelle heraus verstärkt ablaufen. Auch eine Kombination beider Varianten ist möglich (Correia et al. 2017). Die genauen Mechanismen des modifizierten Influx bzw. Efflux und deren chromosomalen Veränderungen sind im Folgenden näher aufgeführt und in Abbildung 3.3–1 schematisiert.

Bei den gramnegativen Bakterien bildet die äußere Membran mit ihren Lipopolysaccharidstrukturen eine zusätzliche Barriere für hydrophile Wirkstoffe. Damit diese Wirkstoffe das Zellinnere erreichen können, nutzen sie wasserhaltige Proteinkanäle, sogenannte Porine, die in der äußeren Membran vorhanden sind (Nikaido 1976). Diese sogenannten OMPs (engl.: *outer membrane proteins*) können durch Mutationen in den betreffenden Genen herunterreguliert werden, eine veränderte Größe aufweisen oder gar nicht mehr vorhanden sein. Davon können beispielsweise die Porine OmpF, OmpC und OmpA betroffen sein (Correia et al. 2017). Ein verminderter Influx von hydrophilen Substanzen in die gramnegative Bakterienzelle resultiert. Bei den Proteinen OmpF und OmpC handelt es sich um generelle Porine, die unspezifisch die Diffusion der hydrophilen Substanzen durch die äußere Membran vermitteln (Nikaido 1992). Das Porin OmpF wird jedoch vor allem auch von den Fluorchinolonen für die Passage der äußeren Membran genutzt (Chapman/Georgopapadakou 1988; Sawai et al. 1992). Eine erhöhte Expression von OmpX sorgt für eine Runterregulation von OmpF, wodurch eine erhöhte Antibiotikaresistenz gegenüber den Fluorchinolonen aufgrund des verminderten Influx durch OmpF vermittelt werden kann (Correia et al. 2017; Dupont et al. 2007). Bei klinischen *E. coli* Isolaten werden hauptsächlich Mutationen in *ompC* beschrieben, die einen veränderten Influx bewirken und eine erhöhte minimale Hemmkonzentration (MHK) der Mutante, vor allem gegenüber dem Antibiotikum Cefotaxim, im Vergleich zu ihrem Ausgangsstamm aufweisen (Lou et al. 2011). Des Weiteren können auch Mutationen, die eine veränderte Lipopolysaccharidstruktur bewirken, zu einer Antibiotikaresistenz führen (Correia et al. 2017).

Neben dem verminderten Influx aufgrund der Mutationen in den betreffenden Genen, kann auch der Efflux verändert sein. Meistens sorgen hierbei Mutationen für Veränderungen in den regulatorischen Proteinen, die dann eine erhöhte Expression der Effluxpumpen bewirken. Seltener führen Mutationen in den Strukturgenen der Effluxpumpen zu einer veränderten Aktivität. Bei den gramnegativen Bakterien sind hauptsächlich die Effluxpumpentypen aus der RND-Familie (engl.: *resistance-nodulation-division*) an der FQ-Resistenz beteiligt (Correia et al. 2017). Bei *E. coli* ist hierbei vor allem die Effluxpumpe AcrAB-TolC zu erwähnen. Sie besteht aus einem Komplex mit drei Komponenten, welche insgesamt durch die äußere und die innere Membran verlaufen: AcrA, AcrB und TolC (Du et al. 2014). Den Kanal durch die äußere Membran bildet TolC (Aono/Tsukagoshi/Yamamoto 1998; Fralick 1996). AcrB bildet den Protonen-Antiporter, also die eigentliche Pumpe, und ist in der inneren Membran positioniert (Elkins/Nikaido 2003). Die dritte Komponente stellt AcrA dar, ein Membranfusionsprotein, welches im Periplasma liegt und die beiden erst genannten Domänen miteinander verbindet (vgl. Abbildung 3.3–1 (2)) (Ma et al. 1993; Ma et al. 1995). Für eine FQ-Resistenz, die durch eine erhöhte Expression der Effluxpumpe AcrAB-TolC hervorgerufen wird, sind erstrangig Mutationen in den regulatorischen Einheiten der Effluxpumpe verantwortlich. Dabei wird zwischen zwei verschiedenen Arten der Regulation unterschieden. Zum einen erfolgt eine primäre globale Regulation

auf äußere Einflüsse der Zelle und zum anderen die sekundäre lokale Regulation (Matthiessen 2007). Zu den globalen Regulatoren, die einen Einfluss auf die Expression der AcrAB-TolC Effluxpumpe nehmen, zählen die globalen Aktivatoren MarA (engl.: *multiple antibiotic resistance*), SoxS (engl.: *superoxide response protein*), sowie Rob (engl.: *right origin-binding*) (Nishino/Nikaido/Yamaguchi 2009). *Upstream* des Operons *acrAB* und zusätzlich *upstream* des Gens *tolC* befindet sich eine Erkennungsstelle für diese globalen Aktivatoren (Grkovic/Brown/Skurray 2002). Durch ihre Interaktion mit dem Promotor wird die Expression von *acrAB* und *tolC* gesteigert. Mutationen in den Genen dieser Regulatorsysteme können eine verstärkte Expression der Effluxpumpe vermitteln und darüber zu einer erhöhten FQ-Resistenz führen. Vor allem treten diese Mutationen in den lokalen Regulatoren dieser Aktivatoren auf, die wiederum über eine Überexpression des Aktivators zu einer vermehrten Expression der Effluxpumpengene führen können. Hierbei sei beispielhaft der lokale Repressor MarR des Transkriptionsaktivators MarA zu nennen. Mutationen im *marR*-Gen, die die Funktionalität des Repressors inhibieren bzw. seine Existenz auflösen, führen zu einer hohen FQ-Resistenz auch bei klinischen Isolaten (Linde et al. 2000). Einzelne Mutationen in *marA* alleine bringen hingegen keine Expressionssteigerung des Gens *acrA* und auch keine Veränderung in der MHK (Arntjen 2011). Zusammenfassend wird durch die Überexpression des globalen Aktivators, wie MarA, die Expression der Effluxpumpen erhöht und dadurch prägt sich die Resistenz aus (Gambino/Gracheck/Miller 1993; Jair et al. 1995). Durch die Überexpression des Aktivators MarA wird jedoch nicht nur die Expression der Effluxpumpe AcrAB-TolC gesteigert, sondern auch die der *antisense* RNA *micF* (Andersen et al. 1989; Cohen/McMurry/Levy 1988). Diese kann wiederum an die mRNA von *ompF* binden. Dadurch wird die Translationsinitiation inhibiert und der Abbau der *ompF*-mRNA induziert. Das Porin OmpF wird demnach weniger gebildet und dementsprechend nicht in dem Ausmaß in die äußere Membran der Bakterien integriert (Delihis/Forst 2001; Schmidt/Zheng/Delihas 1995). So wird durch die gesteigerte *marA*-Expression nicht nur der Efflux erhöht, sondern zugleich auch der Influx durch die verringerte Anzahl der Porine gesenkt. Die Wirkstoffakkumulation in der Bakterienzelle wird effizient reduziert einhergehend mit einer um das 4- bis 8-fache erhöhten MHK für Fluorchinolone (Correia et al. 2017).

Neben der globalen Regulation der Effluxpumpe AcrAB-TolC über die Aktivatoren MarA, SoxS und Rob, spielt auch eine sekundäre lokale Regulation eine Rolle. Das sich *upstream* des Operons *acrAB* befindende Gen *acrR* codiert für den Repressor AcrR. Dieser kann die Expression von *acrAB* reprimieren und wird selbst beispielsweise durch die MarA bedingte gesteigerte Expression von *acrAB* induziert. Somit sorgt der Repressor AcrR für eine sekundäre Feinabstimmung der Expression der Effluxpumpe und vermeidet ihre unerwünschte Überexpression (Ma et al. 1996). Mutationen im Gen *acrR* können auch, ähnlich wie Mutationen der Regulatoren der globalen Aktivatoren wie MarA, einen Beitrag zur FQ-Resistenz leisten. Dabei wurden verschiedene *acrR*-Mutationen gefunden. Sowohl einzelne Punktmutationen, oder auch Deletionen oder Insertionen, die zu einem Funktionsverlust

des Repressors führten, konnten bestimmt werden (Komp Lindgren/Karlsson/Hughes 2003; Wang et al. 2001). Durch den Verlust der Repression durch den sekundären Regulator, brachte die resultierende erhöhte Expression der Effluxpumpe AcrAB-TolC, eine erhöhte FQ-Resistenz mit sich. Diese Mutationen im Gen *acrR* zeigen auch klinische Relevanz, vor allem eine Punktmutation in einer konservierten Region (Arg-45) wurde in klinischen *E. coli* Isolaten öfters beschrieben (Chowdhury et al. 2019; Webber/Piddock 2001; Webber/Talukder/Piddock 2005).

Generell wird durch die Veränderung des Influx bzw. des Efflux und der damit einhergehenden reduzierten Wirkstoffakkumulation in der Bakterienzelle jedoch nur eine moderate Resistenzerhöhung bewirkt. Ohne zusätzliche Resistenzmechanismen ergibt sich keine klinisch relevante Resistenz, jedoch kann als ergänzender, parallel vorkommender Mechanismus dadurch eine klinisch problematische Resistenz erzielt werden (Correia et al. 2017).

3.3.3 Plasmid-vermittelte FQ-Resistenz

Eine jüngere Art der Resistenzmechanismen gegenüber den Fluorchinolonen beschreibt die Plasmid-vermittelte FQ-Resistenz. Vor gut 20 Jahren wurden zu der sogenannten PMQR (engl.: *plasmid-mediated quinolone resistance*), also der Plasmid-vermittelten und dementsprechend übertragbaren FQ-Resistenz, die ersten Daten veröffentlicht (Martínez-Martínez/Pascual/Jacoby 1998). Mittlerweile sind drei verschiedene Möglichkeiten dieser Plasmid-vermittelten FQ-Resistenz beschrieben worden (Aldred/Kerns/Osheroff 2014; Jacoby/Strahilevitz/Hooper 2014). Dazu zählen die Qnr-Proteine, ein FQ-modifizierendes Enzym und Plasmid-codierte Effluxpumpen. Im Folgenden werden diese Mechanismen näher beschrieben und sind bereits in Abbildung 3.3–1 schematisiert.

Im Jahre 1998 wurden als Erstes die Qnr-Proteine (engl.: *quinolone resistance*) als Mechanismus der PMQR entdeckt. Ein klinisches *Klebsiella pneumoniae* Isolat vermittelte eine leichte Resistenz gegenüber Nalidixinsäure und Fluorchinolonen, die auf andere gramnegative Spezies übertragbar war (Martínez-Martínez/Pascual/Jacoby 1998). Verantwortlich für diese Plasmid-vermittelte FQ-Resistenz ist das Gen *qnr* eines konjugierbaren Plasmids. Mittlerweile sind um die Einhundert verschiedene *qnr*-Varianten bekannt, welche in mindestens sechs Unterfamilien gruppiert wurden (Correia et al. 2017). Generell codieren diese Gene für die Qnr-Proteine, die zur PRP-Familie (engl.: *pentapeptide repeat protein*) gehören (Vetting et al. 2006). Durch ihre Struktur sind die Qnr-Proteine in der Lage die DNA-Helix nachzuahmen (Hegde et al. 2005). Von der Gyrase bzw. der Topoisomerase IV kann das Qnr-Protein anstelle der DNA gebunden werden. Eine Spaltung durch die Enzyme bleibt jedoch aus. Dies führt dazu, dass die molekulare Zielstruktur der Fluorchinolone nicht gebildet wird (vgl. Kapitel 3.2) und dementsprechend die Qnr-Proteine die Typ-II-Topoisomerasen vor den Fluorchino-

Ionen schützen können. Daher wird ihnen auch der Name Schutzproteine verliehen (Heisig 2019; Tran/Jacoby/Hooper 2005a; Tran/Jacoby/Hooper 2005b).

Als zweiter PMQR-Mechanismus wurde 2006 eine modifizierte Acetyltransferase gefunden, welche durch das Gen *aac(6′)-Ib-cr* codiert wird. Im Unterschied zu der gewöhnlichen Aminoglykosid Acetyltransferase, die durch das Gen *aac(6′)-Ib* codiert wird und eine Resistenz gegenüber den Aminoglykosid-Antibiotika wie z. B. Kanamycin und Amikacin vermittelt, verdeutlicht der namentliche Zusatz „-cr“ die zusätzlich vermittelnde Ciprofloxacin-Resistenz. Durch zwei Punktmutationen, W102R und D179Y, ist das Enzym in der Lage den unsubstituierten Stickstoff des Piperazins als Rest R₇ des Fluorchinolongrundgerüsts (vgl. Abbildung 3.2–1 und Abbildung 3.2–2) zu acetylieren (vgl. Abbildung 3.3–1). Dies betrifft die Fluorchinolone Ciprofloxacin und Norfloxacin, die durch die Acetylierung eine verminderte antibiotische Aktivität aufweisen (Robicsek et al. 2006). Über dieses PMQR Gen wird dem Bakterium nicht nur eine FQ-Resistenz vermittelt, sondern zusätzlich auch eine etwas abgeschwächte Resistenz gegenüber einem Wirkstoff einer anderen Antibiotikaklasse. Nämlich gegenüber dem eigentlichen natürlichen Substrat des Enzyms, dem Aminoglykosid-Antibiotikum Kanamycin (Klugman/Levin 2006; Strahilevitz et al. 2009; Vetting et al. 2008).

Die dritte Möglichkeit einer PMQR wurde kurz nach der Entdeckung des FQ-modifizierenden Enzyms AAC(6′)-Ib-cr dann im Jahre 2007 gefunden und beschreibt die Verbreitung Plasmid-codierter Effluxpumpen (Hansen et al. 2007; Yamane et al. 2007). Zwei verschiedene dieser Effluxpumpen sind verbreitet: QepA und OqxAB. Die Plasmid-codierte Effluxpumpe QepA gehört zur MFS-Familie (engl.: *major facilitator superfamily*). Zwei Varianten sind von ihr bekannt. Die erst beschriebene QepA1 und die QepA2, die sich in zwei Aminosäuren (Ala99Gly und Val134Ile) von der ersten unterscheidet, jedoch einen ähnlichen Phänotyp aufweist (Cattoir/Poirel/Nordmann 2008). Die Plasmid-codierte Effluxpumpe QepA ist FQ-spezifisch und vermittelt eine verminderte Empfindlichkeit des plasmidtragenden Bakteriums gegenüber hydrophilen Fluorchinolonen wie Ciprofloxacin und Norfloxacin (Périchon/Courvalin/Galimand 2007). Für andere untersuchte Antibiotika, wie Ampicillin, Kanamycin, Gentamicin, Imipenem oder Ceftazidim, änderte sich die MHK unter Vorhandensein der Plasmid-codierten Effluxpumpe QepA nicht (Yamane et al. 2008; Yamane et al. 2007). Die weitere Plasmid-codierte Effluxpumpe OqxAB gehört, wie die chromosomal codierte Effluxpumpe AcrAB-TolC, zur RND-Familie (engl.: *resistance-nodulation-division*). Damit ist sie eine der ersten Plasmid-codierten Effluxpumpen dieses Typs (Hansen et al. 2007). Ursprünglich wurde ihre Resistenz vermittelnde Wirkung gegenüber dem aus dem Veterinärsektor stammenden Wachstumspromotor Olaquinox (Oqx) (Hauschild/Schneider/Bronsch 1977), welcher auch antibiotisch wirksam ist (Suter/Rosselet/Knüsel 1978), entdeckt (Hansen et al. 2004; Sørensen et al. 2003). Mittlerweile wurde die Plasmid-codierte Effluxpumpe OqxAB in vielen verschiedenen klinischen Isolaten gefunden (Kim et al. 2009; Zhao et al.

2010) und sie umfasst ein breites Substratspektrum über Ciprofloxacin, Norfloxacin, Chloramphenicol und Trimethoprim (Hansen et al. 2007). Im Gegensatz zu QepA ist die Effluxpumpe OqxAB dementsprechend nicht FQ-spezifisch.

3.4 Selektion hoch fluorchinolonresistenter *Escherichia coli* Mutanten *in-vitro*

Ausgehend von einem fluorchinolonempfindlichen Humanisolat, welches aus einer Stuhlprobe einer gesunden Probandin, die vorab wissentlich noch nie mit Fluorchinolonen behandelt wurde, isoliert wurde, wurde ein *in-vitro* Selektionsexperiment durchgeführt. Dazu wurde das *E. coli* Wildtypisolat (WT) auf schrittweise ansteigenden Konzentrationen der Antibiotika Nalidixinsäure bzw. Ciprofloxacin inkubiert, um die Entwicklung hoch fluorchinolonresistenter Mutanten zu simulieren (Heisig/Tschorny 1994). Aus dieser Selektion des Wildtypisolates gingen nach einigen Passagen auf in der Konzentration ansteigendem fluorchinolonhaltigen Nährmedium auch die aufeinanderfolgenden Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa hervor. Zunächst erfolgte sowohl eine phänotypische Charakterisierung der isolierten Mutanten hinsichtlich ihrer Antibiotikaempfindlichkeit und ihrer Fitness als auch eine genotypische Untersuchung der sogenannten QRDR (engl.: *quinolone resistance-determining region*) (vgl. Kapitel 3.3.1) der Gene *gyrA* und *parC* (Bagel et al. 1999). Auch im Vergleich zu klinischen *Escherichia coli* Isolaten treten die wiederkehrenden bekannten Mutationen in den Genen der Zielstruktur der Fluorchinolone auf (Heisig 1996). Bei den Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa liegt im Protein GyrA die Doppelmutation S83L und D87G, sowie die Mutation S80I in ParC vor (Bagel et al. 1999). Auffällig ist, dass eine oder zwei *gyrA*-Mutationen in der QRDR einen Anstieg in der minimalen Hemmkonzentration (MHK) für die Fluorchinolone bewirken, aber dass eine einzelne *parC*-Mutation dagegen nur einen sehr geringen Effekt hat. Jedoch bewirken die drei Mutationen in Kombination einen starken Anstieg in den MHK-Werten. Demnach entsteht keine Hochresistenz, solange nicht auch Veränderungen am zweiten Target der Fluorchinolone, der Topoisomerase IV, auftreten (Heisig 1996). Neben der veränderten Zielstruktur in den beiden Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa, bedingt durch die Mutationen in *gyrA* und *parC*, wodurch es zu einer FQ-Resistenz kommt, wird diese Resistenz in diesen Mutanten durch einen zweiten Mechanismus noch verstärkt. Durch eine Mutation (74 bp-Deletion) in dem lokalen Repressor MarR des Transkriptionsaktivators MarA wird, über die Inhibierung der Funktionalität dieses Repressors und der damit verbundenen Überexpression des Aktivators, welche zu einer vermehrten Expression der Effluxpumpengene, die über diesen Aktivator reguliert werden, führt, eine über die reduzierte Wirkstoffakkumulation in der Bakterienzelle erhöhte FQ-Resistenz bewirkt (vgl. Kapitel 3.3.2) (Arntjen 2011). Obwohl diese beschriebenen Mutationen in beiden der Mutanten vorliegen, weicht ihre Antibiotikaempfindlichkeit

(MHK) und Fitness (Generationszeit) dennoch voneinander ab. Die Mutanten aus dem einen späteren Selektionsschritt weisen dabei eine erhöhte Antibiotikaresistenz und Generationszeit auf (Bagel et al. 1999). Die Weiterentwicklung in der Sequenzieretechnik ermöglichte es dann, neben der bereits erfolgten molekulargenetischen Analyse einzelner Resistenzmutationen in bekannten Zielgenen, das Genom von *E. coli* WT vollständig zu sequenzieren und zu assemblieren. Mit weiteren Genomsequenzen der verschiedenen Mutanten aus der *in-vitro* Selektion konnte im Anschluss ein Alignment mit dem Genom des Wildtyps erstellt werden. So konnten neben den bereits geläufigen Resistenzmutationen weitere, bislang im Zusammenhang mit Fluorchinolonresistenz nicht bekannte, Mutationen identifiziert werden. Dabei wurden in der Mutante *E. coli* MIII eine Insertion eines Triplets in dem Gen *rpoC*, welches für die β' -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase codiert, und eine Punktmutation in dem Gen *yccJ*, welches für ein Protein bislang unbekannter Funktion codiert, gefunden. In der Mutante *E. coli* MIVa wurde bei der Auswertung der Alignments zusätzlich noch eine Deletion in dem Gen *clpA*, welches für eine ATPase codiert, identifiziert (vgl. Kapitel 3.5 und 5.1) (Heisig, A., Heisig, P., Manuskript in Vorbereitung). Diese *clpA*-Deletion galt es in dieser Arbeit näher zu charakterisieren.

3.5 Die ATPase ClpA

Die ATPase ClpA von *Escherichia coli* zählt zu der Familie der AAA+ ATPasen (engl.: *ATPases associated with diverse/a variety of cellular activities*) (Neuwald et al. 1999) und war die erste Clp ATPase, die als Komponente einer Protease entdeckt wurde (Hwang et al. 1987; Katayama-Fujimura/Gottesman/Maurizi 1987; Zolkiewski 2006). Das Monomer besteht strukturell aus fünf Domänen, die zu drei funktionellen Gruppen zugeordnet werden können: Eine N-Domäne und zwei AAA+ ATPase Module. Somit, aufgrund der zwei enthaltenen ATPase Module, wird ClpA zu den AAA+ ATPasen der Klasse 1 zugeordnet (Doyle/Wickner 2009). Die N-Domäne umfasst 142 Aminosäuren, das erste ATPase Modul (D1) 270 und das zweite (D2) 319 Aminosäuren. Dabei besteht jedes der beiden ATPase Module aus zwei Untereinheiten: Eine kleine und eine große Unterdomäne (vgl. Abbildung 3.5–1 (a)). Zwischen diesen Unterdomänen befindet sich jeweils die ADP-Bindestelle. Die beiden AAA+ ATPase Module D1 und D2 sind über eine Kopf-Schwanz-Verknüpfung miteinander verbunden. Diese Anordnung spielt für die Funktionalität im Proteasekomplex (vgl. Kapitel 3.6.1) eine Rolle. Dort wird die aufeinander folgende Aktivität der beiden Domänen erfordert (Guo et al. 2002b). Generell sind die beiden AAA+ ATPase Module nicht komplett identisch und außerdem arbeiten sie auch unabhängig voneinander. Das Modul D1 ist neben der ATPase-Aktivität vor allem für die Hexamer-Ausbildung zuständig, wohingegen D2 eine höhere ATPase-Aktivität besitzt (Singh/Maurizi 1994). Für eine effiziente Verarbeitung vor allem von besonders stabilen Proteinen werden jedoch

Einleitung und aktueller wissenschaftlicher Kenntnisstand

beide Module bzw. die ATP-Hydrolyse in beiden Domänen benötigt (Guo et al. 2002b; Kress/Mutschler/Weber-Ban 2009). Die N-Domäne ist vor allem für die Substraterkennung von ClpA zuständig und beeinflusst darüber die nachfolgende Entfaltung bzw. Umstrukturierung der Proteine (Erbse et al. 2008).

Sechs der ClpA Monomere lagern sich in Anwesenheit von ATP zu einem Makromolekül zusammen. Dabei entsteht eine doppelt gestapelte Ringstruktur (Beuron et al. 1998; Kessel et al. 1995), bei dem jeweils die Module D1 den oberen Bereich der Ringstruktur ausmachen und die D2-Module den unteren Bereich beschreiben (vgl. Abbildung 3.5–1 (b)) (Guo et al. 2002b).

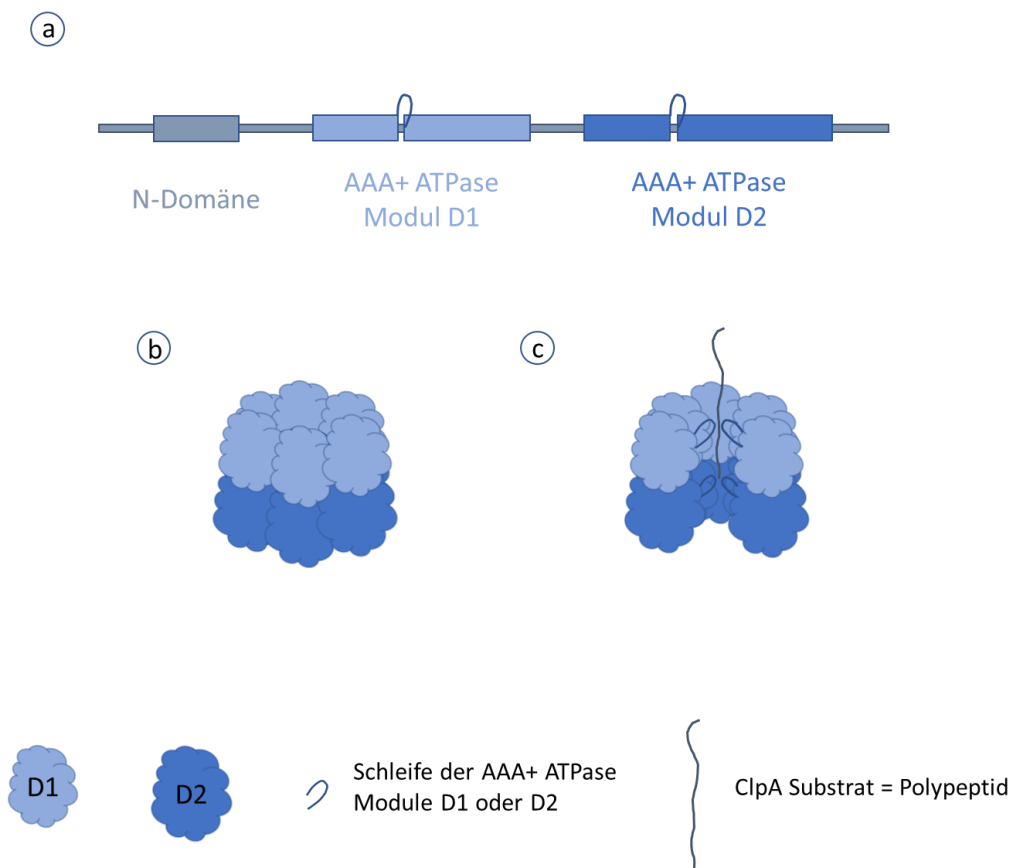


Abbildung 3.5–1: Schematische Darstellung der ATPase ClpA von *Escherichia coli* (modifiziert nach: Duran/Weaver/Lucius 2017; Guo et al. 2002b; Kress/Mutschler/Weber-Ban 2009; Zolkiewski 2006)

(a) Schematische Darstellung der fünf Domänen des Monomers ClpA. Sie können drei funktionellen Gruppen zugeordnet werden: Die N-Domäne und die beiden AAA+ ATPase Module D1 und D2, welche jeweils aus einer kleinen und einer großen Unterdomäne bestehen. Zwischen ihnen befindet sich die ADP-Bindestelle. Die ATP-Hydrolyse führt hier zu einer Konformationsänderung der Schleife. **(b)** Schematische Darstellung eines ClpA-Hexamers mit doppelt gestapelter Ringstruktur, wobei die Domänen D1 (hellblau) den oberen Teil und die Domänen D2 (mittelblau) den unteren Teil ausmachen. **(c)** Schematische Darstellung eines Querschnittes durch ein ClpA-Hexamer (nur fünf der sechs Untereinheiten sind dargestellt) mit Blick in den ClpA Tunnel. Durch die ATP-Hydrolyse und die dadurch bedingte Konformationsänderung der Schleifen der Module D1 bzw. D2 wird das Polypeptid weiter in bzw. durch die ClpA Pore gedrückt.

Als Hexamer ist ClpA in der Lage unter Anwesenheit von ATP einen gewissen strukturellen Umbau von Proteinen zu katalysieren, auch ohne die Anwesenheit einer Protease. Dafür werden jeweils beide ATPase Module benötigt (Rajendar/Lucius 2010). Nach erfolgter Substraterkennung kommt es zur ATP-Hydrolyse im Modul D1. Dadurch wird die Schleife der Domäne D1 (vgl. Abbildung 3.5–1 (c)) nach unten bewegt, wodurch das Substrat für bis zu 14 Aminosäuren in den ClpA Tunnel gedrückt wird. Hierbei entsteht eine Polypeptid-Schleife im Zwischenraum der beiden Domänen D1 und D2. Diese wird durch die sich anschließende ATP-Hydrolyse im Modul D2 und dem dadurch entstehenden Abknicken der Schleife der Domäne D2 Stück für Stück weitertransportiert, wodurch die Polypeptid-Schleife stetig wieder verkürzt wird. Im Modul D2 wird mit einer Geschwindigkeit von etwa vier Aminosäuren pro Sekunde transportiert. Im Gegenzug dazu arbeitet das Modul D1 mit einer Geschwindigkeit von 1,4 Aminosäuren pro Sekunde. Nach mehreren Zyklen des Moduls D2, folgt erneut ein Zyklus von D1. Eine neue Polypeptid-Schleife entsteht, die anschließend erneut über mehrere D2-Zyklen verkürzt wird (Duran/Weaver/Lucius 2017). Wird ClpA mit der zweiten in *E. coli* vorkommenden ATPase ClpX verglichen, so weist ClpA zwar eine schnellere Polypeptid-Entfaltungsfunktion auf, jedoch erfolgt die Translokation durch ClpA langsamer in kleineren regelmäßigen Schritten (Olivares et al. 2014).

ClpA wird außerdem eine ATP-abhängige Chaperonfunktion zugeschrieben. So kann beispielsweise durch ClpA allein das Dimer RepA, ein Replikationinitiatorprotein, in seine Monomere gespalten werden und dadurch aktiviert werden (Wickner et al. 1994). Diese Eigenschaft wird in dem in dieser Arbeit verwendeten *in-vivo* Funktionstest von ClpA genutzt (vgl. Kapitel 5.4.1 und 8.2.1.5).

Ein weiteres Substrat der ATPase ClpA bildet MazE. Dabei handelt es sich um das Antitoxin des MazEF Antitoxin-Toxin Systems von *Escherichia coli* (Aizenman/Engelberg-Kulka/Glaser 1996; Gottesman et al. 1998), welches die Grundlage der Ergebnisse der Kapitel 5.5 und 5.6 bildet.

Generell geht die ATPase ClpA meistens mit der Serinprotease ClpP einen Komplex ein. Hierfür ist eine kurze Erkennungssequenz in dem AAA+ ATPase Modul D2 nötig (vgl. Kapitel 5.1). In diesem ClpAP-Komplex nimmt ClpA die Funktion der Substratspezifität ein. Diesem Komplex ist nachfolgend ein eigenes Kapitel gewidmet (vgl. Kapitel 3.6.1).

3.6 Proteasen

Escherichia coli weist einige verschiedene energieabhängige Proteasen auf. Ein besonderes Augenmerk soll hierbei im nachfolgenden Kapitel 3.6.1 auf den Proteasekomplex ClpAP gelegt werden, da dieser die ATPase ClpA beinhaltet, die einen Kernbestandteil dieser Arbeit ausmacht. Dennoch sollen die anderen Proteasen von *E. coli* hier nicht unerwähnt bleiben. Generell können die energieabhän-

gigen Proteasen in vier Familien eingeteilt werden (Gottesman 2003). Nachfolgend werden diese näher vorgestellt. Allgemein gilt, dass sich die ATPase und die proteolytische Domäne im Cytoplasma der Bakterienzelle befinden und dass die ATPase jeweils zu der großen Familie der AAA+ ATPasen zuzuordnen ist. Bei zwei Proteasefamilien werden die ATPase und die proteolytische Domäne durch zwei einzelne Gene codiert, bei den zwei anderen Familien werden die beiden Einheiten durch ein einzelnes Gen zusammen codiert (Gottesman 2003).

Nachdem als erstes der Proteasekomplex ClpAP, der aus zwei Komponenten besteht, entdeckt wurde (vgl. Kapitel 3.5 und 3.6.1), wurde im Anschluss ein weiteres Mitglied dieser Proteasefamilie gefunden: **ClpXP** (Gottesman et al. 1993; Wojtkowiak/Georgopoulos/Zylicz 1993). Die proteolytische Domäne ClpP ist dieselbe wie bei dem ClpAP-Komplex, allein die ATPase variiert in diesem Proteasekomplex. Dadurch kommt es zu einer anderen Substratspezifität. ClpXP wird beispielsweise für den Abbau des Sigmafaktors σ^5 (codiert durch *rpoS*), vermehrt von SsrA-markierten Proteinen oder des P1 Proteins Phd benötigt (Gottesman et al. 1998; Lehnherr/Yarmolinsky 1995; Levchenko et al. 2000; Schweder et al. 1996). Das Monomer ClpX ist strukturell gesehen einfacher aufgebaut. Im Gegensatz zu ClpA besitzt ClpX nur eine kleinere N-Domäne und nur ein anstelle von zwei AAA+ ATPase Modulen (Singh et al. 2001). Im Vergleich zu ClpA ist nur das zweite ATPase Modul in ClpX enthalten, dementsprechend gehört ClpX zu den AAA+ ATPasen der Klasse 2 (Doyle/Wickner 2009). Dieses Modul ist jedoch ebenso in eine größere und eine kleine Unterdomäne unterteilt (Baker/Sauer 2012; Glynn et al. 2009). Die ClpX-Monomere lagern sich ebenfalls zu einem Hexamer zusammen (Grimaud et al. 1998), jedoch wird dabei nicht die doppelt gestapelte Ringstruktur wie bei ClpA ausgebildet, da keine zwei ATPase Module pro Monomer vorliegen. Des Weiteren kann sich ein ClpX Hexamer teilweise auch bei Abwesenheit von ATP ausbilden, was bei ClpA nicht der Fall ist (Singh et al. 2001). Die proteolytische Domäne ClpP lagert sich zu einem Tetradecamer (= 14 Monomere) zusammen, wobei sich zwei Ringe mit jeweils sieben Monomeren ausbilden (Flanagan et al. 1995; Wang/Hartling/Flanagan 1997). Bei ClpP handelt es sich um eine Serinprotease, die im aktiven Zentrum die katalytische Triade Ser-97 – His-122 – Asp-171 aufweist. Die katalytischen Triaden jedes Monomers lagern sich im Tetradecamer so zusammen, dass sie sich im Zwischenraum von jeweils drei Monomeren befinden. Eine zentrale nahezu kugelförmige Kammer entsteht, in der alle 14 aktiven Zentren lokalisiert sind (Wang/Hartling/Flanagan 1997). Für die Interaktion der AAA+ ATPase ClpX mit der proteolytischen Domäne ClpP zur Ausbildung des Proteasekomplexes ist, vergleichbar mit der Interaktion zwischen ClpA und ClpP, ein Motiv aus drei Aminosäuren von Bedeutung. Im Vergleich zu ClpA liegt hierbei ein leicht abweichendes Motiv zugrunde: IGF anstelle von IGL. Das heißt neben den Aminosäuren Isoleucin und Glycin wird bei der Interaktion ClpX-ClpP die Aminosäure Phenylalanin anstelle von Leucin wie bei ClpA genutzt (vgl. Kapitel 5.1) (Kim et al. 2001).

Eine weitere Proteasefamilie bei *Escherichia coli*, bei der die ATPase und die proteolytische Domäne auch durch zwei einzelne Gene codiert werden, beschreibt die Protease **ClpYQ**, die auch unter dem Namen **HslUV** bekannt ist (Gottesman/Wu/Missiakas 1997; Missiakas et al. 1996; Rohrwild et al. 1996). Ähnlich wie bei den Genen *clpX* und *clpP* werden auch *clpY* und *clpQ* (bzw. *hslU* und *hslV*) über ein Operon reguliert, wobei *clpY* bzw. *hslU* das zweite Gen des Operons *downstream* von *clpQ* bzw. *hslV* darstellen. Dabei codieren *clpY* (bzw. *hslU*) für die ATPase und *clpQ* (bzw. *hslV*) für die proteolytische Domäne. HslU weist eine hohe Übereinstimmung zu ClpX auf, wodurch der Name ClpY entstand. Etwa die Hälfte der Aminosäuresequenz stimmt mit der von ClpX überein. Sowohl ClpX als auch ClpY weisen dabei unkonservierte Bereiche auf, jedoch sind diese unterschiedlich lokalisiert. Bei ClpY unterteilt dieser Bereich das ATPase Modul. Im Gegensatz dazu weist die Proteinsequenz von ClpP keine Homologie zu der von ClpQ (bzw. HslV) auf (Missiakas et al. 1996). ClpQ (bzw. HslV) weist dafür eine Ähnlichkeit in der Proteinsequenz (28,5 %) zu einem eukaryotischen 20S Proteasom auf (Chuang et al. 1993). Ähnlich wie bei den anderen, in diesem Kapitel bereits beschriebenen, ATPasen lagern sich sechs ClpY (bzw. HslU) Monomere unter der Anwesenheit von ATP zu einem ringförmigen Hexamer zusammen. Im Gegensatz zu ClpP lagert sich die proteolytische Domäne ClpQ (bzw. HslV) zu einem Dodecamer zusammen. Dabei werden zwei Ringe mit jeweils sechs Monomeren aus eigenem Antrieb gebildet (Kessel et al. 1996; Rohrwild et al. 1997). Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass es sich bei der proteolytischen Domäne ClpQ (bzw. HslV) nicht um eine Serinprotease wie bei ClpP handelt, dafür besitzt diese Protease ein Threonin im aktiven Zentrum, dessen Hydroxylgruppe auch in der Lage ist, einen nucleophilen Angriff auf das Substrat zu vollziehen (Rohrwild et al. 1996). Als Substrate für ClpYQ (bzw. HslUV) wurden beispielsweise der Zellteilungsinhibitor SulA und der Repressor Acr der Bakteriophage P22 gefunden (Burton/Baker/Sauer 2005; Seong et al. 1999).

Bei der ersten Proteasefamilie, bei der die ATPase und die proteolytische Domäne durch ein einzelnes Gen, *lon* bzw. auch *capR* genannt, zusammen codiert werden, handelt es sich um die Protease **Lon**, die zuerst auch mit dem Namen La bezeichnet wurde. Es handelt sich ebenfalls um eine ATP-abhängige Protease (Chin et al. 1988; Chung/Goldberg 1981). Ein Lon Monomer kann in eine N-Domäne, ein zentral gelegenes ATPase Modul und C-terminal in eine proteolytische Domäne unterteilt werden (Rotanova et al. 2006). Anfänglich wurde die Lon Protease für eine klassische Serinprotease gehalten (Chung/Goldberg 1981). Jedoch zeigte sich, dass die Aminosäuresequenz keine Homologie mit der katalytischen Triade einer klassischen Serinprotease aufwies (Rotanova et al. 2004). Außerdem zeigten typische Serinprotease-Inhibitoren nur eine schwache inhibitorische Wirkung. Mittlerweile ist bekannt, dass das aktive Zentrum der Lon Protease mit den Aminosäuren Ser-679 und Lys-722 nur eine katalytische Dyade darstellt (Botos et al. 2004; Rotanova et al. 2006). Sechs Lon-Untereinheiten lagern sich zu einem Hexamer in einer ringförmigen Struktur zusammen, sodass ein Hohlraum mittig der sechs Untereinheiten entsteht. Die Ausbildung des Hexamers erfolgt unab-

hängig von ATP, benötigt jedoch Magnesiumionen. Ohne diese dissoziieren die Komplexe in Dimere oder Monomere (Park et al. 2006). Außerdem können sich die Untereinheiten auch zu einem Dodecamer zusammenlagern. In dieser Formation sinkt jedoch die Aktivität größere Substrate abzubauen, kleinere werden dennoch in einer vergleichbaren Frequenz wie in einem Lon-Hexamer degradiert. Eine Beeinflussung der Substratspezifität wird dadurch erreicht (Vieux et al. 2013). Im Normalfall liegt ein Gleichgewicht zwischen der Formation eines Hexamers bzw. der eines Dodecamers vor. Bestimmte Mutationen können jedoch das Gleichgewicht auf eine Seite verschieben, sodass dann beispielsweise hauptsächlich die Dodecamer Formation vorliegt (Wohlever/Baker/Sauer 2013). Generell wird die Protease Lon vor allem für den Abbau von irregulären, falsch gefalteten Proteinen eingesetzt (Chung/Goldberg 1981). Sie ist demnach die hauptsächliche Protease für die Qualitätskontrolle. Des Weiteren zählen die Transkriptionsaktivatoren SoxS und MarA zu den Substraten von Lon (Griffith/Shah/Wolf Jr 2004). Allerdings kann SoxS nicht abgebaut werden, solange eine Bindung mit einer Polymerase eingegangen wurde (Shah/Wolf Jr 2006). Mutationen im Gen *lon*, die zum Ausfall der Protease führen, sorgen dafür, dass die Substrate SoxS und MarA vermehrt vorhanden sind. Diese Transkriptionsaktivatoren induzieren dadurch vermehrt die Effluxpumpe AcrAB-TolC. Über den verstärkten Efflux z.B. von Antibiotika sorgen *lon*-Mutationen im Endeffekt für eine leichte Antibiotikaresistenz (Nicoloff/Andersson 2013). Ein weiteres Substrat stellt das Antitoxin CcdA des Antitoxin-Toxin Systems des F-Plasmids dar. Hierbei handelt es sich demnach, im Gegensatz zu dem chromosomal codierten MazEF Antitoxin-Toxin System (vgl. Kapitel 5.5), um ein plasmidcodiertes Antitoxin-Toxin System. Das Antitoxin CcdA wird unter der Anwesenheit von ATP durch die Protease Lon degradiert. Kleinere Derivate des Antitoxins, bei denen eine weniger komplexe Sekundärstruktur vorliegt, können, vergleichbar mit anderen kleinen, unstrukturierten Substraten der anderen bereits beschriebenen Proteasen, *in vitro* auch ohne ATP-Hydrolyse abgebaut werden. Ähnlich verhält sich die Proteolyse bei einem durch Hitzeeinwirkungen bereits teilweise denaturierten CcdA; auch hier wird das Antitoxin dann unabhängig von ATP durch die Protease Lon degradiert (Gottesman 2003; Van Melderen et al. 1996).

Die zweite Proteasefamilie, bei der die ATPase und die proteolytische Domäne, wie bei der Protease Lon, auch durch ein einzelnes Gen codiert werden, ist die ATP-abhängige Protease **FtsH**. Codiert wird sie durch das namentlich gleichlautende Gen *ftsH* (Ogura et al. 1991). Es handelt sich ebenfalls um eine cytoplasmatische Protease, jedoch ist sie N-terminal über zwei Transmembrandomänen mit der Cytoplasmamembran verankert. Der größere Bereich des Proteins befindet sich jedoch im Cytoplasma (Tomoyasu et al. 1993a). C-terminal befinden sich eine ATPase-Domäne (Tomoyasu et al. 1993b) und ein Bereich einer Zink-Metalloprotease (Tomoyasu et al. 1995). Die Kristallstruktur der ATPase-Domäne weist dabei Ähnlichkeiten zu den bereits beschriebenen ATPase-Modulen auf. Des Weiteren wird die Ausbildung eines Hexamers für die Protease FtsH beschrieben (Krzywda et al. 2002a;

Krzywda et al. 2002b). Bestimmten Aminosäuren der Protease FtsH konnten spezielle Funktionen zugeordnet werden. So sind drei konservierte Leucin-Reste (Leu-567, Leu-574, Leu-581) beispielsweise für die Aktivität der Protease entscheidend (Shotland et al. 2000) und auch die konservierten Aminosäuren Phenylalanin und Glycin an Position 228 bzw. 230 sind für die Funktion der Protease wichtig (Yamada-Inagawa et al. 2003). Die Protease FtsH kann außerdem einen Komplex mit HflKC, einer membrangebundenen regulatorischen Einheit, eingehen. Diese Einheit kann die Funktionalität der Protease beeinflussen und ihre Aktivität auch negativ verändern (Kihara/Akiyama/Ito 1996) bzw. die Substratspezifität verstärkt zu den löslichen Proteinen verschieben (Gottesman 2003). Die Protease FtsH ist generell in der Lage sowohl lösliche, im Cytoplasma befindliche, als auch membrangebundene Proteine abzubauen (Gottesman 2003; Kihara/Akiyama/Ito 1999). Typische Substrate sind beispielsweise der Hitzeschock-Sigmafaktor σ^{32} (Herman et al. 1995; Tomoyasu et al. 1995) und, vergleichbar mit dem Substrat der Protease ClpXP, SsrA-markierte Proteine (Herman et al. 1998). Zu den membrangebundenen Substraten der Protease FtsH zählt SecY, eine Untereinheit der membranständigen Translokase SecYEG (Kihara/Akiyama/Ito 1995).

3.6.1 Aufbau und Funktion des ClpAP-Komplexes

Der Proteasekomplex ClpAP beschreibt die erste beschriebene Protease, die sich aus zwei Komponenten, jeweils durch zwei verschiedene Gene codiert, zusammensetzt: Die ATPase ClpA (vgl. Kapitel 3.5) und die proteolytische Domäne ClpP. Dabei weist sie eine große Ähnlichkeit mit der Protease ClpXP, die zur gleichen Familie zählt, auf (vgl. Kapitel 3.6). Nur die ATPase Einheit unterscheidet sich dabei, während die proteolytische Domäne, eine Serinprotease, dieselbe bleibt. Wie bereits in Kapitel 3.5 beschrieben, lagern sich sechs ClpA Monomere zu einem Hexamer zusammen (Kessel et al. 1995). Intermediär wird dabei zunächst ein Tetramer ausgebildet, welches kurzfristig akkumuliert und damit die Hexamerbildung begünstigt (Kress/Mutschler/Weber-Ban 2007). Die proteolytische Domäne ClpP hingegen lagert sich zu einem Tetradecamer zusammen. Die 14 Monomere bilden dabei zwei übereinanderliegende Ringe aus jeweils sieben Monomeren aus (vgl. Kapitel 3.6, ClpXP) (Flanagan et al. 1995). Über ein Erkennungsmotiv in ClpA von drei Aminosäuren an Position 617-619 (Isoleucin, Glycin und Leucin, IGL) im AAA+ ATPase Modul D2, der sogenannten ClpP *loop*, erfolgt die Interaktion von der ATPase mit der proteolytischen Domäne (vgl. Kapitel 5.1) (Guo et al. 2002b; Kim et al. 2001). Normalerweise wird dabei ein Komplex favorisiert, bei dem sich an beiden Enden des ClpP-Tetradecamers ein ClpA-Hexamer anlagert. Ein sogenannter 2:1 Komplex entsteht. Je nach Verhältnis von ClpP zu ClpA kann jedoch auch nur ein 1:1 Komplex ausgebildet werden (vgl. Abbildung 3.6–1) (Kessel et al. 1995). Generell wird für diese Komplexbildung die Hydrolyse von ATP benötigt (Maurizi et al. 1998; Seol et al. 1995). Des Weiteren wird die ATP-Hydrolyse auch für die Proteo-

lyse durch den Komplex ClpAP benötigt, wenn größere Substrate vorliegen und ClpA daher allein nicht ausreicht. Solange die Proteolyse aktiv ist, bleibt der Komplex dann auch bestehen (Singh/Guo/Maurizi 1999).

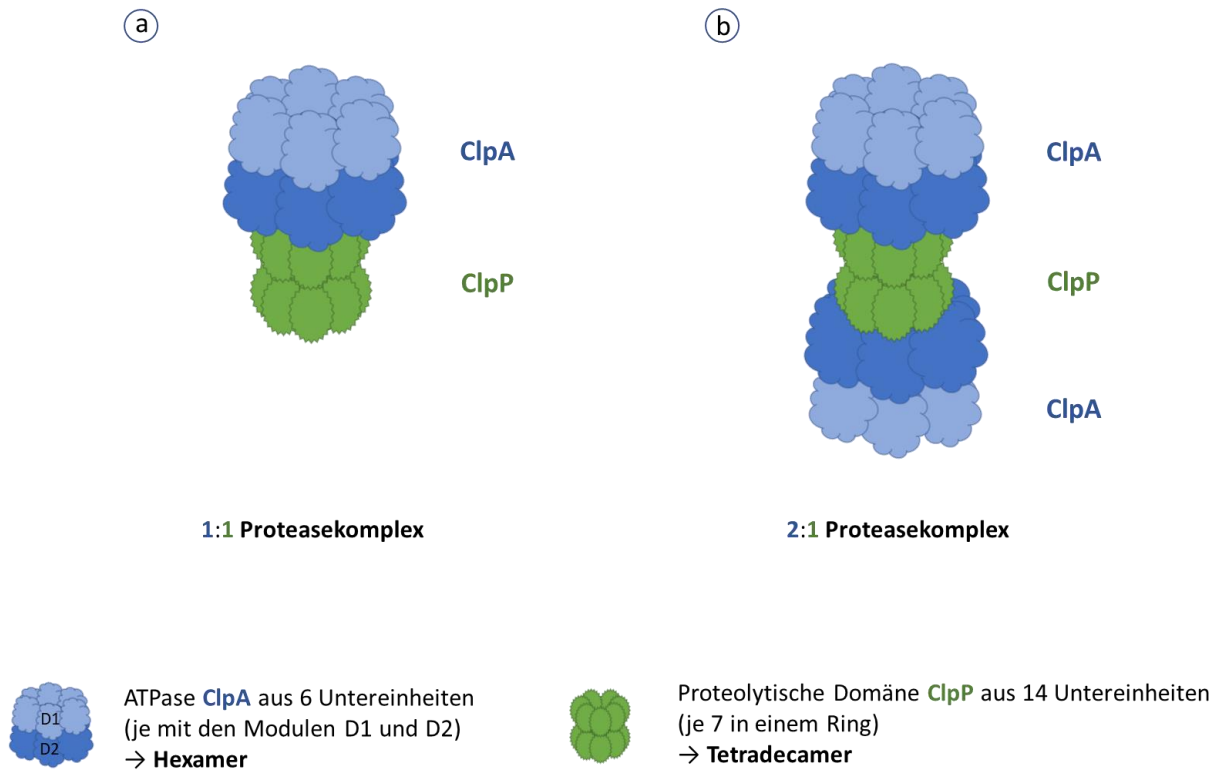


Abbildung 3.6–1: Schematische Darstellung des Proteasekomplexes ClpAP von *Escherichia coli* (modifiziert nach: Duran/Weaver/Lucius 2017; Guo et al. 2002b; Kessel et al. 1995; Singh/Guo/Maurizi 1999)

(a) Schematische Darstellung des ClpAP-Komplexes als 1:1 Proteasekomplex aus einem Hexamer, der ATPase ClpA, welche sich jeweils aus den beiden AAA+ ATPase Modulen D1 und D2 zusammensetzt (in Blau dargestellt), und einem Tetradecamer, der proteolytischen Domäne ClpP, bei der jeweils sieben Monomere einen Ring bilden (in Grün dargestellt). **(b)** Schematische Darstellung des ClpAP-Komplexes als 2:1 Proteasekomplex, bei dem sich je ein ClpA-Hexamer an beiden Enden der proteolytischen Domäne ClpP anlagert.

Strukturell gesehen weist der Komplex aus der ATPase ClpA, einem Hexamer, und der proteolytischen Domäne ClpP, einem Tetradecamer, wobei sich jeweils sieben Monomere übereinander ringförmig anordnen, eine gewisse Asymmetrie auf. Die sechs ClpP loops der ClpA-Monomere (IGL-Bindungsmotive) interagieren dabei mit hydrophoben Furchen der ClpP-Monomere des oberen Siebenerrings. Hierbei werden maximal fünf oder sechs der sieben möglichen Positionen besetzt, mindestens eine Furche bleibt dabei immer frei. Eine ähnliche Asymmetrie besteht auch bei dem verwandten Proteasekomplex ClpXP (vgl. Kapitel 3.6). Sowohl für ClpXP als auch für ClpAP wird ein Modell beschrieben, dass das ATPase-Hexamer im Uhrzeigersinn über der proteolytischen Domäne ClpP rotiert. Je nach dem ATP-Hydrolysestatus eines einzelnen Monomers liegt dieses über das IGL-

Bindungsmotiv mit einem ClpP-Monomer verknüpft vor oder kurzfristig ungebunden. Nach dem ungebundenen Zustand folgt die Bindung mit dem im Uhrzeigersinn nächstfolgenden ClpP-Monomer (Lopez et al. 2020; Ripstein et al. 2020). In *in-vitro* Versuchen wurde allerdings gezeigt, dass diese Rotation nicht zwingend für die Proteaseaktivität benötigt wird. Ein ClpA-Monomer wurde an einem ClpP-Monomer fixiert. In diesem Modelkomplex liefen die Entfaltung des Substrates, die Translokation und auch der Abbau des Substrates vollständig ab. Im Vergleich zur Kontrolle jedoch unwesentlich langsamer. Es wurde darauf geschlossen, dass für die Enzymaktivität keine Rotation benötigt wird, die Flexibilität in der Bewegung der Struktur jedoch für eine optimale Funktion wichtig sei (Kim et al. 2020).

Wie bereits in Kapitel 3.5 zur ATPase ClpA beschrieben, führen die beiden Module D1 und D2 von ClpA jeweils ihre eigene spezielle Aufgabe aus. Dies ist auch im Proteasekomplex ClpAP der Fall. Die ATP-Hydrolyse in beiden Modulen wird für ein effektives Entfalten des Substrates und den anschließenden Transport in die proteolytische Domäne benötigt. Dabei arbeitet das Modul D1 langsamer als das Modul D2. Bei einem Ausfall der D1-Domäne bzw. der dortigen ATP-Hydrolyse ist jedoch das Entfalten des Substrates bereits teilweise gestört. Vor allem die Translokation wird daraufhin regelmäßig unterbrochen, sodass die Protease ClpAP dann minutenlang innehält. Bei niedrigen ATP-Konzentrationen besteht dann die Gefahr, dass das Substrat in entgegengesetzter Richtung wieder aus dem Enzymkomplex gelangt. Dementsprechend dient die ClpA-Domäne D1 als regulatorische Einheit, um den Hauptmotor des Komplexes in seiner normalen Funktion zu unterstützen und um eine ununterbrochene Translokation zu begünstigen (Kotamarthi/Sauer/Baker 2020). Bei einem Ausfall der D2-Domäne, sodass dort keine ATP-Hydrolyse mehr stattfindet, wird der Abbau der Substrate vergleichbar stark minimiert, wie bei einem Totalausfall der ATPase ClpA, bei dem in beiden Domänen D1 und D2 keine ATP-Hydrolyse mehr abläuft. Dies verdeutlicht, dass es sich bei der D2-Domäne um den Hauptmotor des Komplexes handelt. Weitere *in-vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass jedoch drei der sechs Untereinheiten von D2 ausreichen, um einen Abbau der Substrate zu ermöglichen, auch wenn dieser dann deutlich verlangsamt abläuft. Sind dann auch drei der D1-Untereinheiten defekt, ist dabei die Lage dieser im Hexamer nicht ausschlaggebend. Es besteht also kein Unterschied, ob drei ClpA Monomere, im Wechsel zu funktionierenden, komplett ausfallen oder ob abwechselnd bei drei Monomeren die D1-Domänen defekt sind und bei den anderen dreien dann die D2-Domänen ausfallen (Zuromski/Sauer/Baker 2020).

Über ein Adaptermolekül kann des Weiteren die Substratspezifität des Proteasekomplexes ClpAP zusätzlich beeinflusst werden. Dieser Spezifitätsfaktor ClpS wird durch das gleichnamige Gen *clpS* codiert, welches sich *upstream* im Operon mit *clpA* befindet (vgl. Abbildung 5.2–1) (Dogan et al.

2002). ClpS kann an die N-terminale Domäne von ClpA binden und dort als Spezifitätsadapter wirken, indem die ClpA eigene Substraterkennung durch die Adapterbindung geblockt wird (Guo et al. 2002a) und möglicherweise durch eine Konformationsänderung der N-Domänen des ClpA-Hexamers eine veränderte Bindungsstelle, welche die Erkennung für andere Substrate verbessert, entsteht (Zeth et al. 2002). Beispielsweise wird der Abbau von SsrA-markierten Substraten durch den Spezifitätsadapter ClpS inhibiert und die Substratspezifität in die Richtung sogenannter *N-end rule* Proteine verschoben, sodass der Abbau dieser Substrate dadurch nun vermehrt abläuft als ohne gebundenes ClpS (Dougan et al. 2002; Schmidt et al. 2009; Wang/Sauer/Baker 2007). Die Aminosäuren Phenylalanin, Leucin, Tryptophan, Tyrosin, Arginin bzw. Lysin N-terminal eines Proteins markieren dieses dabei für den *N-end rule* Abbauweg (Tobias et al. 1991).

Generell zeigt der Proteasekomplex ClpAP besonders in der späten exponentiellen und in der frühen stationären Wachstumsphase eine erhöhte Aktivität, bedingt durch die erhöhte Expression von *clpA* in dieser Phase (Katayama et al. 1990).

4 Zielsetzung und Problemstellung der Arbeit

Die Grundlage dieser Arbeit stellte die in Kapitel 3.4 beschriebene *in-vitro* Selektion hoch fluorochinolonresistenter *Escherichia coli* Mutanten dar. Die daraus hervorgegangenen Selektionsmutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa wurden neben der phänotypischen Charakterisierung bereits anhand einzelner Resistenzmutationen in den bekannten Zielgenen molekulargenetisch analysiert (Bagel et al. 1999; Heisig/Tschorny 1994). Auch hinsichtlich weiterer gängiger Resistenzmechanismen gegenüber den Fluorchinolonen, wie einer reduzierten Wirkstoffakkumulation in der Bakterienzelle (Arntjen 2011) als auch bezüglich einer Plasmid-vermittelten FQ-Resistenz (Emrich 2011; Sfeir 2018), wurden diese Selektionsmutanten untersucht. Erst die Sequenzierung der Genome der konsekutiven Mehrschrittmutanten ermöglichte die Identifikation weiterer, bislang im Zusammenhang mit FQ-Resistenz nicht bekannter Mutationen. Neben zwei Mutationen in der Mutante *E. coli* MIII (vgl. Kapitel 3.4) wurde in der Selektionsmutante *E. coli* MIVa zusätzlich eine Mutation in dem Gen *clpA* identifiziert (Heisig, A., Heisig, P., Manuskript in Vorbereitung).

Zum Ziel dieser Arbeit wurde demnach, diese neuartige potenzielle Zielstruktur für die Entwicklung neuartiger Antibiotika zu charakterisieren und ihre Rolle bei der Resistenzentwicklung zu analysieren. Dazu galt es zunächst diese *clpA*-Mutation sowohl genotypisch als auch phänotypisch für den betroffenen Bakterienstamm zu untersuchen. Dafür sollte zu Beginn ein Komplementationsexperiment etabliert werden: Die Selektionsmutante *E. coli* MIVa sollte mit einem Plasmid, welches das Wildtypgen *clpA* trägt, transformiert werden. Des Weiteren sollten mit dem CRISPR/*Cas9*-System verschiedene genomische *clpA*-Mutanten konstruiert werden, sodass der Effekt der *clpA*-Mutation sowohl allein als auch im Zusammenhang mit weiteren Mutationen, die beispielsweise im Zusammenhang mit FQ-Resistenz stehen, betrachtet werden kann. Dabei galt es, das angewandte CRISPR/*Cas9*-System für den Einsatz mit den verwendeten Stämmen zu optimieren und die Anwendung anschließend zu etablieren. Für die Charakterisierung der *clpA*-Mutation sollte des Weiteren ein *in-vivo* Funktionstest von ClpA etabliert werden. Diesbezüglich galt es, ein geeignetes Testsystem zu finden und auch hier die Anwendung in Bezug auf die eingesetzten Stämme zu optimieren.

Darüber hinaus sollte geprüft werden, welche Vorteile die *clpA*-Mutation im Zusammenhang mit Antibiotikaresistenz bzw. in hoch fluorochinolonresistenten Bakterienstämmen bringen könnte. Diesbezüglich sollten die Auswirkungen der *clpA*-Mutation anhand von drei verschiedenen Mechanismen bzw. Systemen analysiert werden. Sowohl die Auswirkungen auf das MazEF Antitoxin-Toxin System, die Effekte im Zusammenhang mit ROS, als auch die Auswirkungen auf den Superspiralisierungsgrad der DNA der Bakterienzelle sollten ermittelt werden.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der *clpA*-Mutation der Mutante *E. coli* MIVa

Ausgehend von einem fluorchinolonempfindlichen Humanisolat (WT) war durch ein *in-vitro* Selektionsexperiment die Entwicklung hoch fluorchinolonresistenter Mutanten simuliert worden (Heisig/Tschorny 1994). Daraus ist auch die Mutante *E. coli* MIVa hervorgegangen. Wie bereits in Kapitel 3.4 beschrieben, wurde in dieser Mutante neben den Targetmutationen in *gyrA* und *parC*, sowie der Deletion in *marR*, nach Genomsequenzierung eine bislang im Zusammenhang mit Fluorchinolonresistenz nicht bekannte Mutation identifiziert. Weitere hierdurch entdeckte Mutationen waren auch in der direkten Vorgängermutante *E. coli* MIII zu finden (Heisig, A., Heisig, P., Manuskript in Vorbereitung).

Bei der Mutante *E. coli* MIVa fand sich im Gen *clpA* die Deletion eines Adeninnukleotids an Position 1702 des 2277 bp großen Gens. Diese Deletion führt durch die Verschiebung des Leserahmens (*frameshift*) in der Mutante ein vorzeitiges Stop-Codon „TGA“ an Position 1738 bis 1740 ein. Dadurch ist das Protein ClpA in der Mutante *E. coli* MIVa mit 579 Aminosäuren deutlich verkürzt zu der Wildtyp-Variante von 758 Aminosäuren. Das Gen *clpA* codiert für die ATPase ClpA (vgl. Kapitel 3.5). Zusammen mit der proteolytischen Domäne ClpP katalysiert dieser Proteasekomplex den Abbau verschiedenster, zum Teil für den Abbau markierter, Proteine (vgl. Kapitel 3.5 und 3.6.1). Für die Ausbildung dieses Proteasekomplexes ist in *Escherichia coli* ein sogenanntes IGL-Bindungsmotiv des Proteins ClpA erforderlich. Dieses Erkennungsmotiv beschreibt die Aminosäuren Isoleucin, Glycin und Leucin (IGL) an Position 617 bis 619 (Kim et al. 2001). Bei dem verkürzten Protein ClpA (579 Aminosäuren) der Mutante *E. coli* MIVa liegt dieser Erkennungsbereich außerhalb der codierenden Sequenz und ist außerdem nicht mehr *in frame*. Ein IGL-Bindungsmotiv ist demnach in der Mutante nicht vorhanden.

In der nachfolgenden Abbildung 5.1–1 ist die genotypische Charakterisierung des Gens *clpA* der beiden Varianten (Wildtyp vs. Mutante) noch einmal bildlich zusammengefasst, indem die Unterschiede schematisch gegenübergestellt sind.

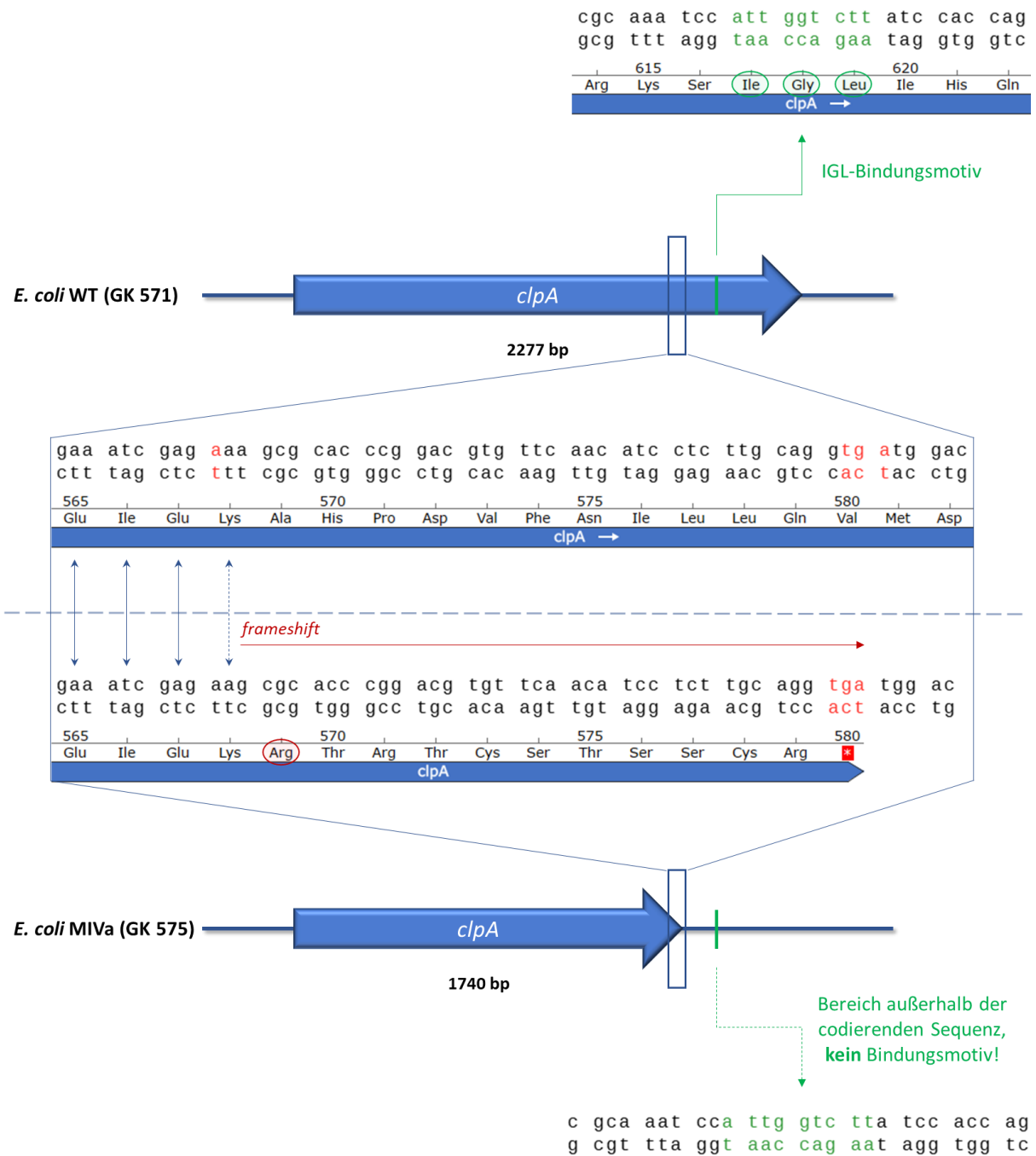


Abbildung 5.1–1: Schematische Darstellung des Gens *clpA* von *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* MIVa

Im oberen Teil der Abbildung (oberhalb der gestrichelten Linie) ist das 2277 bp große Gen *clpA* in seiner Wildtypform schematisiert. Ein entscheidender Sequenzabschnitt von etwa 50 bp wurde dabei vergrößert dargestellt, sodass die Nukleotidabfolge ersichtlich wird. Zusätzlich ist in diesem Bereich die übersetzte Aminosäuresequenz im 3-Buchstaben-Code aufgezeigt. Die rot gefärbten Nukleotide weisen zum einen auf die Mutation bei *E. coli* MIVa hin (Deletion eines Adeninnukleotids) und zum anderen auf die Position des vorzeitigen Stop-Codons „TGA“ durch die Verschiebung des Leserahmens (frameshift) in der Mutante. Unterhalb der gestrichelten Linie ist dieser Sequenzbereich entsprechend für die Mutante *E. coli* MIVa dargestellt. Durch die Deletion und den damit verursachten frameshift (durch den roten Pfeil symbolisiert; senkrechte blaue Pfeile zeigen noch übereinstimmende Aminosäuren, ab dem rot markierten Arginin ergibt sich eine veränderte Aminosäuresequenz) liegt ein mit 1740 bp bzw. 579 Aminosäuren verkürztes Gen *clpA* bzw. Protein vor. Downstream dieses Sequenzabschnittes wurde bei *E. coli* WT ein weiterer Bereich, der in Grün markiert wurde, vergrößert. Gezeigt wird das IGL-Bindungsmotiv bestehend aus den Aminosäuren Isoleucin, Glycin und Leucin an Position 617-619 für die Komplexbildung mit der Protease ClpP. Bei *E. coli* MIVa liegt dieser Bereich außerhalb der codierenden Sequenz und ist außerdem nicht mehr in frame. Somit stellt dieser Bereich bei *E. coli* MIVa kein Bindungsmotiv dar. Die Abbildung wurde zum Teil mithilfe der Software SnapGene (Version 6.2.1) erstellt.

Ergebnisse

Der Wegfall des C-terminalen Proteinbereichs von ClpA in der Mutante *E. coli* MIVa hat zur Folge, dass der für die ClpP-Interaktion essenzielle Bereich von ClpA fehlt, was zum Verlust der Fähigkeit zur Komplexbildung mit ClpP führen würde. Zur Verifikation dieser Vermutung wurde ein *in-vivo* Funktionstest von ClpA etabliert (vgl. Kapitel 8.2.1.5). Dazu wurde die Mutante *E. coli* MIVa (GK 575), sowie im Vergleich dazu die Vorläufermutante *E. coli* MIII (GK 574) ohne *clpA*-Mutation mit dem Plasmid pRepA(1-70)GFP transformiert (vgl. Kapitel 8.2.2.8). Das Plasmid wurde von Joel R. Hoskins aus der Arbeitsgruppe von Sue Wickner des National Institutes of Health (NCI), Laboratory of Molecular Biology, Maryland, USA, zur Verfügung gestellt (Hoskins/Kim/Wickner 2000). Ein für den Funktionstest essenzieller Sequenzabschnitt dieses Plasmids codiert für ein Fusionsprotein aus den N-terminalen 70 Aminosäuren des Replikationinitiatorproteins RepA und GFP (*green fluorescent protein*). Es wurde bereits gezeigt, dass diese 70 Aminosäuren von RepA als Erkennungssequenz ausschließlich für ClpA dienen und dass das Fusionsprotein spezifisch von der Protease ClpAP und nicht von einer anderen Protease, wie ClpXP, degradiert wird (Hoskins/Kim/Wickner 2000). Somit bedarf es der Funktionalität des Proteasekomplexes ClpAP für die Degradierung des Fusionsproteins. Im Umkehrschluss bewirkt ein Ausfall dieses Proteasekomplexes, z. B. durch die fehlende Interaktion zwischen ClpA und ClpP, die Existenz des Fusionsproteins und dementsprechend ist nach Anregung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm eine Fluoreszenz zu erkennen. Demnach war zu erwarten, dass in dem *in-vivo* Funktionstest bei Bakterienstämmen mit einer *clpA*-Mutation, welche zum Verlust der Fähigkeit zur Komplexbildung mit ClpP führt, eine Fluoreszenz zu detektieren ist. Die beiden zuvor erwähnten Transformanten wurden für den *in-vivo* Funktionstest auf Ampicillin- und L-Arabinose-haltigen LB-Agarplatten inkubiert und im Anschluss zur Anregung der Fluoreszenz von GFP unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm fotografiert.

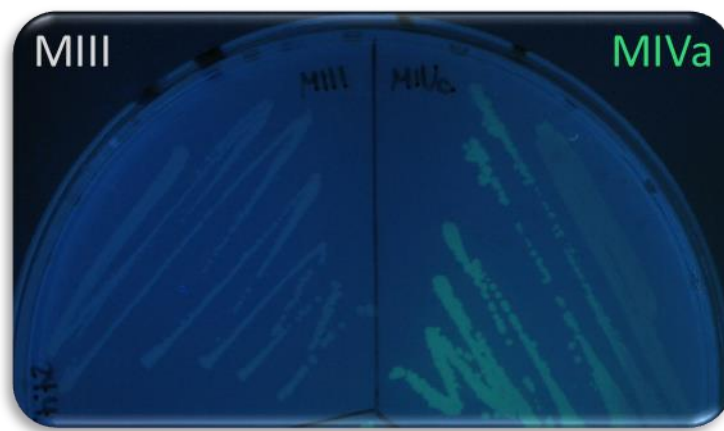


Abbildung 5.1–2: Vergleich der Fluoreszenzintensität der beiden getesteten Mutanten *E. coli* MIII pRepA(1-70)GFP (links) mit *clpA* in Wildtypform und *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP (rechts) mit der Mutation in *clpA*, die zum Funktionsausfall führt. Aufnahme unter UV-Licht (366 nm), nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C auf 2 % L-Arabinose.

Die Abbildung 5.1–2 zeigt den Vergleich der Fluoreszenzintensität der beiden getesteten Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa. Die Vermutung konnte demnach bestätigt werden. Sobald ClpA intakt war, erfolgte ein Abbau des GFP-Fusionsproteins durch die Protease ClpAP und die Bakterienkolonien fluoreszierten in diesem Bakterienstamm nicht (links: MIII). Aber wenn eine Mutation im Gen *clpA* zu einem Funktionsdefekt führte, sodass die Komplexbildung mit ClpP nicht bestand, fluoreszierten die Kolonien dieser Mutante grün (rechts: MIVa). Somit konnte mit dem *in-vivo* Funktionstest von ClpA gezeigt werden, dass bei der Mutante *E. coli* MIVa, bedingt durch die *clpA*-Mutation, kein ClpAP-Proteasekomplex gebildet werden kann. Demnach handelt es sich bei dieser *clpA*-Mutation im gewissen Maße um eine Knockout-Mutation, zumindest im Zuge des Abbaus größerer Proteine, die des Komplexes aus ClpA und ClpP bedürfen.

Neben der genotypischen Charakterisierung galt es im Folgenden zu klären, welche phänotypischen Besonderheiten, neben den Fluoreszenz-Unterschieden im *in-vivo* Funktionstest von ClpA, diese Mutation mit sich bringt.

5.2 Konstruktion verschiedener Plasmide zur Komplementation der *clpA*-Mutation

Zur Untersuchung der phänotypischen Besonderheiten der in dieser Arbeit analysierten *clpA*-Mutation wurde ein Komplementationsexperiment durchgeführt. Dafür wurde die Mutante *E. coli* MIVa mit einem Plasmid, welches das Wildtypgen *clpA* trägt, transformiert. Ein hierfür geeigneter Vektor sollte eine niedrige Kopienzahl aufweisen und mit dem Plasmid des *in-vivo* Funktionstests von ClpA kompatibel sein. Dieses Plasmid pRepA(1-70)GFP ist ein pBR322-Derivat mit dem *origin of replication* von pMB1, welches das Gen *bla* für eine Serin- β -Lactamase trägt. Somit kann das Antibiotikum Ampicillin zur Selektion verwendet werden.

Damit das Gen *clpA* nicht zu stark überexprimiert wird, sondern die Anzahl der Genkopien möglichst dem natürlichen Zustand der Bakterienzelle ähnelte, wurde als Komplementationsplasmid das *medium-copy* Plasmid pACYC184 ausgewählt, das den p15A *origin of replication* besitzt und mit etwa 10 Kopien pro Zelle vorliegt (Atlung/Christensen/Hansen 1999). Somit liegt zwischen pRepA(1-70)GFP und pACYC184 keine Inkompatibilität vor (Novick 1987). Weiterhin erlauben die Gene für Antibiotikaresistenz gegen Chloramphenicol (*cat*) und Tetracyclin (*tet*) des Plasmids pACYC184 (Chang/Cohen 1978) eine Selektion neben dem Plasmid pRepA(1-70)GFP.

Zunächst wurde daher der Vektor pACYC184 für die Konstruktion der Komplementationsplasmide vorbereitet. Durch die Behandlung mit der Restriktionsendonuklease *DraI*, welche zweimal den Vektor schneidet, wurde ein 339 bp kleines Fragment ausgeschnitten und das 3906 bp große Fragment

im Weiteren verwendet. Durch die Restriktion wurden glatte Enden (engl.: *blunt ends*) erzeugt, welche für die Ligation mit dem gewünschten Insert kompatibel waren (vgl. Kapitel 8.2.2.6.2). Zur Kontrolle wurde der mit *DraI* geschnittene Vektor selbst ligiert, sodass ein um 339 bp kleineres Plasmid mit einer Größe von 3906 bp entstand. Dieses Plasmid wurde pHPAS10-01.1 genannt und diente als Vergleichsplasmid bei der phänotypischen Charakterisierung. Somit konnten Unterschiede, die allein auf das „leere“ Kontrollplasmid zurückzuführen waren, von den Eigenschaften der komplementierten ATPase ClpA abgegrenzt werden. Das *cat* Gen war durch den Ausschnitt des 339 bp Fragmentes inaktiviert, sodass die Selektion durch Tetracyclin erfolgte.

Neben dem Kontrollplasmid pHPAS10-01.1 wurden insgesamt 3 Komplementationsplasmide konstruiert. Dazu wurden zunächst Fragmente amplifiziert, welche im Anschluss einzeln mit dem *DraI* geschnittenen Vektor ligiert wurden. Für die PCR des ersten Fragments wurden die beiden Primer *clpA_5_-674_BamHI_EcoWT* und *clpA_3_2500_BamHI_EcoWT* konzipiert (vgl. Tabelle 8.1–3). Beide Primer enthalten eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BamHI*, welche jedoch nicht verwendet wurde. Mit der Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase wurde in einer PCR-Reaktion mit dem Template *E. coli* WT (GK 571) ein 3176 bp großes Fragment amplifiziert. Diese Polymerase generiert *blunt ends*, welche mit dem *blunt* geschnittenen Vektor kompatibel sind. Das Fragment codiert für die Gene *clpS* und *clpA* mit einem potenziellen Promotorbereich *upstream* von *clpS* und einem putativen Terminatorbereich *downstream* von *clpA*. In dem Gen *clpS*, *upstream* von *clpA*, liegen drei Promotoren, wobei der von *clpA* am weitesten entfernt liegende eine Erkennungssequenz für σ^{70} aufweist (Gottesman/Clark/Maurizi 1990). *Downstream* von *clpA* weist das Operon einen Transkriptionsterminator auf, eine palindromische Sequenz aus jeweils 14 bp und einer 4 bp kurzen Schleife (Gottesman/Clark/Maurizi 1990). Die Abbildung 5.2–1 zeigt schematisch das amplifizierte Fragment. Nach der Ligation dieses 3176 bp großen Inserts mit dem *DraI* geschnittenen Vektor, ergab sich das 7077 bp große Komplementationsplasmid pHPAS10-01.2 (vgl. Tabelle 8.1–2). Auch bei den Komplementationsplasmiden erfolgte die Selektion ausschließlich über Tetracyclin.



Abbildung 5.2–1: Schematische Darstellung des Inserts des Plasmids pHPAS10-01.2 (nach: Dougan et al. 2002; Gottesman/Clark/Maurizi 1990)

Das Fragment enthält die Gene *clpS* und *clpA* sowie den gesamten potenziellen Promotorbereich, durch die Pfeile dargestellt, und den putativen Terminatorbereich, mit dem Kugelstab schematisiert. Verwendet wurden in der PCR die Primer *clpA_5_-674_BamHI_EcoWT* und *clpA_3_2500_BamHI_EcoWT*, um dieses 3176 bp große Fragment zu amplifizieren.

Für die Isolierung des zweiten Fragments wurde ein weiterer 5'-Primer entworfen: *clpA_5_-248_BamHI_EcoWT* (vgl. Tabelle 8.1–3). Zusammen mit dem 3'-Primer *clpA_3_2500_BamHI_EcoWT* des ersten Fragments, wurde in einer PCR-Reaktion mit der Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase und der Template-DNA von *E. coli* WT (GK 571) ein 2750 bp großes Amplifikat erzeugt. Im Unterschied zum ersten Fragment, beinhaltete das zweite nun ausschließlich die von Gottesman *et al.* beschriebenen Promotoren von *clpA* (Gottesman/Clark/Maurizi 1990). Der Translationsstart von ClpS inklusive des *clpS*-Promotorbereiches fehlten, sodass nur ClpA komplementiert wurde. Die Abbildung 5.2–2 veranschaulicht den Bereich des Amplifikats, welches als Insert genutzt wurde. Nach der Ligation dieses 2750 bp großen Inserts mit dem *DraI* geschnittenen Vektor, ergab sich das 6656 bp große Komplementationsplasmid pHPAS10-01.3 (vgl. Tabelle 8.1–2).

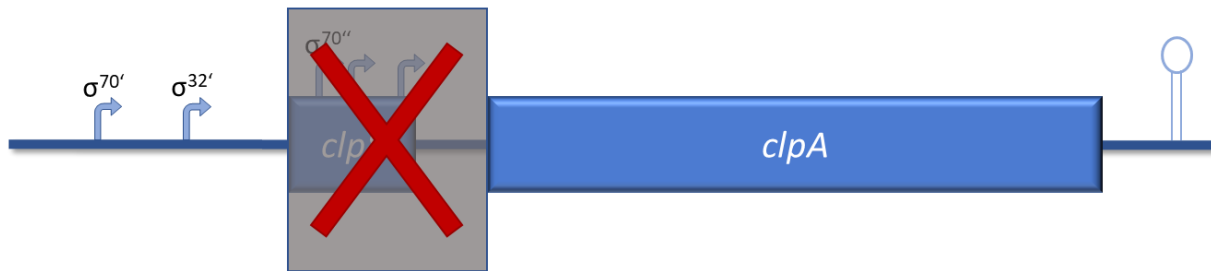


Abbildung 5.2–2: Schematische Darstellung des Inserts des Plasmids pHPAS10-01.3 (nach: Dougan *et al.* 2002; Gottesman/Clark/Maurizi 1990)

Das Fragment enthält das Gen *clpA* sowie den eigenen Promotorbereich, durch die Pfeile dargestellt, und den putativen Terminatorbereich, mit dem Kugelstab schematisiert. Verwendet wurden in der PCR die Primer *clpA_5_-248_BamHI_EcoWT* und *clpA_3_2500_BamHI_EcoWT*, um dieses 2750 bp große Fragment zu amplifizieren.

Das dritte Komplementationsplasmid ist aus dem Plasmid pHPAS10-01.2 hervorgegangen. Methodisch wurde die *Round-the-horn* Klonierung, eine Art inverse PCR angewendet (vgl. Kapitel 8.2.2.2.3). Dazu wurden die beiden Primer *clpA_5_1_EcoWT* und *clpA_3_-352_EcoWT* entwickelt, welche in entgegengesetzter Richtung zueinander binden (vgl. Tabelle 8.1–3). Der 3'-Primer ist am 5'-Ende phosphoryliert. Mit der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase und dem Plasmid pHPAS10-01.2 als Template wurde ein 6726 bp großes Fragment amplifiziert. Nach der Restriktion mit *DpnI* zur Entfernung des Ausgangsplasmids (Template) wurde das Fragment ligiert. Daraus ergab sich das 6726 bp große Komplementationsplasmid pHPAS10-01.4 (vgl. Tabelle 8.1–2). Durch die *Round-the-horn* Klonierung wurde ein 351 bp großer Bereich aus dem Plasmid pHPAS10-01.2 entfernt. Schematisch ist dies in der Abbildung 5.2–3 veranschaulicht. Die genetischen Informationen für *clpS* sind nicht mehr vorhanden und dementsprechend auch nicht die Promotoren von *clpA*, die im Gen *clpS* lokalisiert sind. Das DNA-Insert für die Komplementation wurde so modifiziert, dass das „ATG“ des *clpA* dem „ATG“ des *clpS* entspricht. Der potenzielle Promotorbereich *upstream* von *clpS* wurde *in frame upstream* von *clpA* kloniert (vgl. Abbildung 5.2–3).

Insert von pHPAS10-01.2



Deletion von 351 bp

Insert von pHPAS10-01.4



Abbildung 5.2–3: Schematische Darstellung des Inserts des Plasmids pHPAS10-01.4 (nach: Dougan et al. 2002; Gottesman/Clark/Maurizi 1990)

Das Fragment geht aus dem Insert des Plasmids pHPAS10-01.2 hervor. Der grau markierte Bereich mit dem roten Kreuz wurde deletiert (351 bp). Enthalten sind dementsprechend noch das Gen *clpA* mit der potenziellen Promotorsequenz upstream von *clpS*. Diese ist in frame zum Gen *clpA*. Auch der putative Terminatorbereich ist weiterhin enthalten.

Mit dem Kontrollplasmid pHPAS10-01.1 bzw. jeweils einem der drei Komplementationsplasmide pHPAS10-01.2, pHPAS10-01.3 und pHPAS10-01.4 wurde der Stamm *E. coli* JM109 (GK 623) transformiert. Für anschließende Untersuchungen wurden die Plasmide aus diesem Stamm isoliert und die Mutante *E. coli* MIVa (GK 575) sowie der Stamm *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP mit je einem der drei Komplementationsplasmide transformiert. Die phänotypische Untersuchung durch den *in-vivo* Funktionstest von ClpA und das Wachstumsverhalten im Vergleich mit den Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa sowie die Bestimmung der Aminoglykosid MHK-Werte erfolgte im Anschluss wie in den Kapiteln 5.4.1, 5.4.2 und 5.4.3.1 beschrieben.

5.3 Konstruktion genomischer *clpA*-Mutanten mit dem CRISPR/Cas9-System

5.3.1 Mutagenese von *E. coli* WT mit der *clpA*-Mutation aus *E. coli* MIVa

Zur Untersuchung des separaten Effekts der *clpA*-Mutation beispielsweise in Bezug auf die Antibiotikaresistenz bzw. die Fitness der betroffenen Bakterienstämme, war es erforderlich diese Mutation einzeln zu betrachten. Dafür wurde der Bakterienstamm *E. coli* WT (GK 571) gewählt, der zum einen als Ursprungstamm, aus dem die Mutanten selektiert worden sind, gilt und zum anderen keine wei-

teren Mutationen trägt, die das Verhalten des Stammes unter Antibiotikagabe beeinflussen könnten. Die in der Mutante *E. coli* MIVa (GK 575) vorkommende *clpA*-Mutation wurde mithilfe des CRISPR/*Cas9*-Systems (vgl. Kapitel 8.2.2.10) in das Genom des Stammes *E. coli* WT (GK 571) eingeführt.

5.3.1.1 Konstruktion von pKDsgRNA-HPclpA

Für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System (vgl. Kapitel 8.2.2.10) war zunächst die Konstruktion eines pKDsgRNA-Plasmids erforderlich. Wie in dem Kapitel 8.2.2.10.1 im Methoden- teil beschrieben, wurden dafür die 20 Nukleotide des *ack*-Gens des Plasmids pKDsgRNA-*ack* ausgetauscht. Da mit dem Plasmid pKDsgRNA-HPclpA das Gen *clpA* im Stamm *E. coli* WT adressiert werden sollte, wurden für die N₂₀-Sequenz 20 Nukleotide dieses Gens gewählt. Die Abbildung 5.3–1 veranschaulicht die Wahl der N₂₀-Sequenz (gelb hinterlegt) *upstream* der PAM-Stelle (grün hinterlegt) und der Position, an der im Genom die Mutation eingeführt werden sollte (rote Nukleotide). Dieses Adeninnukleotid in der Wildtypsequenz wurde mithilfe des CRISPR/*Cas9*-Systems im Genom deletiert, in der Plasmidsequenz war dieses Nukleotid jedoch noch enthalten.

```
CGTCTGATTG GTGCGCCTCC GGGATACGTT GGTTTTGATC AGGGCGGTTT GCTGACTGAT GCGGTCATCA AGCATCCACA TGCGGTGCTG CTGCTGGACG
GCAGACTAAC CACGCGGAGG CCCTATGCAA CAAAACACTAG TCCCGCCAAA CGACTGACTA CGCCAGTAGT TCGTAGGTGT ACGCCACGAC GACGACCTGC
AAATCGAGAA AGCGCACCGG CACGTGTTCA ACATCCTCTT GCAGGTGATG GACAACGGTA CACTGACCGA TAACAACGGA CGCAAAGCGG ACTTCCGTAA
TTTAGCTCTT TCGCGTGGGC TGCACAAGT TGTAGGAGAA CGTCCACTAC CTGTTGCCAT GTGACTGGCT ATTGTTGCCT GCGTTTCGCC TGAAGGCATT
CGTGGTGCTG GTGATGACCA CTAACGCGGG GGTACGTGAA ACCGAGCGCA AATCCATTGG TCTTATCCAC CAGGATAACA GCACCGATGC GATGGAAGAG
GCACCACGAC CACTACTGGT GATTGCGCCC CCATGCACTT TGGCTCGCGT TTAGGTAACC AGAATAGGTG GTCCTATTGT CGTGGCTACG CTACCTTCTC
```

Abbildung 5.3–1: Auswahl der N₂₀-Sequenz für das Plasmid pKDsgRNA-HPclpA

Gezeigt ist ein Ausschnitt der *clpA*-Sequenz des *E. coli* WT im FASTA-Format. Die gelb hinterlegten Nukleotide bilden die verwendete N₂₀-Sequenz. Die grün hinterlegte PAM-Stelle „CGG“ ist nicht mehr Teil der Plasmidsequenz. Das rot markierte Adeninnukleotid wird mithilfe des CRISPR/*Cas9*-Systems im Genom des *E. coli* WT deletiert, ist aber noch Teil der Plasmidsequenz des konstruierten pKDsgRNA-HPclpA.

Nachdem die N₂₀-Sequenz auf *off-target* Effekte überprüft wurde und im Cas-OFFinder (Bae/Park/Kim 2014; Molecular Genome Engineering Lab - Hanyang University Korea 2016) nur ein Treffer gefunden wurde, konnte mit der Konstruktion des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA begonnen werden.

Die 20 Nukleotide des *ack*-Gens in dem Plasmid pKDsgRNA-*ack* galt es durch die N₂₀-Sequenz 5′-CGAAATCGAGAAAGCGCACC-3′ aus *clpA* zu ersetzen. Methodisch wurde über eine Fusions-PCR ein SOEing durchgeführt (vgl. Kapitel 8.2.2.2). Zunächst wurden zwei SOEing-Primer konzipiert, die direkt an das 5′- bzw. 3′-Ende des N₂₀-Sequenzbereichs des pKDsgRNA-Plasmids binden und als nicht bindenden, jeweils überlappenden Bereich zueinander zusätzlich die 20 Nukleotide aus *clpA* enthal-

Ergebnisse

ten: Die Primer SOE_5_clpA_pKDsgRNA und SOE_3_pKDsgRNA_clpA (vgl. Tabelle 8.1–3). Außerdem wurden zwei universelle Außenprimer verwendet, die vollständig an das Plasmid pKDsgRNA-ack binden: pKDsgRNA_5_4952 und pKDsgRNA_3_5481 (vgl. Tabelle 8.1–3). Mit den Primern pKDsgRNA_5_4952 und SOE_3_pKDsgRNA_clpA wurde ein 404 bp großes Fragment 1 in einer PCR amplifiziert, mit den Primern SOE_5_clpA_pKDsgRNA und pKDsgRNA_3_5481 das 146 bp große Fragment 2. Als Template fungierte jeweils verdünnte, mit dem Monarch® Plasmid Miniprep Kit von der New England BioLabs® GmbH (NEB) isolierte pKDsgRNA-ack Plasmid-DNA (vgl. Kapitel 8.2.2.1.3). Die Fusions-PCR (vgl. Kapitel 8.2.2.2.2) wurde mit den beiden Außenprimern pKDsgRNA_5_4952 und pKDsgRNA_3_5481 durchgeführt. Es folgte eine weitere Gelelektrophorese, bei der das SOEing-Produkt mit einer Größe von 530 bp extrahiert und aufgereinigt wurde. Im Anschluss wurden sowohl der Gelextrakt des SOEing-Produktes, nach erneuter Konzentrationsabschätzung (vgl. Kapitel 8.2.2.5.1), als auch das Plasmid pKDsgRNA-ack mit den beiden Restriktionsendonukleasen *KasI* und *HindIII* behandelt (vgl. Kapitel 8.2.2.6.1). Das SOEing-Produkt wurde dadurch auf beiden Seiten etwas verkürzt, so dass sich eine Größe von 473 bp ergab. In dem Plasmid pKDsgRNA-ack gibt es für die beiden Enzyme jeweils nur eine Erkennungssequenz, sodass zwei Fragmente entstanden. Mit dem 6486 bp großen Fragment des Vektors und dem 473 bp großen Insert (= geschnittenes SOEing-Produkt) wurde die Ligation in einem molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor:Insert) durchgeführt. Mit dem resultierenden Plasmid pKDsgRNA-HPclpA wurde zunächst der Stamm *E. coli* DH5 α transformiert. Die Abbildung 5.3–2 veranschaulicht die Konstruktion des Inserts anhand der eingesetzten Oligonukleotide bzw. der Enzyme und zeigt die resultierende Sequenz des Inserts (farblich hinterlegt).

```
AGGCTTAAGT AGCACCTCG CAAGCTCGGT TGCAGCCGCA ATCGGGCAA TCCTGAATA TTCCTTTTGT CTCCGACCAT CAGGCACCTG AGTCGCTGTC
TCCGAATTCA TCGTGGGAGC GTTCGAGCCA ACGCCGGCGT TAGCCCGTTT AGCGACTTAT AAGGAAAACA GAGGCTGGTA GTCCGTGGAC TCAGCGACAG
pKDsgRNA_5_4952 100 bp
KasI
TTTTTCGTGA CATTCACTTC GCTGCGCTCA CGGCTCTGGC AGTGAATGGG GGTAAATGGC ACTACAGCGC CCTTTTATGG ATTCATGCAA GGAAACTACC
AAAAAGCACT GTAAGTCAAG CGACGCGAGT GCCGAGACCG TCACTTACCC CCATTTACCG TGATGTCGCG GGAAATACC TAAGTACGTT CCTTTGATGG
CATAATACAA GAAAAGCCCG TCACGGGCTT CTCAGGGCGT TTTATGGCGG GTCTGCTATG TGGTGCTATC TGACTTTTGG CTGTTACGCA GTTCTGCCCC
GTATTATGTT CTTTTGCGGC AGTGCCCGAA GAGTCCCGCA AAATACCGCC CAGACGATAC ACCACGATAG ACTGAAAAAC GACAAGTCGT CAAGGACGGG
TCTGATTTTC CAGTCTGACC ACTTCGGATT ATCCCGTGAC AGGTCATTC AACTGGCTAA TGCACCCAGT AAGGCAGCGG TATCATCAAC GGGGTCTGAC
AGACTAAAAG GTCAGACTGG TGAAGCCTAA TAGGGCACTG TCCAGTAACT CTGACCGATT ACGTGGGTCA TTCGGTCCGC ATAGTAGTTG CCCGAGACTG
GCTCAGTGA ACGAAAACCT ACGTTAAGGG ATTTGGTCA TGAGTATTAC AGCTTTCGCT AAGGATGATT TCTGGAATTC TTCCTATCA GTGATAGAGA
CGAGTCACCT TGCTTTGAG TGCAATTCCC TAAACCAGT ACTCTAATAG TCGAAAAGCA TTCCTACTAA AGACCTTAAG AAGGGATAGT CACTATCTCT
SOE_5_clpA_pKDsgRNA 100 bp
TTGACATCCC TATCAGTAT AGAGATACTG AGCAACGAAA TCGAGAAAGC GCACCGTTTT AGAGCTAGAA ATAGCAAGTT AAAATAAGGC TAGTCCGTTA
AAGTGAAGTT TTTACCGTG GCTCAGCCAC GAAAAAACT TCGAACCCGG GCTTGTGTTT GAGTAGAGTC TTCTCCTAGA CTTATCCGGG CAGCTGATG
SOE_3_pKDsgRNA_clpA 100 bp
HindIII
TCAACTTGAA AAAGTGGCAC CGAGTCGGTG CTTTTTTTGA AGCTTGGGCC CGAACAAAAA CTCATCTCAG AAGAGGATCT GAATAGCGCC GTCGACCATC
AGTTGAACTT TTTACCGTG GCTCAGCCAC GAAAAAACT TCGAACCCGG GCTTGTGTTT GAGTAGAGTC TTCTCCTAGA CTTATCCGGG CAGCTGATG
pKDsgRNA_3_5481 100 bp
ATCATCATCA TCATTGAGTT TAAACGGTCT CCAGCTTGGC TGTTTTGGCG GATGAGAGAA GATTTTCAGC CTGATACAGA TTAATCAGA ACGCAGAAGC
TAGTAGTAGT AGTAACTCAA ATTTGCCAGA GGTCGAACCG ACAAAAACCG CTACTCTCTT CTAAGAGTCG GACTATGCTT AATTAGTCTT TCGCTCTCTC
```

Abbildung 5.3–2: Konstruktion des Inserts für das Plasmid pKDsgRNA-HPclpA mittels SOEing

Sequenzausschnitt des konstruierten Plasmids pKDsgRNA-HPclpA. Eingezeichnet sind die vier Primer für die Fusions-PCR. Nachdem die Restriktionsendonukleasen *KasI* und *HindIII* nach erfolgreichem SOEing zugegeben wurden, entstand das grün markierte 473 bp große Insert. Die in Gelb hinterlegte N_{20} -Sequenz wurde in dieser Darstellung bereits in die von *clpA* ausgetauscht, daher binden die beiden SOEing-Primer zu 100 %. Der farblich nicht hinterlegte Bereich entspricht dem Ausschnitt des Vektors, welcher ebenfalls mit den beiden Enzymen behandelt wurde.

5.3.1.2 Überprüfung der N₂₀-Sequenz

Die Überprüfung des konstruierten Plasmids pKDsgRNA-HPclpA konnte nicht über eine Isolierung der Plasmid-DNA und anschließender Behandlung mit Restriktionsendonukleasen vollzogen werden, da aufgrund des Austausches von nur 20 Nukleotiden in der Sequenz weder eine abweichende Plasmidgröße resultierte noch sich ein anderes Schnittmuster im Agarosegel ergab. Zur schnellen und kostengünstigen Verifikation des korrekten Einbaus der neuen N₂₀-Sequenz in das pKDsgRNA-Plasmid wurde hierfür das Pyrosequencing[®], zum Sequenzieren eines kurzen bekannten Sequenzabschnittes, etabliert. Mit den entworfenen Primern pKDsgRNA_5_5255 und pDKsgRNA_3_5546_PSQ_Biotin (vgl. Tabelle 8.1–3) wurde zunächst das 292 bp große Fragment, welches die N₂₀-Sequenz sowie ca. 80 bp *upstream* bzw. ca. 190 bp *downstream* davon und einen biotinylierten 3'-Strang enthält, in einer PCR mit 45 Zyklen amplifiziert (vgl. Kapitel 8.2.2.9.2). Der zugehörige Sequenzierprimer pKDsgRNA_5_5316_PSQ_Seq wurde dabei so gewählt, dass dieser für sämtliche pKDsgRNA-Plasmide universell einsetzbar war, da dieser direkt *upstream* der N₂₀-Sequenz band. Der Software der Pyrosequencing[®]-Apparatur wurde lediglich die sogenannte *dispensation order* individuell vorgegeben (vgl. Kapitel 8.2.2.9.2). Für die Sequenzierung der N₂₀-Sequenz des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA lautete diese: 5'-GCGATCGAGAGCGCACGT-3'.

Die Abbildung 5.3–3 zeigt das zugehörige Pyrogramm des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA. Die N₂₀-Sequenz (5'-CGAAATCGAGAAAGCGCACCC-3') und der Übergang (5'-GTTTT-3') zu der restlichen sgRNA des ursprünglichen Plasmids pKDsgRNA-ack sind korrekt. Dementsprechend konnte das Plasmid pKDsgRNA-HPclpA aus dem Stamm *E. coli* DH5 α , in dem das Plasmid etabliert worden war, isoliert werden (vgl. Kapitel 8.2.2.1.3). Die isolierte Plasmid-DNA wurde im Anschluss für die Transformation des Bakterienstammes *E. coli* WT, der bereits aus einer vorangegangenen Transformation das Plasmid pCas9-CR4 trug, genutzt.

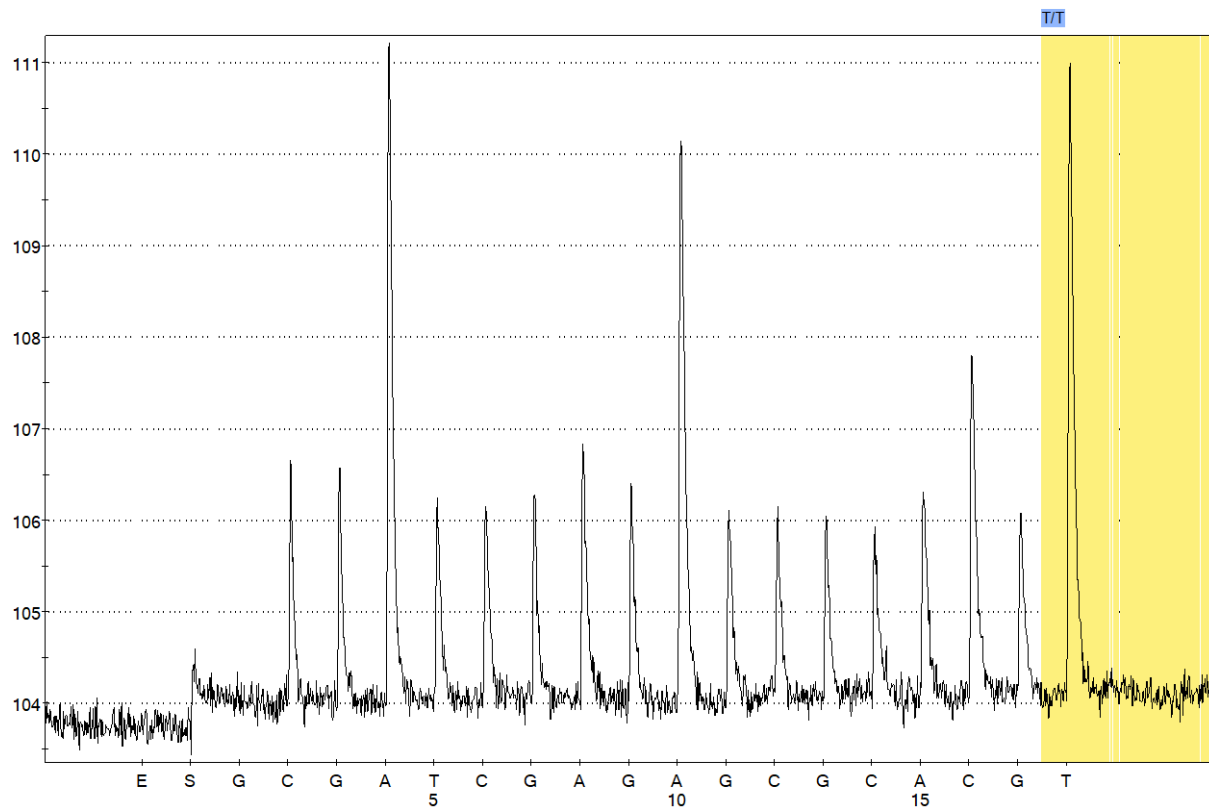


Abbildung 5.3–3: Pyrogramm des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA

Zuerst wurden der Enzymmix „E“ und der Substratmix „S“ von der Pyrosequencing®-Apparatur überprüft. Es folgte ein Nichteinbau des Guaninnukleotids als Kontrolle. Anhand der Höhe der Peaks kann proportional auf die Anzahl der eingebauten Nucleotide geschlossen werden. Die N₂₀-Sequenz lautet dementsprechend: 5'-CGAAATCGAGAAAGCGCACC-3'. Der Übergang zur restlichen sgRNA des ursprünglichen Plasmids mit 5'-GTTTT-3' entspricht der richtigen Sequenz.

5.3.1.3 Untersuchung der Mutanten auf das Vorliegen ausschließlich der gewünschten *clpA*-Mutation

Nachdem der Bakterienstamm *E. coli* WT erfolgreich mit den beiden Plasmiden pCas9-CR4 und pKDsgRNA-HPclpA transformiert worden war (vgl. Kapitel 8.2.2.10.1) und dieser damit für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/Cas9-System vorbereitet war, erfolgte in einer weiteren Elektroporation mit der Induktion des λ -Red-Systems durch L-Arabinose und der Expression von *cas9* und der sgRNA durch Anhydrotetracyclin die Übertragung der gewünschten *clpA*-Mutation durch das Oligonukleotid (vgl. Kapitel 8.2.2.10.2). Hierfür wurde das 81 nt lange Oligonukleotid *clpA_1702delA_noSCAR* genutzt (vgl. Tabelle 8.1–3), welches die *clpA*-Deletion trägt, wie sie in der Mutante *E. coli* MIVa (GK 575) vorkommt. Nachdem sämtliche Kontrollen überprüft wurden und dabei ein deutlicher Unterschied in der Anzahl der gewachsenen Kolonien auf den Platten mit bzw. ohne Anhydrotetracyclin zu erkennen waren, wurde von den Transformanden, bei denen bei der Elektroporation das Oligo hinzugefügt worden war, die chromosomale DNA mittels Koch-Methode isoliert (vgl. Kapitel 8.2.2.1.1). Für die Selektion auf die gewünschte *clpA*-Mutation wurde eine ARMS-PCR etabliert (vgl. Kapitel 8.2.2.2.4). Dazu wurden die beiden Primer *clpA_5_1462_EcoWT* und

clpA_3_1721_EcoMIVa_ARMS (vgl. Tabelle 8.1–3) verwendet. Nur bei der Mutante *E. coli* MIVa, die als Kontrollstamm fungierte, wurde hierbei ein 260 bp großes Fragment amplifiziert, wohingegen die PCR mit dem WT als Template kein Amplifikat lieferte. Innerhalb kürzester Zeit konnten somit viele potenzielle Mutanten auf die gewünschte *clpA*-Mutation gescreent werden. Diejenigen Klone, die mit der ARMS-PCR positiv auf die *clpA*-Mutation getestet wurden (vgl. Abbildung 10.5–1 im Anhang), wurden zur abschließenden Verifikation durch eine Sanger-Sequenzierung (vgl. Kapitel 8.2.2.9.1) bestätigt. Dazu wurde mit den Primern clpA_5_1462_EcoWT und clpA_3_2306_EcoWT (vgl. Tabelle 8.1–3) ein 844 bp großes Fragment amplifiziert, welches den Bereich der gewünschten Mutation und auch die Bereiche der Übergänge des Oligonukleotids umspannten. Zur Sequenzierung wurde der 5'-Primer dieser PCR verwendet (vgl. Kapitel 10.3.1 im Anhang).

Die Mutante #24 zeigte in der Sequenzierung die gewünschte Nukleotidabfolge. Für die nachfolgenden Experimente, wie der phänotypischen Untersuchung, wurde diese Mutante einem Plasmid Curing unterzogen (vgl. Kapitel 8.2.2.10.3), damit die beiden Plasmide nicht die phänotypischen Eigenschaften der Mutante beeinflussten. Nach dem Plasmid Curing erhielt die genomische *clpA*-Mutante den Namen *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 und zur langfristigen Lagerung wurde eine Kryokonservierung (vgl. Kapitel 8.2.1.1.3) durchgeführt (GK 4542).

5.3.2 Mutagenese von *E. coli* MIVa mit der *clpA*-Wildtypsequenz aus *E. coli* WT

Für die weitere Charakterisierung der *clpA*-Mutation wurde außerdem die Mutante *E. coli* MIVa (GK 575) gewählt, in der die *clpA*-Mutation ursprünglich vorkommt. Mithilfe des CRISPR/*Cas9*-Systems (vgl. Kapitel 8.2.2.10) sollte in dieser Mutante die Mutation eliminiert werden, sodass das Gen *clpA* wieder in seiner Wildtyp-Variante vorliegt. Die konstruierte Mutante würde dann genomisch ihrer Vorgängermutante *E. coli* MIII (GK 574) entsprechen. So kann die *clpA*-Mutation auch im Zusammenhang mit anderen Mutationen, beispielsweise Fluorchinolon-*target*-Mutationen in *gyrA*, betrachtet werden. Methodisch erfolgte die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System, allerdings wurden zwei Varianten getestet, welche in den folgenden Kapiteln näher beschrieben sind: Die direkte und die indirekte Mutagenese.

5.3.2.1 Direkte Mutagenese

5.3.2.1.1 Konstruktion von pKDsgRNA-HPclpA-MIVa

Für die direkte Mutagenese von *E. coli* MIVa wurde vergleichbar mit der Mutagenese von *E. coli* WT (vgl. Kapitel 5.3.1) zunächst das pKDsgRNA-Plasmid konstruiert. Im Unterschied zu dem Plasmid aus Kapitel 5.3.1.1 wurden für das Plasmid pKDsgRNA-HPclpA-MIVa hier für die N₂₀-Sequenz die 20 Nuk-

Ergebnisse

leotide des Gens *clpA* aus der Mutante *E. coli* MIVa gewählt, damit diese Mutante bei der genomischen Mutagenese adressiert werden konnte. Die PAM-Stelle wurde dieselbe wie bei der Mutagenese von *E. coli* WT genutzt. Die verwendete N₂₀-Sequenz für das Plasmid pKDsgRNA-HPclpA-MIVa lautete: 5'-ACGAAATCGAGAAGCGCACC-3'. Auch diese N₂₀-Sequenz wurde auf ihre *off-target* Effekte im Cas-OFFinder untersucht (Bae/Park/Kim 2014; Molecular Genome Engineering Lab - Hanyang University Korea 2016). Allerdings wurde hier kein Treffer erwartet, da das verwendete Referenzgenom in dem Cas-OFFinder nicht die Mutation wie die Mutante *E. coli* MIVa trug, die in der genomischen Mutagenese adressiert werden sollte. Jedoch konnte bei dem Ergebnis „kein Treffer“ davon ausgegangen werden, dass die N₂₀-Sequenz auch nicht unspezifisch an einer anderen Stelle binden konnte. Somit konnten diese 20 Nukleotide für die Konstruktion des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-MIVa genutzt werden. Für diese Konstruktion wurde methodisch kein SOEing mehr genutzt, sondern eine schnellere und effizientere Methode. Eine Art inverse PCR wurde mit der *Round-the-horn* Klonierung (vgl. Kapitel 8.2.2.2.3) angewendet. Dafür wurde zunächst ein Primer entwickelt, welcher am 5'-Ende aus den gewünschten 20 Nukleotiden der N₂₀-Sequenz bestand und dann einen zum pKDsgRNA-Plasmid bindenden Abschnitt von weiteren 23 Nukleotiden enthielt. Mit diesem Primer pKDsgRNA_clpA_MIVa_5_5336 und dem universell etablierten Primer PtetR_pKDsgRNA_3_5335 (vgl. Tabelle 8.1–3), welcher am 5-Ende phosphoryliert ist und von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather entwickelt wurde (Reisch/Prather 2017), wurde mit der Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase ein 6959 bp großes Fragment amplifiziert. Als Template diente die mit dem Monarch[®] Plasmid Miniprep Kit von der New England BioLabs[®] GmbH (NEB) frisch isolierte Plasmid-DNA von pKDsgRNA-ack (vgl. Kapitel 8.2.2.1.3). Nach der Konzentrationsbestimmung des Gelextraktes, welcher das mit *DpnI* behandelte PCR-Amplifikat enthielt (vgl. Kapitel 8.2.2.2.3), wurde das lineare Fragment mithilfe einer Ligationsreaktion zirkularisiert (vgl. Kapitel 8.2.2.6.2) und zunächst der Stamm *E. coli* DH5 α mit dem Plasmid transformiert. Die Abbildung 5.3–4 veranschaulicht die Konstruktion des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-MIVa mit den verwendeten Primern.

```
GCTCAGTGG ACGAAAATC ACGTTAAGG ATTTTGGTCA TGAGATTATC AGCTTTCGCT AAGGATGATT TCTGGAATC TTCCTATCA GTGATAGAGA  
CGAGTCACCT TGCTTTTGG TGCAATTCCC TAAAACCACT ACTCTAATAG TCGAAAGCGA TTCCTACTAA AGACCTTAAG AAGGGATAGT CACTATCTCT  
TTGACATCCC TATCAGTGAT AGAGATACTG AGCACCGAA ATCGAGAAGC GCACCGTTTT AGAGCTAGAA ATAGCAAGTT AAAATAAGGC TAGTCCGTTA  
AACTGTAGGG ATAGTCACTA TCTCTATGAC TCGTGTGCTT TAGCTCTTCG CGTGGCAAAA TCTCGATCTT TATCGTTCAA TTTTATTCGG ATCAGGCAAT  
TCAACTTGAA AAAGTGGCAC CGAGTCGGTG CTTTTTTTGA AGCTTGGGCC CGAACAAAA CTCATCTCAG AAGAGGATCT GAATAGCGCC GTCGACCATC  
AGTTGAACTT TTTACCGTG GCTCAGCCAC GAAAAAACT TCGAACCCGG GCTTGTTTTT GAGTAGAGTC TTCTCCTAGA CTTATCGCGG CAGCTGGTAG
```

Abbildung 5.3–4: Konstruktion des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-MIVa mittels Round-the-horn Klonierung

Sequenzausschnitt des konstruierten Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-MIVa. Eingezeichnet sind die beiden Primer für die Round-the-horn Klonierung: Der 3'-Primer PtetR_pKDsgRNA_3_5335, welcher am 5'-Ende phosphoryliert ist, und der 5'-Primer pKDsgRNA_clpA_MIVa_5_5336. Die in Gelb hinterlegte N₂₀-Sequenz wurde in dieser Darstellung bereits von ack des Ursprungsplasmids pKDsgRNA-ack in die von *clpA* (aus *E. coli* MIVa) ausgetauscht, daher bindet auch der 5'-Primer bereits zu 100 %.

5.3.2.1.2 Überprüfung der N₂₀-Sequenz

Zur Überprüfung des konstruierten Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-MIVa bzw. zur Verifikation des korrekten Einbaus der neuen N₂₀-Sequenz in das Plasmid wurde, wie auch in Kapitel 5.3.1.2 für das Plasmid pKDsgRNA-HPclpA beschrieben, das Pyrosequencing® (vgl. Kapitel 8.2.2.9.2) genutzt. Die der Software der Apparatur vorgegebene *dispensation order* lautete für die Sequenzierung der N₂₀-Sequenz des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-MIVa: 5'-ACGATCGAGAGCGCACGT-3'.

Die Abbildung 5.3–5 zeigt das zugehörige Pyrogramm des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-MIVa. Die N₂₀-Sequenz (5'-ACGAAATCGAGAAGCGCAC-3') und der Übergang (5'-GTTTT-3') zu der restlichen sgRNA des ursprünglichen Plasmids pKDsgRNA-ack sind korrekt. Dementsprechend konnte das Plasmid pKDsgRNA-HPclpA-MIVa aus dem Stamm *E. coli* DH5α, in dem das Plasmid etabliert worden war, isoliert werden (vgl. Kapitel 8.2.2.1.3). Die isolierte Plasmid-DNA wurde im Anschluss für die Transformation der Mutante *E. coli* MIVa, die bereits aus einer vorangegangenen Transformation das Plasmid pCas9-CR4 trug, genutzt.

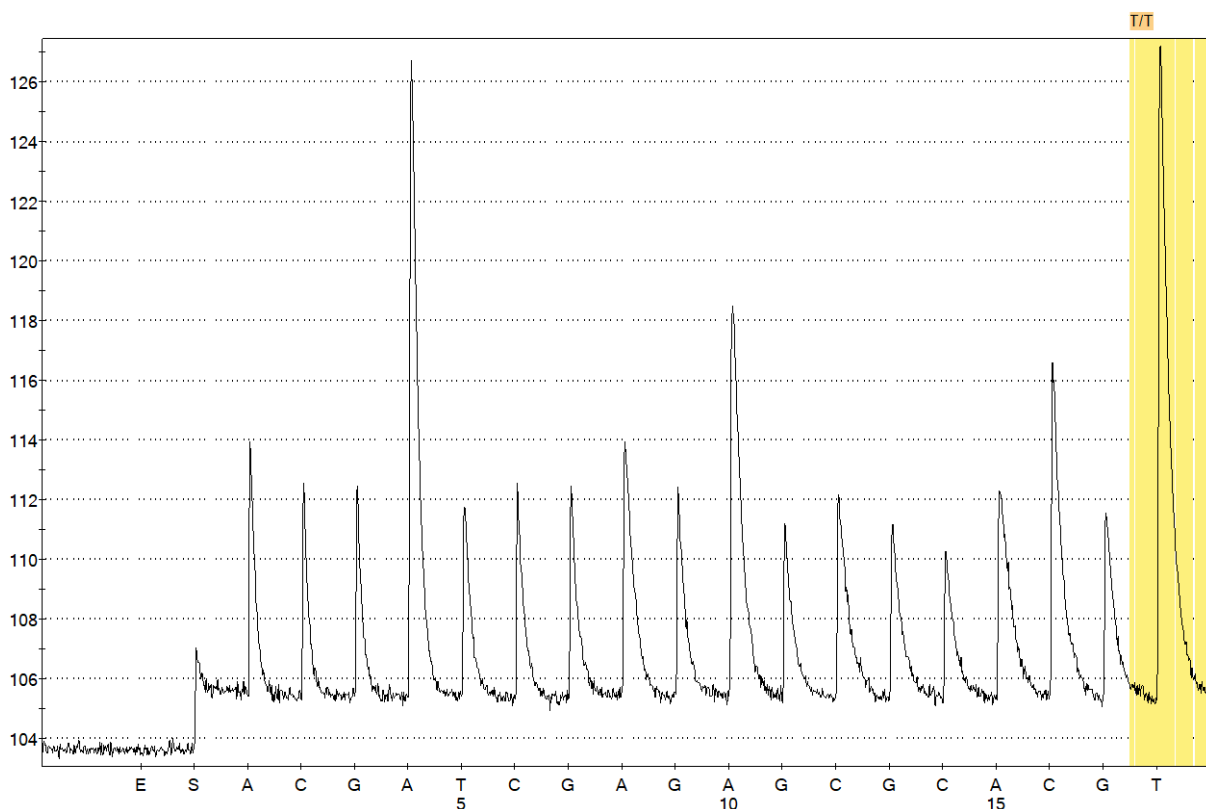


Abbildung 5.3–5: Pyrogramm des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-MIVa

Zuerst wurden der Enzymmix „E“ und der Substratmix „S“ von der Pyrosequencing®-Apparatur überprüft. Anhand der Höhe der Peaks der jeweiligen zugegebenen dNTPs kann proportional auf die Anzahl der eingebauten Nucleotide geschlossen werden. Die N₂₀-Sequenz lautet dementsprechend: 5'-ACGAAATCGAGAAGCGCAC-3'. Der Übergang zur restlichen sgRNA des ursprünglichen Plasmids mit 5'-GTTTT-3' entspricht der richtigen Sequenz.

5.3.2.1.3 Untersuchung der Mutanten auf das Vorliegen ausschließlich der gewünschten *clpA*-Mutation

Nachdem die Mutante *E. coli* MIVa durch die Transformation mit den beiden Plasmiden pCas9-CR4 und pKDsgRNA-HPclpA-MIVa für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System vorbereitet worden war, erfolgte nach Induktion des λ -Red-Systems mit L-Arabinose und der Expression von *cas9* und der sgRNA durch Anhydrotetracyclin die Übertragung der gewünschten *clpA*-Mutation, hier einer Insertion eines Adeninnukleotids, durch ein Oligonukleotid (vgl. Kapitel 8.2.2.10.2). Die Elektroporation wurde mit dem 82 nt langen Oligonukleotid clpA_1702insA_noSCAR (vgl. Tabelle 8.1–3) durchgeführt. Dieses Oligo entspricht der Wildtypform von *clpA*, in Bezug auf die Mutante *E. coli* MIVa bedeutet dies, dass eine Insertion vorliegt, sodass die *clpA*-Mutation aus *E. coli* MIVa eliminiert werden konnte. Für die Selektion auf die gewünschte *clpA*-Insertion wurde eine weitere ARMS-PCR etabliert (vgl. Kapitel 8.2.2.2.4). Hierfür wurden die beiden Primer clpA_5_1462_EcoWT und clpA_3_1722_EcoWT_ARMS entworfen (vgl. Tabelle 8.1–3). Eine PCR mit diesen Primern lieferte nur bei dem Wildtyp *E. coli* WT (GK 571) ein 261 bp großes Amplifikat und bei der Mutante *E. coli* MIVa (GK 575) wurde kein Fragment amplifiziert. Diese beiden Stämme wurden zur Kontrolle der ARMS-PCR jeweils mit überprüft. Diejenigen Klone, die mit der ARMS-PCR positiv auf die *clpA*-Insertion getestet wurden, wurden abschließend durch eine Sanger-Sequenzierung (vgl. Kapitel 8.2.2.9.1) überprüft. Mithilfe der ARMS-PCR konnten fünf Klone, die positiv auf die *clpA*-Insertion anschlugen, ermittelt werden: Mutante #14, #21, #58, #146 und #178 (vgl. Abbildung 10.5–2, Abbildung 10.5–3 bzw. Abbildung 10.5–4 im Anhang). Die Sanger-Sequenzierung ergab jedoch, dass zusätzlich, neben der gewünschten Insertion, weitere unerwünschte Mutationen bei allen fünf Klonen aufgetreten waren (vgl. auch Kapitel 10.3.2.1 im Anhang). Die Abbildung 5.3–6 zeigt als Überblick einen Ausschnitt der Sequenzierungsergebnisse und in dem folgenden Kapitel 5.3.2.1.4 werden diese fünf Mutanten näher genotypisch charakterisiert.

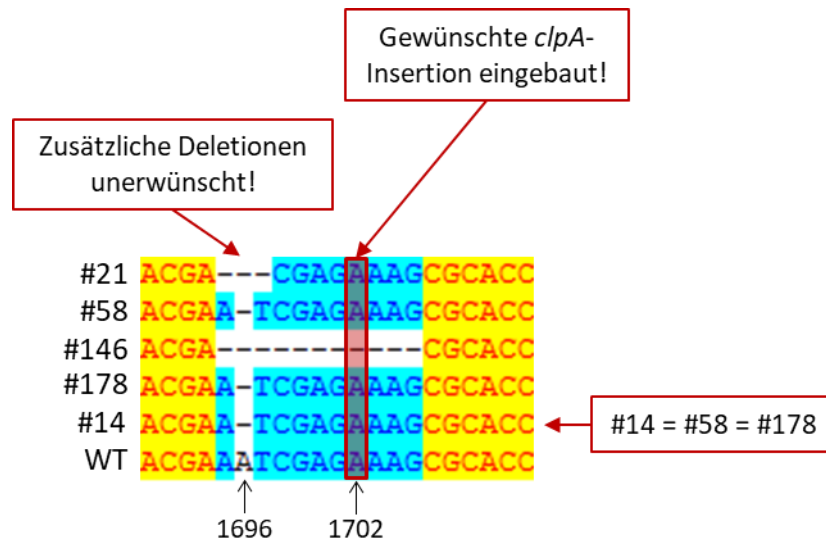


Abbildung 5.3–6: Ausschnitt der Sequenzierungsergebnisse der direkten Mutagenese von *E. coli* MIVa

Dargestellt ist ein Ausschnitt der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der fünf potenziellen *clpA*-Mutanten (#14, #21, #58, #146, #178) im Alignment mit dem Wildtypstamm (WT). Die gewünschte *clpA*-Insertion wurde mit Ausnahme der Mutante #146 erfolgreich in das Genom eingebaut. Jedoch sind bei allen fünf Klonen zusätzliche unerwünschte Mutationen aufgetreten, sodass diese fünf Mutanten sich weiterhin vom Wildtyp unterscheiden. Die Mutanten #14, #58 und #178 sind identisch. Mit der Mutante #14 wurde in der Variante der indirekten Mutagenese (vgl. Kapitel 5.3.2.2) weitergearbeitet. Zur besseren Übersicht sind die Positionen der Nukleotide 1696 und 1702 bei *E. coli* WT markiert.

5.3.2.1.4 Genotypische Charakterisierung der *clpA*-Mutanten

Die Sanger-Sequenzierung ergab, dass die fünf *clpA*-Mutanten alle zusätzliche unerwünschte Mutationen aufwiesen. Die drei Mutanten #14, #58 und #178 sind dabei identisch: *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA). Die Insertion war die gewünschte Mutation, die zusätzliche Deletion eines Adeninnukleotids an Position 1696 jedoch nicht. Durch diese zusätzliche Deletion kommt es zu einem *frameshift* und zu einem vorzeitigen Stop-Codon an derselben Stelle wie in der Mutante *E. coli* MIVa (GK 575). Die Mutante #21 wies neben der gewünschten Insertion eine größere Deletion auf: *E. coli* MIVa *clpA* (1695_1697delAAT, 1701_1702insA). Auf der Aminosäureebene wurden dadurch einmal Glutaminsäure und Isoleucin durch einmal Asparaginsäure ersetzt (vgl. Abbildung 5.3–7). Die Glutaminsäure ist dabei ein Bestandteil des Walker-B Motivs, welches generell entscheidend für die ATPase Aktivität ist. Die Glutaminsäure speziell aktiviert Wasser für die Hydrolysereaktion (Hanson/Whiteheart 2005; Iyer et al. 2004).

			Deletion				
WT	GAC	GAA	ATC	GAG	AAA	GCG	
#21	GAC	GAC		GAG	AAA	GCG	
WT	Asp	Glu	Ile	Glu	Lys	Ala	
#21	Asp	Asp		Glu	Lys	Ala	

Abbildung 5.3–7: Schematische Darstellung der Deletion der *clpA*-Mutante #21

Die oberen zwei Zeilen zeigen die Veränderungen in der Nukleotidabfolge zwischen dem Wildtyp und der *clpA*-Mutante #21. In den unteren beiden Zeilen sind die Veränderungen zwischen den beiden Stämmen in der Aminosäuresequenz dargestellt.

Zur Überprüfung ob ClpA in dieser Mutante #21 durch diese Deletion noch funktionstüchtig ist, wurde zur phänotypischen Untersuchung der *in-vivo* Funktionstest von ClpA durchgeführt (vgl. Kapitel 8.2.1.5). Die Mutante #21 wurde mit dem Plasmid pRepA(1-70)GFP transformiert und mit den Mutanten *E. coli* MIII (GK 574) und *E. coli* MIVa (GK 575), die auch mit dem Plasmid transformiert wurden, als Referenz auf LB-Agarplatten mit einem Zusatz von L-Arabinose ausgestrichen und nach 48 h Inkubationszeit unter UV-Licht fotografiert. Wie in Abbildung 5.3–8 zu erkennen ist, fluoresziert die *clpA*-Mutante #21 wie die Positivkontrolle *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP. Die Negativkontrolle *E. coli* MIII pRepA(1-70)GFP zeigt keine Fluoreszenz. Damit wurde gezeigt, dass ClpA in der *clpA*-Mutante #21 durch die *clpA*-Deletion nicht funktionstüchtig ist.

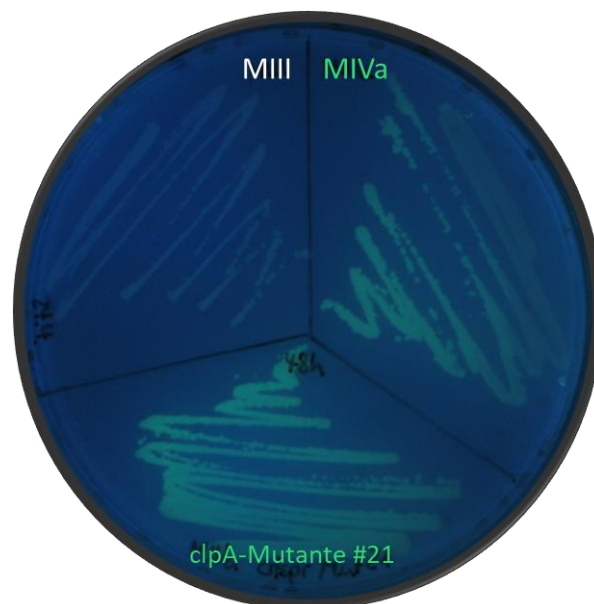


Abbildung 5.3–8: *In-vivo* Funktionstest von ClpA mit der *clpA*-Mutante #21

Die drei Mutanten *E. coli* MIII (GK 574), *E. coli* MIVa (GK 575) und die *clpA*-Mutante #21 (*E. coli* MIVa *clpA* (1695_1697delAAT, 1701_1702insA)) wurden mit dem Plasmid pRepA(1-70)GFP transformiert und auf L-Arabinose haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Platte unter UV-Licht bei 366 nm fotogra-

fiert. Die Negativkontrolle MIII ohne *clpA*-Mutation fluoresziert nicht. Die Positivkontrolle MIVa mit der *clpA*-Mutation und auch die *clpA*-Mutante #21 fluoreszieren. *ClpA* ist in der Mutante #21 nicht funktionstüchtig.

Die fünfte Mutante, welche sequenziert wurde, die *clpA*-Mutante #146 zeigte eine noch größere Mutation von 11 bp auf: *E. coli* MIVa *clpA* (1695_1705delAATCGAGAAAG). Durch diese Deletion kommt es zu einem *frameshift* und zu einem vorzeitigen Stop-Codon, welches sich *downstream* des Stop-Codons der Mutante *E. coli* MIVa befindet. Ähnlich wie bei der Mutante *E. coli* MIVa, kann ClpA keinen Komplex mit der Protease ClpP eingehen (Kim et al. 2001). Auch hier liegt ClpA nicht in seiner Wildtypform vor.

Da auf dem direkten Weg der Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System von *E. coli* MIVa keine Mutante hervorgegangen ist, bei der *clpA* wieder in seiner Wildtypform vorlag, wurde alternativ die indirekte Mutagenese getestet (vgl. Kapitel 5.3.2.2). Hierfür wurde von der aus dieser direkten Mutagenese hervorgegangenen *clpA*-Mutante #14 (*E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14) ausgegangen. In den folgenden Kapiteln ist die genaue Vorgehensweise detailliert beschreiben.

5.3.2.2 Indirekte Mutagenese über die Zwischenstufe der *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14

Bei der indirekten Mutagenese war es ebenso wie bei der direkten Mutagenese das Ziel, das Gen *clpA* in der Mutante *E. coli* MIVa zurück auf das Wildtyp-Niveau zu bringen und damit die *clpA*-Mutation zu eliminieren. Da bei der direkten Mutagenese von *E. coli* MIVa fünf potenzielle Mutanten hervorgegangen waren, die aber alle noch zusätzliche unerwünschte Mutationen aufwiesen, sollte über eine Zwischenstufe das Ziel erreicht werden. Dazu wurde die *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14 aus der direkten Mutagenese (vgl. Kapitel 5.3.2.1.4) als Zwischenstufe genutzt. Bei dieser Mutante war bereits die eigentliche *clpA*-Mutation eliminiert worden, jedoch musste die zusätzliche unerwünschte Deletion noch korrigiert werden, um *clpA* in der Wildtyp-Variante vorliegen zu haben. Im Folgenden ist die Vorgehensweise dazu näher beschrieben.

5.3.2.2.1 Konstruktion von pKDsgRNA-HP*clpA*-Mut14

Generell war es auch für die indirekte Mutagenese wichtig ein passendes pKDsgRNA-Plasmid zu konstruieren. In diesem Fall sollte mit dem Plasmid das Genom der *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14 adressiert werden, sodass die N₂₀-Sequenz aus dem Ausgangsplasmid pKDsgRNA-ack gegen diejenige der *clpA*-Mutante #14 ausgetauscht werden musste. Ge-

nannt wurde das neue pKDsgRNA-Plasmid dementsprechend pKDsgRNA-HPclpA-Mut14. Die PAM-Stelle konnte erneut die zuvor bereits genutzte verwendet werden (vgl. Kapitel 5.3.1.1 und 5.3.2.1.1). Als neue N₂₀-Sequenz, welche an die *clpA*-Sequenz der CRISPR-Mutante #14 angepasst war, ergab sich: 5'-ACGAATCGAGAAAGCGCACC-3'. Nachdem auch diese N₂₀-Sequenz im Cas-OFFinder auf ihre *off-target* Effekte untersucht worden war (Bae/Park/Kim 2014; Molecular Genome Engineering Lab - Hanyang University Korea 2016) und keine Treffer gefunden wurden, vgl. das beschriebene Phänomen mit Kapitel 5.3.2.2.1, da die hinterlegte Referenz diese *clpA*-Mutationen nicht aufweist, konnten diese 20 Nukleotide für die Konstruktion des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-Mut14 verwendet werden. Methodisch wurde erneut auf die *Round-the-horn* Klonierung zurückgegriffen (vgl. Kapitel 8.2.2.2.3). Wie bereits in dem Kapitel 5.3.2.1.1 beschrieben, wurde nach demselben Prinzip ein neuer 5'-Primer entworfen, der die N₂₀-Sequenz für die CRISPR-Mutante #14 enthält, der Primer pKDsgRNA_clpA_Mut14_5_5336. Als 3'-Primer wurde der von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather entwickelte Primer (Reisch/Prather 2017) für die Konstruktion des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-Mut14 leicht optimiert. Der verwendete Primer pKDsgRNA_3_5335_PO4 (vgl. Tabelle 8.1–3) war genauso am 5'-Ende phosphoryliert, jedoch um ein Nukleotid verkürzt, wodurch beispielsweise die Schmelztemperatur des Primers besser zum verwendeten 5'-Primer passte. Analog zu dem Kapitel 5.3.2.1.1 erfolgte die Konstruktion und die Transformation des Stamm *E. coli* DH5α mit dem Plasmid pKDsgRNA-HPclpA-Mut14. Die Abbildung 5.3–9 veranschaulicht die Konstruktion des Plasmids mit den zugehörigen Primern.

```
GCTCAGTGG ACGAAAATC ACGTTAAGG ATTTGGTCA TGAGATTATC AGCTTTCGCT AAGGATGATT TCTGGAATC TTCCCTATCA GTGATAGAGA
CGATCACCT TGCTTTTGAG TGCAATTCCC TAAAACCACT ACTCTAATAG TCGAAAGCGA TTCCTACTAA AGACCTAAG AAGGGATAGT CACTATCTCT
pKDsgRNA_clpA_Mut14_5_5336 500bp:
TTGACATCCC TATCAGTGAT AGAGATACTG AGCACACGAA TCGAGAAAGC GCACCGTTTT AGAGCTAGAA ATAGCAAGTT AAAATAAGGC TAGTCCGTTA
AAGTGTAGGG ATAGTCACTA TCTCTATGAC TCGTGTGCTT AGCTCTTTCG CGTGGCAAAA TCTCGATCTT TATCGTTCAA TTTTATTCCG ATCAGGCAAT
pKDsgRNA_3_5335_PO4 1000bp:
TCAACTGAA AAAGTGGCAC CGAGTCGGTG CTTTTTTTGA AGCTTGGGCC CGAACAAAA CTCATCTCAG AAGAGGATCT GAATAGCGCC GTCGACCATC
AGTTGAACTT TTTACCGTG GCTCAGCCAC GAAAAAACT TCGAACCCGG GCTTGTTTTT GAGTAGAGTC TTCTCTAGA CTTATCGCGG CAGCTGGTAG
```

Abbildung 5.3–9: Konstruktion des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-Mut14 mittels Round-the-horn Klonierung

Sequenzausschnitt des konstruierten Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-Mut14. Eingezeichnet sind die beiden Primer für die Round-the-horn Klonierung: Der 3'-Primer pKDsgRNA_3_5335_PO4, welcher am 5'-Ende phosphoryliert ist, und der 5'-Primer pKDsgRNA_clpA_Mut14_5_5336. Die in Gelb hinterlegte N₂₀-Sequenz wurde in dieser Darstellung bereits von *ack* des Ursprungsplasmids pKDsgRNA-*ack* in die von *clpA* (aus *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14) ausgetauscht, daher bindet auch der 5'-Primer bereits zu 100 %.

5.3.2.2.2 Überprüfung der N₂₀-Sequenz

Für das konstruierte Plasmid pKDsgRNA-HPclpA-Mut14 wurde, wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, der korrekte Einbau der neuen N₂₀-Sequenz in das Plasmid ebenfalls über das Pyrosequencing® (vgl. Kapitel 8.2.2.9.2) verifiziert. Als *dispensation order* wurde der Software der Apparatur für die Sequenzierung der N₂₀-Sequenz die folgende vorgegeben: 5'-TACGATCGAGAGCGCACGTA-3'.

Die Abbildung 5.3–10 zeigt das Pyrogramm des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-Mut14. Die N₂₀-Sequenz (5'-ACGAATCGAGAAAGCGCACC-3') und der Übergang (5'-GTTTTA-3') zu der restlichen sgRNA des ursprünglichen Plasmids pKDsgRNA-ack sind korrekt. Dementsprechend konnte das Plasmid pKDsgRNA-HPclpA-Mut14 aus dem Stamm *E. coli* DH5 α , in dem das Plasmid etabliert worden war, isoliert werden (vgl. Kapitel 8.2.2.1.3). Die isolierte Plasmid-DNA wurde im Anschluss für die Transformation des Bakterienstammes *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14 genutzt. Allerdings gab es zu beachten, dass diese Mutante über einen Temperaturshift (vgl. Kapitel 8.2.2.10.3) zunächst von dem noch vorhandenen Plasmid pKDsgRNA-HPclpA-MIVa aus der direkten Mutagenese kuriert werden musste. Nach der Überprüfung des vollständigen Plasmid Curing des pKDsgRNA-Plasmids, konnte die Transformation durchgeführt werden. Das Plasmid pCas9-CR4 wurde erneut benötigt und dementsprechend wurde die Mutante nicht davon kuriert.

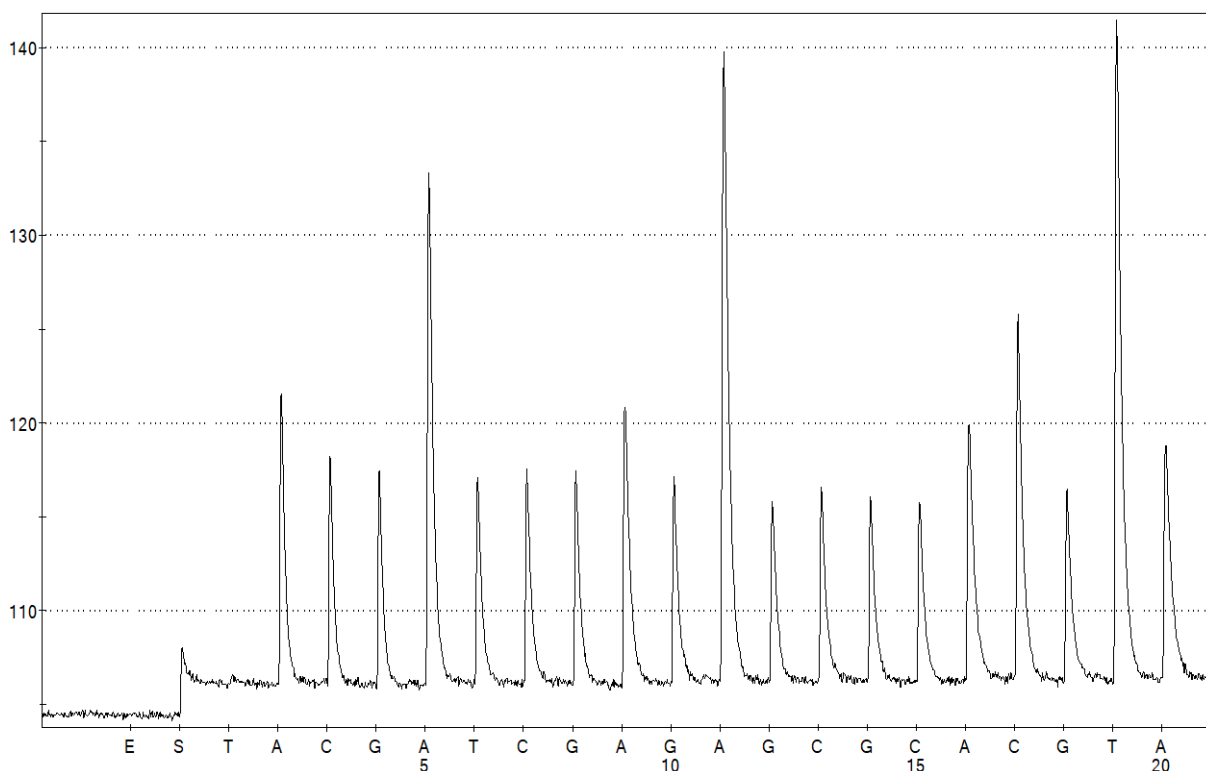


Abbildung 5.3–10: Pyrogramm des Plasmids pKDsgRNA-HPclpA-Mut14

Zuerst wurden der Enzymmix „E“ und der Substratmix „S“ von der Pyrosequencing®-Apparatur überprüft. Zur weiteren Kontrolle wurde mit dem Thyminnukleotid ein Nichteinbau getestet. Anhand der Höhe der Peaks der jeweiligen zugegebenen dNTPs kann proportional auf die Anzahl der eingebauten Nucleotide geschlossen werden. Die N₂₀-Sequenz lautet dementsprechend: 5'-ACGAATCGAGAAAGCGCACC-3'. Der Übergang zur restlichen sgRNA des ursprünglichen Plasmids mit 5'-GTTTTA-3' entspricht der richtigen Sequenz.

5.3.2.2.3 Untersuchung der Mutanten auf das Vorliegen ausschließlich der gewünschten *clpA*-Mutation

Nach der Transformation des Bakterienstammes *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14, der bereits das Plasmid pCas9-CR4 trug, mit dem Plasmid pKDsgRNA-HPclpA-Mut14, war dieser für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System vorbereitet. Nach der Induktion des λ -Red-Systems mit L-Arabinose und der Expression von *cas9* und der sgRNA durch Anhydrotetracyclin erfolgte die Übertragung der gewünschten *clpA*-Mutation bzw. aus der Sicht der CRISPR-Mutante #14 der Elimination der in der direkten Mutagenese zusätzlich entstandenen Mutation (vgl. Kapitel 8.2.2.10.2). Für diese einzuführende Insertion wurde das 82 nt lange Oligonukleotid *clpA_1702insA_noSCAR* (vgl. Tabelle 8.1–3) verwendet, welches der *clpA*-Wildtypform entspricht und auch bereits bei der direkten Mutagenese von *E. coli* MIVa Anwendung fand. Dies war möglich, da mit der indirekten Mutagenese dasselbe Ziel befolgt wurde, nämlich das Gen *clpA* in der Mutante *E. coli* MIVa zurück auf das Wildtyp-Niveau zu bringen und damit die *clpA*-Mutation zu eliminieren. Für die Selektion auf die gewünschte *clpA*-Insertion bedurfte es der Etablierung einer weiteren ARMS-PCR (vgl. Kapitel 8.2.2.2.4), da sich die Insertion des Adeninukleotids an einer anderen Stelle im Genom befand. Der bereits etablierte 5'-Primer *clpA_5_1462_EcoWT* wurde zusammen mit dem für diese Anwendung neu entwickelten 3'-Primer *clpA_3_1713_EcoWT_ARMS_weak* genutzt (vgl. Tabelle 8.1–3). Eine PCR mit diesen Primern lieferte nur bei dem Wildtyp *E. coli* WT (GK 571) ein 252 bp großes Amplifikat und bei der *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14 wurde kein Fragment amplifiziert. Diese beiden Stämme wurden zur Kontrolle der ARMS-PCR jeweils mit überprüft. Generell war der Ablauf der Selektion auf die gewünschte *clpA*-Insertion mithilfe der ARMS-PCR identisch zu vorherigen ARMS-Reaktionen. Diejenigen Klone, die mit der ARMS-PCR positiv auf die *clpA*-Insertion getestet wurden, wurden abschließend durch eine Sanger-Sequenzierung (vgl. Kapitel 8.2.2.9.1) überprüft. Vier Klone konnten mit der ARMS-PCR ermittelt werden: Mutante #10, #37, #104 und #111 (vgl. Abbildung 10.5–5 und Abbildung 10.5–6 im Anhang). Jedoch ergab die Sanger-Sequenzierung erneut, dass neben der gewünschten Insertion, zusätzliche unerwünschte Mutationen bei den vier Klonen aufgetreten waren (vgl. auch Kapitel 10.3.2.2 im Anhang). Die Abbildung 5.3–11 gibt einen Überblick der durch die Sanger-Sequenzierung ermittelten Mutationen.

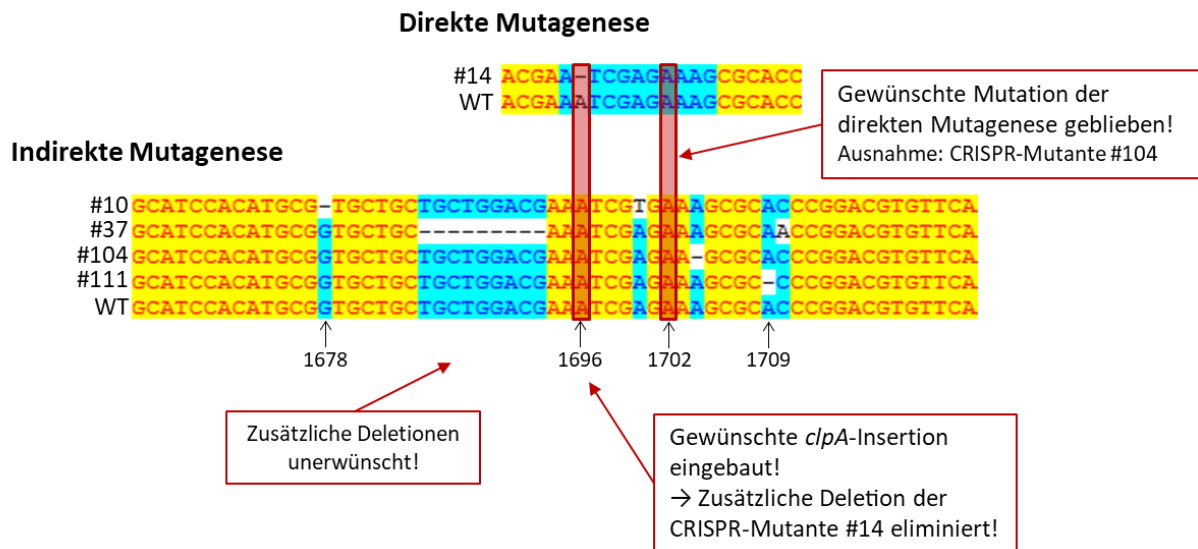


Abbildung 5.3–11: Ausschnitt der Sequenzierungsergebnisse der indirekten Mutagenese von der CRISPR-Mutante #14

Dargestellt ist ein Ausschnitt der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der vier potenziellen *clpA*-Mutanten (#10, #37, #104, #111) der indirekten Mutagenese im Alignment mit dem Wildtypstamm (WT) ausgehend von der CRISPR-Mutante #14 aus der direkten Mutagenese von *E. coli* MIVa. Die gewünschte *clpA*-Insertion wurde erfolgreich in das Genom eingebaut. Jedoch sind bei allen vier Klonen zusätzliche unerwünschte Mutationen aufgetreten, sodass sich diese vier Mutanten weiterhin vom Wildtyp unterscheiden. Zur besseren Übersicht sind die Positionen der Nukleotide 1678, 1696, 1702 und 1709 bei *E. coli* WT markiert.

Keiner der vier Klone zeigte ausschließlich die gewünschte Insertion. Die CRISPR-Mutante #10 wies neben der Insertion eine Deletion eines Guaninnukleotids und eine Punktmutation auf: *E. coli* MIVa *clpA* (1678delG, A1700T, 1701_1702insA). Durch diese zusätzliche Deletion kommt es zu einem *frameshift* und zu einem vorzeitigen Stop-Codon an derselben Stelle wie in der Mutante *E. coli* MIVa (GK 575). Die Mutante #37 zeigte eine größere zusätzliche Deletion von neun Nukleotiden und eine Punktmutation: *E. coli* MIVa *clpA* (1685_1693delTGCTGGACG, 1701_1702insA, C1710A). Durch diese Deletion ging das Walker-B Motiv, welches generell entscheidend für die ATPase Aktivität ist, verloren (Hanson/Whiteheart 2005; Iyer et al. 2004). Bei der CRISPR-Mutante #104 wurde das Adeninnukleotid, welches in der direkten Mutagenese von *E. coli* MIVa (GK 575) eingefügt worden war, wieder deletiert: *E. coli* MIVa *clpA* (1702delA). Damit entspricht diese Mutante genetisch wieder der Mutante *E. coli* MIVa. Der vierte Klon, die CRISPR-Mutante #111, wies zusätzlich auch eine Deletion auf, und zwar von einem Adeninnukleotid: *E. coli* MIVa *clpA* (1701_1702insA, 1709delA). Durch diese zusätzliche Deletion kommt es ebenfalls zu einem *frameshift* und zu einem vorzeitigen Stop-Codon an derselben Stelle wie in der Mutante *E. coli* MIVa (GK 575).

Sowohl auf dem direkten Weg der Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System von *E. coli* MIVa (vgl. Kapitel 5.3.2.1) als auch bei der indirekten Mutagenese über die Zwischenstufe *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14 ist keine Mutante hervorgegangen, bei der *clpA* wieder in seiner Wildtypform vorlag.

Daher wurde folgend der Vorläuferstamm von der Selektionsmutante *E. coli* MIVa (GK 575), die Mutante *E. coli* MIII (GK 574), einer genomischen Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System unterzogen.

5.3.3 Mutagenese von *E. coli* MIII mit der *clpA*-Mutation aus *E. coli* MIVa

Für die Mutagenese von *E. coli* MIII konnte das Plasmid pKDsgRNA-HPclpA aus dem Kapitel 5.3.1.1 erneut verwendet werden, da sich die Gensequenz von *clpA* in den beiden miteinander verwandten Stämmen *E. coli* WT und *E. coli* MIII nicht unterscheidet.

5.3.3.1 Untersuchung der Mutanten auf das Vorliegen ausschließlich der gewünschten *clpA*-Mutation

Zunächst wurde die Mutante *E. coli* MIII (GK 574) mit den beiden Plasmiden pCas9-CR4 und pKDsgRNA-HPclpA transformiert, sodass diese für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System vorbereitet war. Es folgte die Induktion des λ -Red-Systems durch L-Arabinose, die Expression von *cas9* und der sgRNA durch Anhydrotetracyclin und die Übertragung der gewünschten *clpA*-Mutation durch die Elektroporation mit dem Oligonukleotid (vgl. Kapitel 8.2.2.10.2). Hierfür konnte das 81 nt lange Oligonukleotid clpA_1702delA_noSCAR (vgl. Tabelle 8.1–3) erneut genutzt werden, da dieses die *clpA*-Deletion trägt, wie sie in der Mutante *E. coli* MIVa (GK 575) vorkommt. Für die Mutagenese war die Nutzung des Oligonukleotids unabhängig davon, welcher Bakterienstamm verändert werden sollte, sofern dieselbe Mutation eingeführt werden sollte. Dies war vor allem dadurch möglich, weil sich die Bakterienstämme *E. coli* WT und *E. coli* MIII untereinander nicht in der Gensequenz von *clpA* unterscheiden. Für die Selektion auf die gewünschte *clpA*-Deletion konnte ebenfalls die ARMS-PCR aus dem Kapitel 5.3.1.3 mit den beiden Primern clpA_5_1462_EcoWT und clpA_3_1721_EcoMIVa_ARMS (vgl. Tabelle 8.1–3) erneut Anwendung finden. Diejenigen Klone, die mit der ARMS-PCR positiv auf die *clpA*-Mutation getestet wurden (zwei Klone: Mutante #50 und #54) (vgl. Abbildung 10.5–7 im Anhang), wurden wiederum zur abschließenden Verifikation durch eine Sanger-Sequenzierung bestätigt (vgl. Kapitel 8.2.2.9.1).

Die Mutante #50 zeigte in der Sequenzierung die gewünschte Nukleotidabfolge des Gens *clpA* (vgl. Kapitel 10.3.3 im Anhang). Die genomische Mutagenese von *E. coli* MIII wurde dementsprechend erfolgreich durchgeführt. Für die nachfolgenden Experimente, wie der phänotypischen Untersuchung, wurde die Mutante einem Plasmid Curing unterzogen (vgl. Kapitel 8.2.2.10.3), damit die beiden Plasmide nicht die phänotypischen Eigenschaften dieser Mutante beeinflussten. Nach dem Plasmid Curing erhielt die genomische *clpA*-Mutante den Namen *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12

und zur langfristigen Lagerung wurde eine Kryokonservierung (vgl. Kapitel 8.2.1.1.3) durchgeführt (GK 4686).

Die phänotypische Untersuchung durch den *in-vivo* Funktionstest von ClpA und das Wachstumsverhalten im Vergleich mit den Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa wird in den folgenden Kapiteln 5.4.1 bzw. 5.4.2 beschrieben.

5.4 Phänotypische Charakterisierung der komplementierten Stämme und der genomischen *clpA*-Mutanten jeweils im Vergleich zu den verwandten Referenzstämmen

5.4.1 *In-vivo* Funktionstest von ClpA

Zunächst wurde der *in-vivo* Funktionstest von ClpA zur phänotypischen Charakterisierung (vgl. Kapitel 8.2.1.5) mit den Stämmen aus dem Komplementationsexperiment durchgeführt (vgl. Kapitel 5.2). Dazu wurden die beiden Mutanten *E. coli* MIII (GK 574) und *E. coli* MIVa (GK 575) mit dem Plasmid pRepA(1-70)GFP transformiert. Diese beiden Stämme dienten als Positivkontrolle für die grüne Fluoreszenz (MIVa) bzw. als Negativkontrolle für die nicht fluoreszierenden Bakterienzellen (MIII). Zur weiteren Kontrolle wurde der Stamm *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP mit dem Kontrollplasmid pHPAS10-01.1 aus dem Komplementationsexperiment transformiert (vgl. Tabelle 8.1–1). Dieses Kontrollplasmid durfte die grüne Fluoreszenz nicht beeinflussen und dieser Stamm sollte dementsprechend unter UV-Licht vergleichbar mit dem Stamm *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP aussehen. Zur phänotypischen Charakterisierung wurde der Stamm *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP mit den Komplementationsplasmiden pHPAS10-01.3 bzw. pHPAS10-01.4 transformiert (vgl. Tabelle 8.1–1). Nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C wurden diese fünf Stämme unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm betrachtet und fotografiert. Die folgende Abbildung 5.4–1 zeigt das Ergebnis. Dabei entsprechen die Kontrollen den Erwartungen. Die beiden Stämme *E. coli* MIVa pHPAS10-01.3 und *E. coli* MIVa pHPAS10-01.4 zeigten keine Fluoreszenz und sahen vergleichbar mit der Negativkontrolle *E. coli* MIII pRepA(1-70)GFP aus. Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass durch die Komplementationsplasmide, welche das Gen *clpA* in seiner Wildtyp-Form tragen, der Abbau von GFP ermöglicht wurde. *clpA* ist demnach komplementierbar.

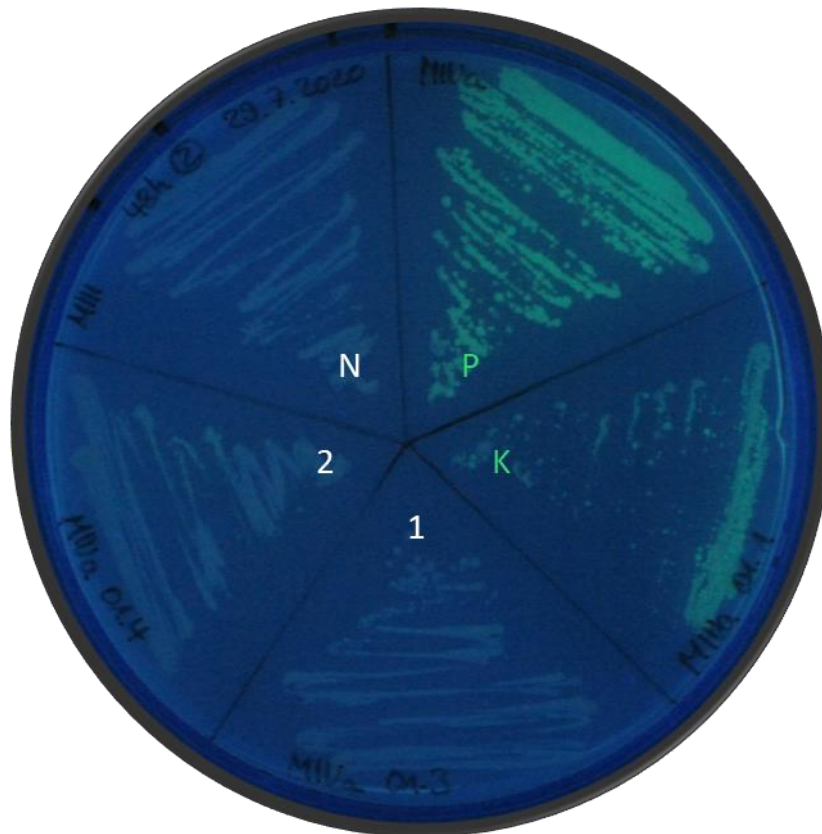


Abbildung 5.4–1: *In-vivo* Funktionstest von ClpA der komplementierten Stämme inklusive Kontrollen bzw. Referenzstämmen. Dargestellt sind die folgenden Stämme des *in-vivo* Funktionstests von ClpA: **N** \triangleq Negativkontrolle, *E. coli* MIII pRepA(1-70)GFP; **P** \triangleq Positivkontrolle, *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP; **K** \triangleq Kontrollplasmid Komplementation, *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP pHPAS10-01.1; **1** \triangleq *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP pHPAS10-01.3; **2** \triangleq *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP pHPAS10-01.4. Ausgestrichen wurden die Stämme auf einer L-Arabinose haltigen LB-Agarplatte und nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde diese Platte unter UV-Licht bei 366 nm fotografiert. Die Negativkontrolle MIII ohne *clpA*-Mutation fluoresziert nicht. Die Positivkontrolle MIVa mit der *clpA*-Mutation hingegen schon, die Kontrolle mit dem Kontrollplasmid pHPAS10-01.1 ebenfalls. Die Stämme *E. coli* MIVa pHPAS10-01.3 und *E. coli* MIVa pHPAS10-01.4 zeigen keine Fluoreszenz, vergleichbar mit der Negativkontrolle **N**.

Des Weiteren wurde der *in-vivo* Funktionstest von ClpA genutzt, um die genomischen *clpA*-Mutanten, welche mit dem CRISPR/Cas9-System konstruiert wurden (vgl. Kapitel 5.3), phänotypisch zu charakterisieren.

Dazu wurde zum einen der Stamm *E. coli* WT (GK 571) als Referenzstamm mit dem Plasmid pRepA(1-70)GFP transformiert. Im Vergleich wurde auch die CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 mit dem Plasmid des *in-vivo* Funktionstests von ClpA transformiert (vgl. Tabelle 8.1–1). Die Abbildung 5.4–2 zeigt die Gegenüberstellung dieser beiden Stämme. Die CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 mit dem Plasmid pRepA(1-70)GFP zeigt nach 48-stündiger Inkubation bei Betrachtung unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm eine grüne Fluoreszenz, sodass gezeigt werden konnte, dass die *clpA*-Mutation aus der Mutante *E. coli* MIVa, welche den GFP-Abbau in diesem

Funktionstest verhindert (vgl. Kapitel 5.1 und Kapitel 8.2.1.5), erfolgreich in das Genom von *E. coli* WT integriert werden konnte. ClpA ist in dieser CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 nicht mehr funktionstüchtig.



Abbildung 5.4–2: *In-vivo* Funktionstest von ClpA der CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12

Dargestellt sind die folgenden Stämme des *in-vivo* Funktionstests von ClpA: **1** \triangleq *E. coli* WT pRepA(1-70)GFP; **2** \triangleq *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 pRepA(1-70)GFP. Ausgestrichen wurden die Stämme auf einer L-Arabinose haltigen LB-Agarplatte und nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde diese Platte unter UV-Licht bei 366 nm fotografiert. Der Referenzstamm *E. coli* WT pRepA(1-70)GFP fluoresziert nicht. Die CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 pRepA(1-70)GFP hingegen schon.

Zum anderen wurde die genomische *clpA*-CRISPR-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 für den *in-vivo* Funktionstest von ClpA mit dem Plasmid pRepA(1-70)GFP transformiert (vgl. Tabelle 8.1–1). Die verwandten Referenzstämme *E. coli* MIII pRepA(1-70)GFP und *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP lagen bereits vor und wurden erneut mit auf eine L-Arabinose haltige LB-Agarplatte für die 48-stündige Inkubation ausgestrichen. Die Abbildung 5.4–3 zeigt das Ergebnis des *in-vivo* Funktionstests von ClpA. Sowohl die *clpA*-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 pRepA(1-70)GFP als auch der Referenzstamm *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP, mit derselben *clpA*-Mutation, zeigen eine grüne Fluoreszenz. Der Ausgangsstamm der CRISPR-Mutante *E. coli* MIII mit dem Plasmid pRepA(1-70)GFP hingegen fluoresziert nicht. Damit konnte die CRISPR-Mutante phänotypisch charakterisiert werden und ge-

zeigt werden, dass die *clpA*-Mutation aus der Mutante *E. coli* MIVa, welche in diesem Funktionstest für den Ausfall des GFP-Abbaus sorgt, erfolgreich in das Genom von *E. coli* MIII integriert wurde. ClpA ist in dieser CRISPR-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 nicht mehr funktionstüchtig.

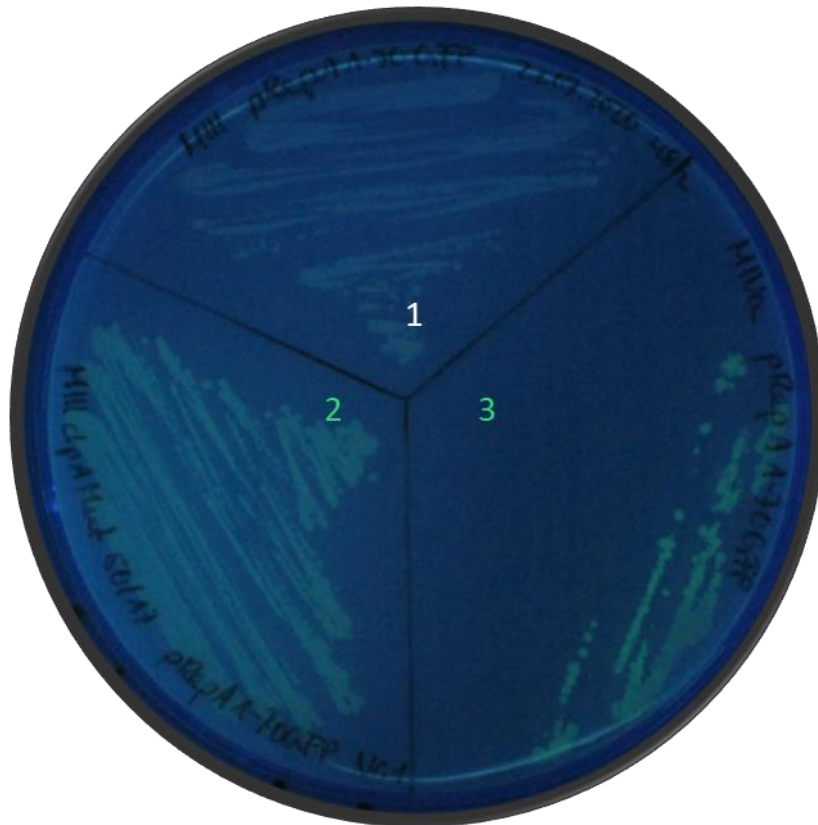


Abbildung 5.4–3: In-vivo Funktionstest von ClpA der CRISPR-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12. Dargestellt sind die folgenden Stämme des in-vivo Funktionstests von ClpA: **1** \triangleq *E. coli* MIII pRepA(1-70)GFP; **2** \triangleq *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 pRepA(1-70)GFP; **3** \triangleq *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP. Ausgestrichen wurden die Stämme auf einer L-Arabinose haltigen LB-Agarplatte und nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde diese Platte unter UV-Licht bei 366 nm fotografiert. Der Referenzstamm *E. coli* MIII pRepA(1-70)GFP fluoresziert nicht. Die CRISPR-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 pRepA(1-70)GFP und der Referenzstamm *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP hingegen schon.

5.4.2 Wachstumsverhalten dargestellt mit dem oCelloScope™

Zur weiteren phänotypischen Untersuchung wurden Wachstumskurven mit dem oCelloScope™ aufgezeichnet (vgl. Kapitel 8.2.1.4). Zuerst wurde das Wachstumsverhalten der Stämme des Komplementationsexperimentes ermittelt. Dazu wurden jeweils drei unabhängige biologische Proben der Referenzstämme, also der Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa, sowie der zu testenden Stämme *E. coli* MIVa pHPAS10-01.1 und *E. coli* MIVa pHPAS10-01.4 im oCelloScope™ vermessen. Ergänzend zu den allgemein gültigen Angaben im Methodenkapitel 8.2.1.4 wurden bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C über einen Zeitraum von 20 Stunden von der Apparatur alle 20 Minuten Fotos aufgenommen. Im Anschluss wurde der Wert des gerätespezifischen Algorithmus BCA (*background correc-*

ted absorption) ausgegeben und konnte, aufgetragen gegen die Zeit, in Wachstumskurven veranschaulicht werden. Die Abbildung 5.4–4 zeigt die Wachstumskurven des Komplementationsexperimentes, als Auftragung des oCelloScope™ spezifischen Algorithmus BCA gegen die Zeit in Minuten. Die Standardabweichung wurde anhand von Fehlerindikatoren aus drei biologischen Proben dargestellt. Durch das Kontrollplasmid pHPAS10-01.1 änderte sich das Wachstumsverhalten der Mutante *E. coli* MIVa nicht. Dies entsprach den Erwartungen. Auch der Stamm mit dem Komplementationsplasmid pHPAS10-01.4 zeigte kein Wachstum, welches an die Wachstumsgeschwindigkeit der Mutante *E. coli* MIII herankam. Die Steigung der Kurve entsprach in etwa der des Referenzstammes *E. coli* MIVa. Somit wurde durch die Komplementation des Gens *clpA* keine schnellere Wachstumsgeschwindigkeit erzeugt.

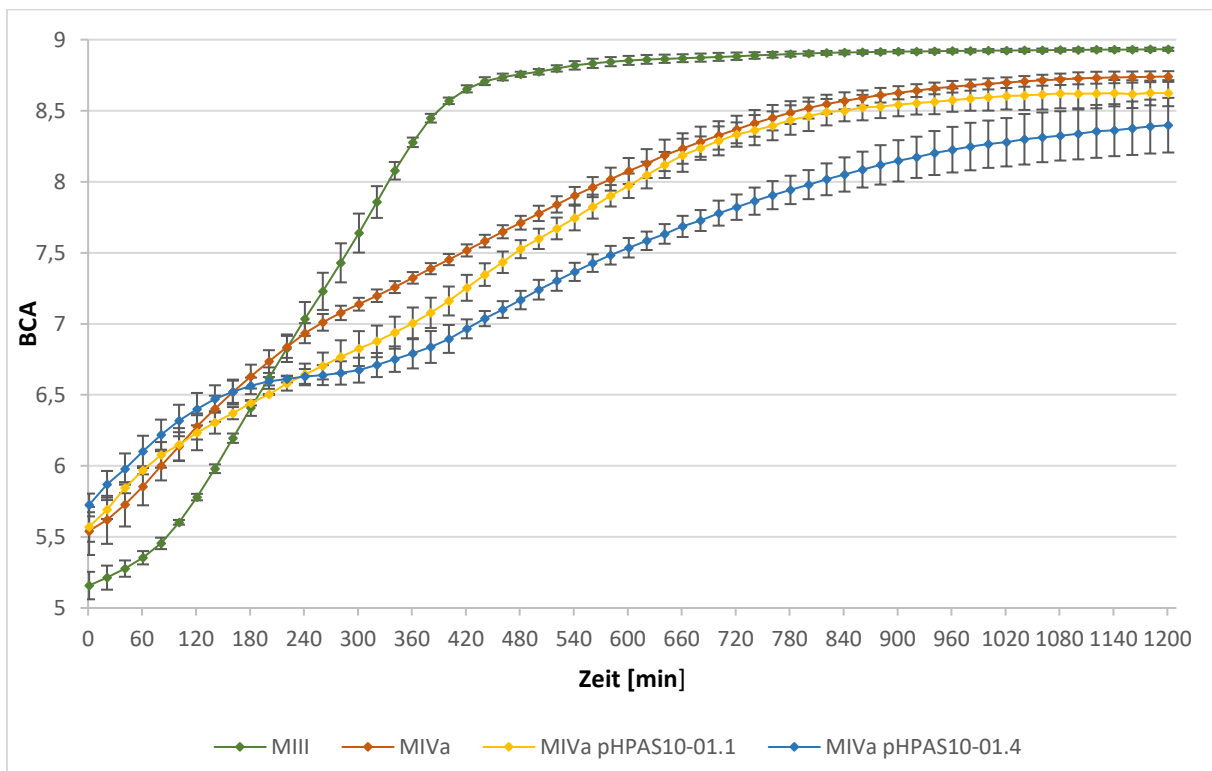


Abbildung 5.4–4: Wachstumsverhalten der Stämme des Komplementationsexperimentes

Aufgetragen sind die Werte des oCelloScope™ spezifischen Algorithmus BCA gegen die Zeit in Minuten. Gemessen wurde über einen Zeitraum von 20 Stunden alle 20 Minuten bei 37 °C. In Grün ist das Wachstumsverhalten der Mutante *E. coli* MIII, in Orange der Mutante *E. coli* MIVa, in Gelb des Stammes *E. coli* MIVa pHPAS10-01.1 und in Blau des Stammes *E. coli* MIVa pHPAS10-01.4 dargestellt. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung dreier voneinander unabhängiger biologischer Proben.

Des Weiteren wurde mit dem oCelloScope™ das Wachstumsverhalten der genomischen *clpA*-Mutanten, welche mit dem CRISPR/Cas9-System konstruiert wurden, aufgezeichnet, um diese phänotypisch zu charakterisieren.

Ergebnisse

Zunächst wurde die CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 mit ihrem verwandten Referenzstamm *E. coli* WT in LB-Medium im oCelloScope™ herangezogen. Über einen Zeitraum von acht Stunden bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C wurden alle zehn Minuten Fotos von der Apparatur aufgenommen. Die Abbildung 5.4–5 zeigt die Wachstumskurven der beiden Stämme, aufgetragen als gerätespezifischen Algorithmus BCA gegen die Zeit in Minuten. Beide Stämme zeigen in LB-Medium ein identisches Wachstumsverhalten.

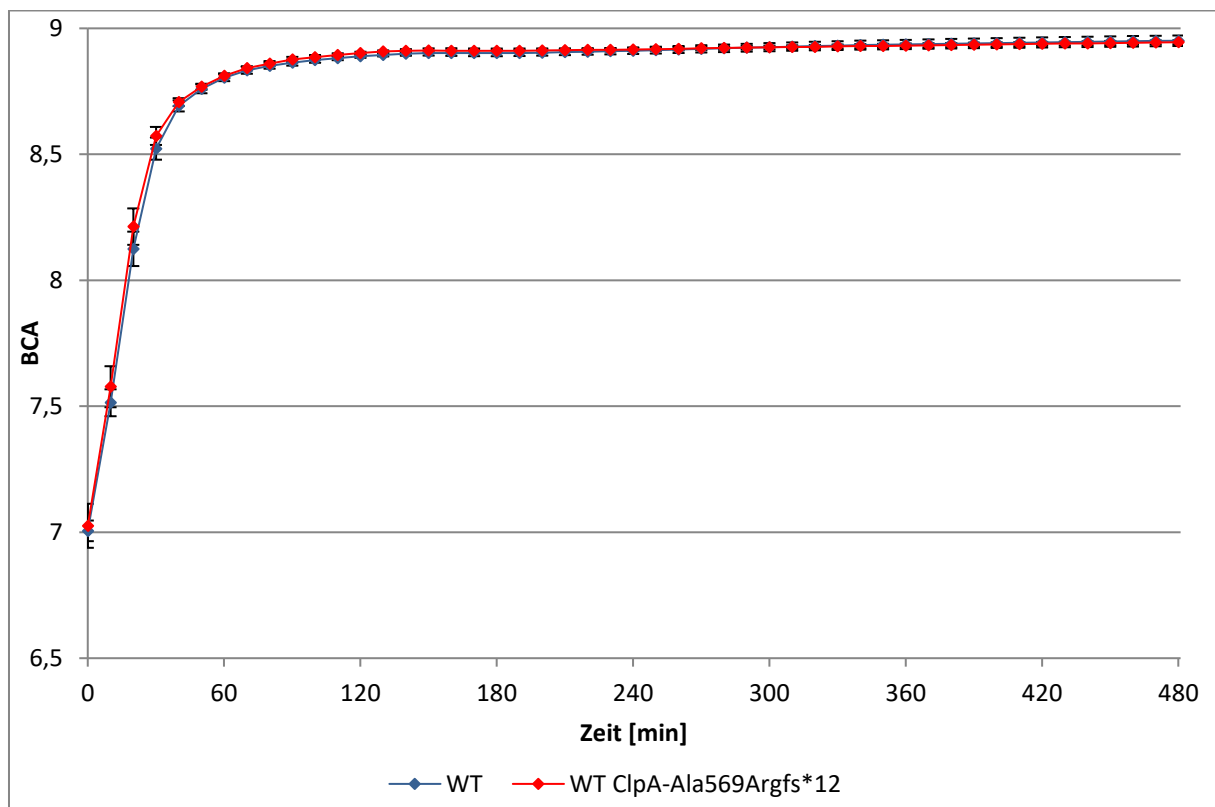


Abbildung 5.4–5: Wachstumsverhalten der CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 in LB-Medium

Aufgetragen sind die Werte des oCelloScope™ spezifischen Algorithmus BCA gegen die Zeit in Minuten. Gemessen wurde über einen Zeitraum von acht Stunden alle zehn Minuten bei 37 °C. In Blau ist das Wachstumsverhalten des Stammes *E. coli* WT und in Rot des Stammes *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 dargestellt. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von fünf voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Außerdem wurden diese beiden Stämme in M9Glu-Medium, einem Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstofflieferant, im oCelloScope™ herangezogen. Ebenfalls über einen Zeitraum von acht Stunden bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C wurden alle zehn Minuten Fotos von der Apparatur aufgenommen. Die Abbildung 5.4–6 zeigt die Wachstumskurven der beiden Stämme, aufgetragen als Algorithmus BCA gegen die Zeit in Minuten. Die CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 zeigt in dem M9Glu-Medium zu Beginn ein etwas verzögertes Wachstum im Vergleich zu dem des

Wildtyps, welches sich aber nach spätestens zwei Stunden vollständig dem Wachstumsverhalten des Wildtyps angleicht.

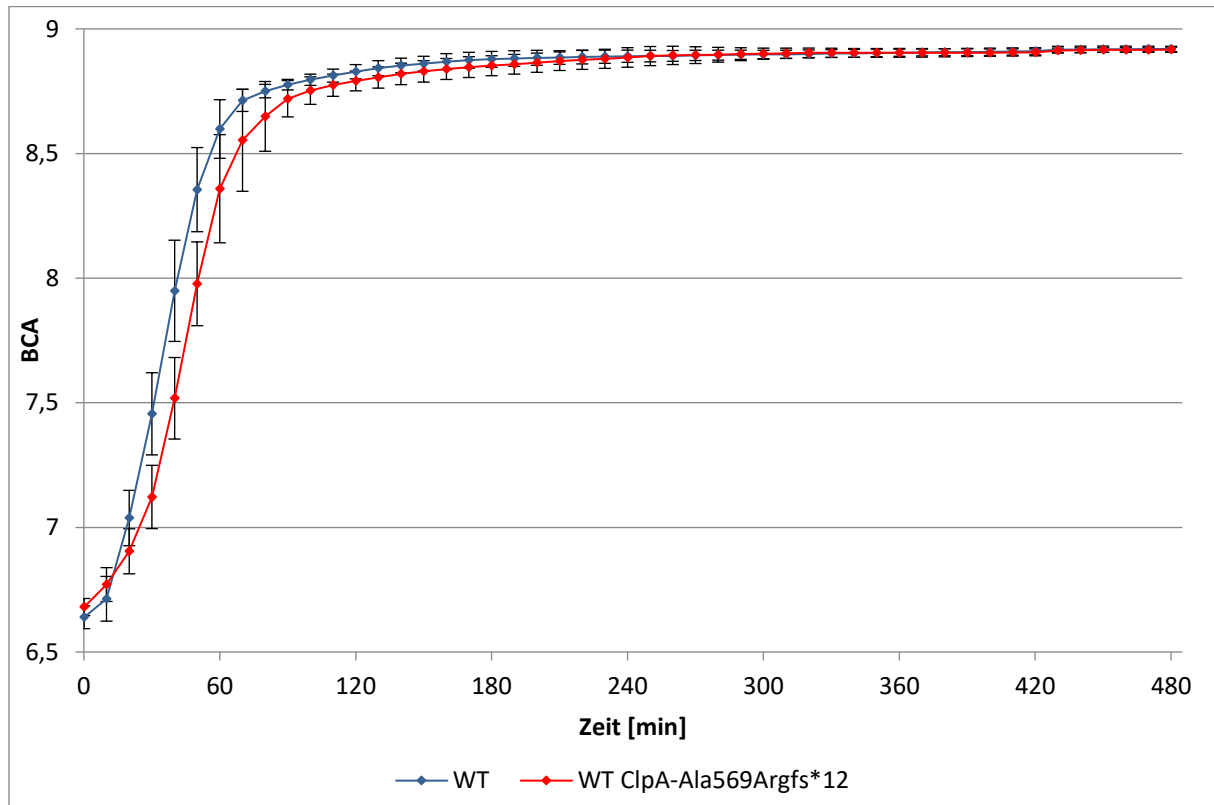


Abbildung 5.4–6: Wachstumsverhalten der CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 in M9Glu-Medium. Aufgetragen sind die Werte des oCelloScope™ spezifischen Algorithmus BCA gegen die Zeit in Minuten. Gemessen wurde über einen Zeitraum von acht Stunden alle zehn Minuten bei 37 °C. In Blau ist das Wachstumsverhalten des Stammes *E. coli* WT und in Rot des Stammes *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 dargestellt. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von sechs voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Im Anschluss wurde das Wachstumsverhalten der CRISPR-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 im oCelloScope™ ermittelt, um diese *clpA*-Mutante ebenfalls näher phänotypisch zu charakterisieren. Dafür wurden über einen Zeitraum von 16 Stunden bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C alle 20 Minuten Fotos von dem oCelloScope™ angefertigt. Neben der CRISPR-Mutante wurden die beiden Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa als Referenzstämme mit aufgezeichnet. Die Abbildung 5.4–7 zeigt die Wachstumskurven der drei Mutanten, aufgetragen als Algorithmus BCA gegen die Zeit in Minuten. Bei der CRISPR-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 bzw. aufgrund der genomischen *clpA*-Mutation ist kein signifikant abweichendes Wachstumsverhalten im Vergleich zu dem verwandten Ausgangsstamm *E. coli* MIII zu beobachten. Das Wachstumsverhalten von *E. coli* MIVa unterscheidet sich deutlich von den anderen beiden Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12.

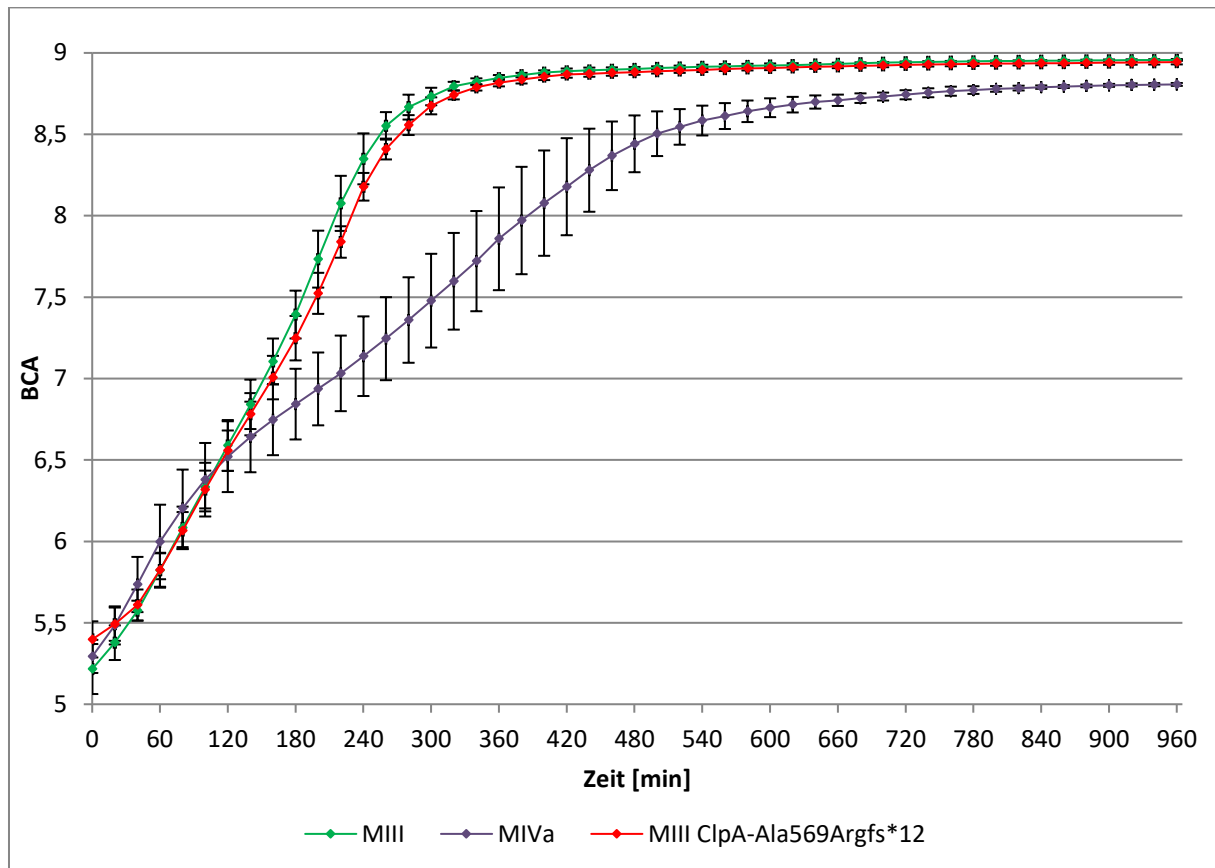


Abbildung 5.4–7: Wachstumsverhalten der CRISPR-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 im Vergleich zu den Referenzstämmen

Aufgetragen sind die Werte des oCelloScope™ spezifischen Algorithmus BCA gegen die Zeit in Minuten. Gemessen wurde über einen Zeitraum von 16 Stunden alle 20 Minuten bei 37 °C. In Grün ist das Wachstumsverhalten der Mutante *E. coli* MIII, in Violett der Mutante *E. coli* MIVa und in Rot der Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 dargestellt. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von vier, bzw. drei bei der Mutante *E. coli* MIVa, voneinander unabhängigen biologischen Proben.

5.4.3 Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit

Für die weitere phänotypische Charakterisierung der in dieser Arbeit untersuchten *clpA*-Mutation wurde die Antibiotikaempfindlichkeit verschiedener Stämme bestimmt. Dazu wurden die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) (vgl. Kapitel 8.2.1.3) für verschiedene Antibiotika(klassen) ermittelt.

5.4.3.1 Aminoglykosid MHK

Am Beispiel des Aminoglykosid-Antibiotikums Kanamycin wurde die minimale Hemmkonzentration für die Bakterienstämme des Komplementationsexperimentes sowie einer CRISPR-Mutante mit den jeweils zugehörigen Referenzstämmen bestimmt. Weitere Aminoglykoside, Amikacin und Gentamicin, wurden in Vorversuchen ebenfalls betrachtet, jedoch zeigten sich für die verwendeten Stämme die deutlichsten Unterschiede bei Kanamycin, sodass dieses Antibiotikum für die ausführlichen Untersuchungen verwendet wurde. Nach einigen Testungen wurde nicht mehr die in Kapitel 8.2.1.3 beschriebene übliche Konzentrationsabstufung gewählt, sondern die MHK-Bestimmung mit feineren Abstufungen durchgeführt, um die Unterschiede optimal darzustellen. Die Tabelle 5.4–1 zeigt die Ergebnisse der MHK-Bestimmung von Kanamycin.

Tabelle 5.4–1: Kanamycin MHK-Werte

Bakterienstamm bzw. Mutante	Kanamycin MHK (in µg/mL)
<i>E. coli</i> MIII	2
<i>E. coli</i> MIVa	1
<i>E. coli</i> MIVa pHPAS10-01.1	0,5
<i>E. coli</i> MIVa pHPAS10-01.2	0,5
<i>E. coli</i> MIVa pHPAS10-01.3	1
<i>E. coli</i> WT	1,5
<i>E. coli</i> WT ClpA-Ala569Argfs*12	1

Die Selektionsmutante *E. coli* MIII ist unempfindlicher gegenüber dem Aminoglykosid Kanamycin als die Mutante *E. coli* MIVa. Durch das Kontrollplasmid des Komplementationsexperimentes wird die Mutante *E. coli* MIVa noch etwas empfindlicher. Mit dem Plasmid pHPAS10-01.2 bleibt die MHK vergleichbar. Das Komplementationsplasmid pHPAS10-01.3 sorgt hingegen für einen leichten Anstieg in der Unempfindlichkeit (höherer MHK-Wert).

Bei der CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 zeigt sich im Vergleich zu dem Referenzstamm *E. coli* WT eine Erniedrigung des MHK-Wertes gegenüber Kanamycin. Damit zeigt sich diese *clpA*-Mutante etwas sensibler dem Aminoglykosid gegenüber.

5.4.3.2 Verschiedene MHK-Werte der genomischen *clpA*-Mutante

Für die genomische *clpA*-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 wurden neben der Kanamycin MHK auch verschiedene andere Antibiotika genutzt, um die jeweilige minimale Hemmkonzentration zu bestimmen. Im Vergleich wurde der Referenzstamm *E. coli* WT jeweils mitgeführt. Die Tabelle 5.4–2 gibt einen Überblick der durchgeführten MHK-Bestimmungen, die Aminoglykoside sind der Voll-

Ergebnisse

ständigkeithalber auch aufgeführt. Auch hier wurden im Anschluss an einige Vorversuche feinere Konzentrationsabstufungen der jeweiligen Antibiotika gewählt.

Tabelle 5.4–2: MHK-Werte der verschiedenen Antibiotika

Antibiotikum	Bakterienstamm bzw. Mutante	<i>E. coli</i> WT	<i>E. coli</i> WT ClpA-Ala569Argfs*12
Kanamycin		1,5 µg/mL	1 µg/mL
Amikacin		1 µg/mL	1 µg/mL
Spectinomycin		7 µg/mL	7 µg/mL
Rifampicin		9 µg/mL	9 µg/mL
Chloramphenicol		5 µg/mL	5 µg/mL
Nalidixinsäure		3 µg/mL	3 µg/mL
Ciprofloxacin		0,008 µg/mL	0,009 µg/mL

Der Unterschied der Kanamycin MHK zwischen dem Stamm *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 wurde bereits im vorherigen Kapitel 5.4.3.1 beschrieben. Für das Fluorchinolon-Antibiotikum Ciprofloxacin zeigt sich ein sehr geringer MHK-Unterschied. Die anderen Antibiotika haben dieselbe MHK für die beiden miteinander verglichenen Stämme.

5.5 Auswirkungen der *clpA*-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System gezeigt anhand des Wachstumsverhaltens

Anhand des Wachstumsverhaltens sollte der Einfluss der *clpA*-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System, welches generell einen Einfluss auf das bakterielle Wachstum nehmen kann, bzw. auf die damit zusammenhängende veränderte Überlebensrate der Bakterienzellen gezeigt werden. Wie bereits in Kapitel 3.5 erwähnt, stellt das Antitoxin MazE ein Substrat für die ATPase ClpA dar (Aizenman/Engelberg-Kulka/Glaser 1996; Gottesman et al. 1998). MazE beschreibt ein labiles Protein, welches das Antitoxin des MazEF-Systems bildet, mit einer Halbwertszeit von etwa 30 Minuten (Aizenman/Engelberg-Kulka/Glaser 1996). Im Allgemeinen handelt es sich bei MazEF neben einigen putativen um eines von acht gut charakterisierten Antitoxin-Toxin Systemen von *E. coli* (Yamaguchi/Inouye 2011). Die Antitoxin-Toxin Systeme können in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt werden, dabei wird MazEF als Typ II klassifiziert. Dies bedeutet zum einen, dass die Gene *mazE* und *mazF*, die für die jeweiligen Proteine MazE bzw. MazF codieren, in einem Operon transkribiert werden. Unter normalen Wachstumsbedingungen wird ein Komplex aus den beiden Proteinen gebildet, der keine Toxizität aufweist, da das Antitoxin die Aktivität des Toxins inhibieren kann (Lee/Lee 2016). Außerdem kann dieser Komplex bzw. das Antitoxin eigenständig als Repressor fungieren und durch die Bindung an den Promotorbereich die Transkription des Operons inhibieren.

Sowohl das labile Protein MazE als auch das stabile Protein MazF liegen als Dimer vor. Im Komplex lagert sich dann ein MazE-Dimer mit zwei MazF-Dimeren zusammen, wodurch eine gute Toxinneutralisation gewährt wird (Kamada/Hanaoka/Burley 2003; Zhang/Zhang/Inouye 2003). Bei ungünstigen Bedingungen hingegen wird die zelleigene Protease (z. B. ClpAP) aktiviert, sodass das Antitoxin abgebaut wird (Lee/Lee 2016). Das Toxin kann dadurch seine Funktion entfalten und beispielsweise als Endoribonuklease, im Beispiel von MazF, durch das Schneiden von zelleigenen mRNAs das Zellwachstum inhibieren (Muñoz-Gómez et al. 2004; Zhang et al. 2003). Auch Antibiotika können solch einen stressigen Zustand auslösen, wodurch das MazEF Antitoxin-Toxin System ebenfalls aktiviert werden kann (Sat et al. 2001). Der obere Teil der Abbildung 6.4–1 für den Wildtyp im Kapitel 6.4 der Diskussion veranschaulicht diesen Zusammenhang auch nochmal schematisch.

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens und damit des Einflusses der *clpA*-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System wurden der Stamm *E. coli* WT und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 abweichend zu den allgemeinen Angaben im Methodenkapitel 8.2.1.4 in dem Minimalmedium M9Glu angezogen und bei einer optischen Dichte $OD_{600\text{ nm}} \approx 0,4$ mit verschiedenen Antibiotika induziert. Eine uninduzierte Kontrolle beider Stämme wurde jeweils mitgeführt. Ergänzend zu den allgemeinen Angaben wurden die Proben bei 37 °C für acht Stunden im oCelloScope™ inkubiert und alle zehn Minuten wurden von der Apparatur Fotos aufgenommen (vgl. Kapitel 8.2.1.4). Als Antibiotika wurden Nalidixinsäure als Hemmstoff der DNA-Replikation, Rifampicin als Hemmstoff der Transkription und Spectinomycin als Translationshemmer eingesetzt. Für die beiden Antibiotika Rifampicin und Spectinomycin wurde von der Arbeitsgruppe von Engelberg-Kulka zuvor beschrieben, dass diese einen Einfluss auf die MazEF vermittelte Letalität haben (Sat et al. 2001). Auch das Antibiotikum Nalidixinsäure wurde in diesem Zusammenhang bereits erwähnt (Erental et al. 2014; Hazan/Sat/Engelberg-Kulka 2004). Das Wachstumsverhalten ist in den drei folgenden Kapiteln, gegliedert entsprechend des eingesetzten Antibiotikums, veranschaulicht. Da beide Bakterienstämme für die drei Antibiotika jeweils entsprechend die gleiche MHK zeigten (vgl. Kapitel 5.4.3.2), konnten zum Induzieren der beiden Stämme jeweils gleiche Konzentrationen verwendet werden.

5.5.1 Hemmung der DNA-Replikation

Zuerst wurden der Stamm *E. coli* WT und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 mit Nalidixinsäure behandelt. Nalidixinsäure zählt zu den Chinolonen und bereits im Jahr 1962 wurde seine Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien beschrieben (Lesher et al. 1962). Es hemmt die A-Untereinheit der Gyrase und verhindert dadurch die Replikation der Bakterienzelle (Sugino et al. 1977). Wie oben bereits beschrieben, erfolgte die Induktion mit Nalidixinsäure in diesem Experiment bei einer $OD_{600\text{ nm}} \approx 0,4$. Die Tageskulturen wurden jeweils geteilt und die eine Hälfte wurde mit

Ergebnisse

30 µg/mL Nalidixinsäure behandelt. Die zweite Hälfte diente als uninduzierte Kontrolle. Für acht Stunden kamen die Proben in das oCelloScope™ und im Anschluss errechnete die Software des Gerätes den Algorithmus BCA (vgl. Kapitel 8.2.1.4). Die Abbildung 5.5–1 zeigt diesen gerätespezifischen Algorithmus aufgetragen gegen die Zeit.

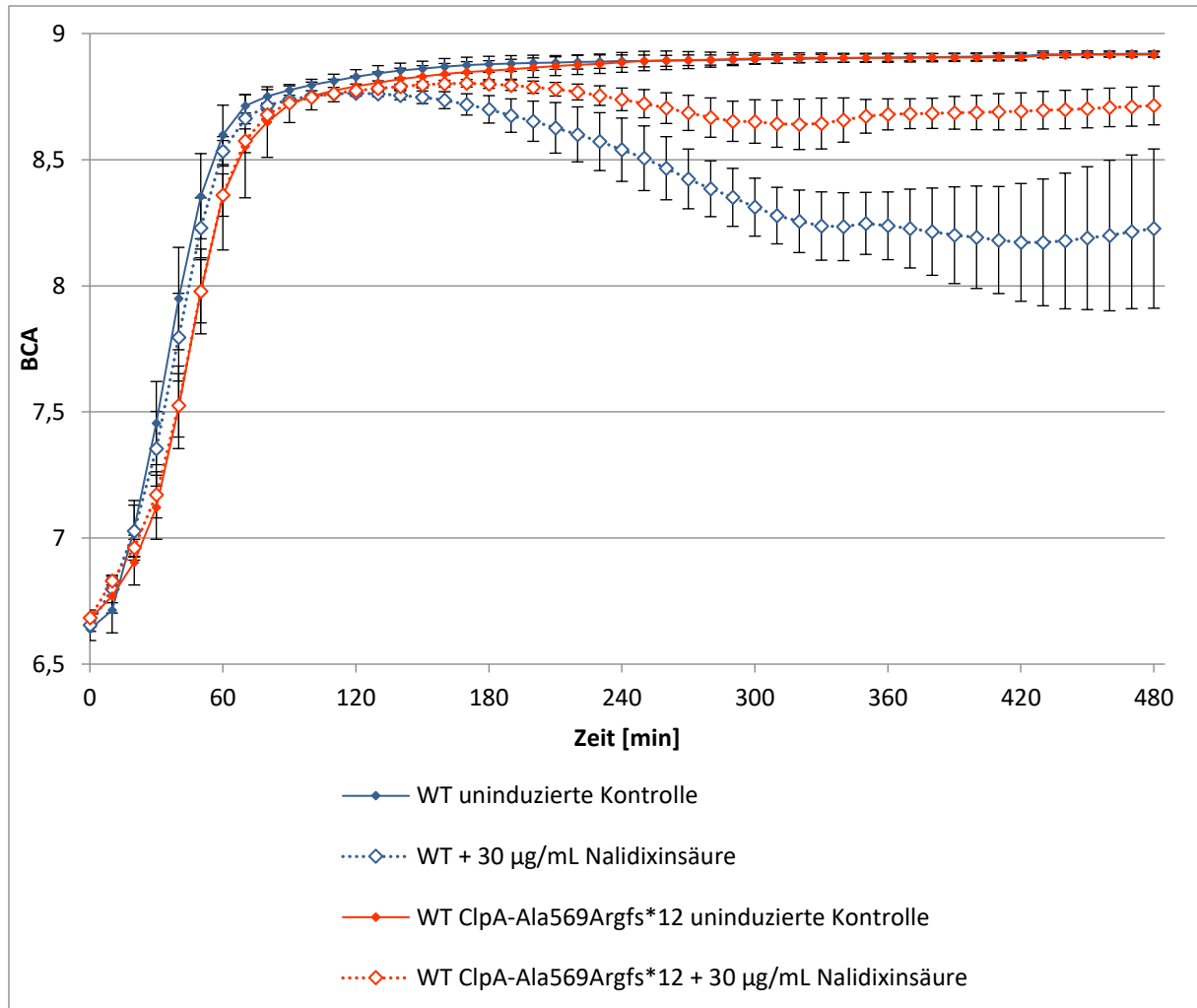


Abbildung 5.5–1: Wachstumsverhalten unter Zugabe des Antibiotikums Nalidixinsäure

Aufgetragen sind die Werte des oCelloScope™ spezifischen Algorithmus BCA gegen die Zeit in Minuten. Gemessen wurde über einen Zeitraum von acht Stunden alle zehn Minuten bei 37 °C. In Blau ist das Wachstumsverhalten des Stammes *E. coli* WT und in Rot der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 dargestellt. Die farbig ausgefüllten Rauten zeigen den Verlauf der uninduzierten Kontrollen und die nicht gefüllten Rauten den der mit Nalidixinsäure behandelten Proben. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von vier voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Neben dem Verlauf des Wachstumsverhaltens wurde auch das Wachstum zu einem definierten Zeitpunkt, nämlich nach acht Stunden nach der Induktion durch das Antibiotikum, betrachtet. Die Abbildung 5.5–2 zeigt das Säulendiagramm des Stammes *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-

Ala569Argfs*12 nach achtstündiger Inkubation mit bzw. ohne Nalidixinsäure. Der gerätespezifische Algorithmus BCA der Software des oCelloScope™ wurde wiederum für die Auswertung genutzt.

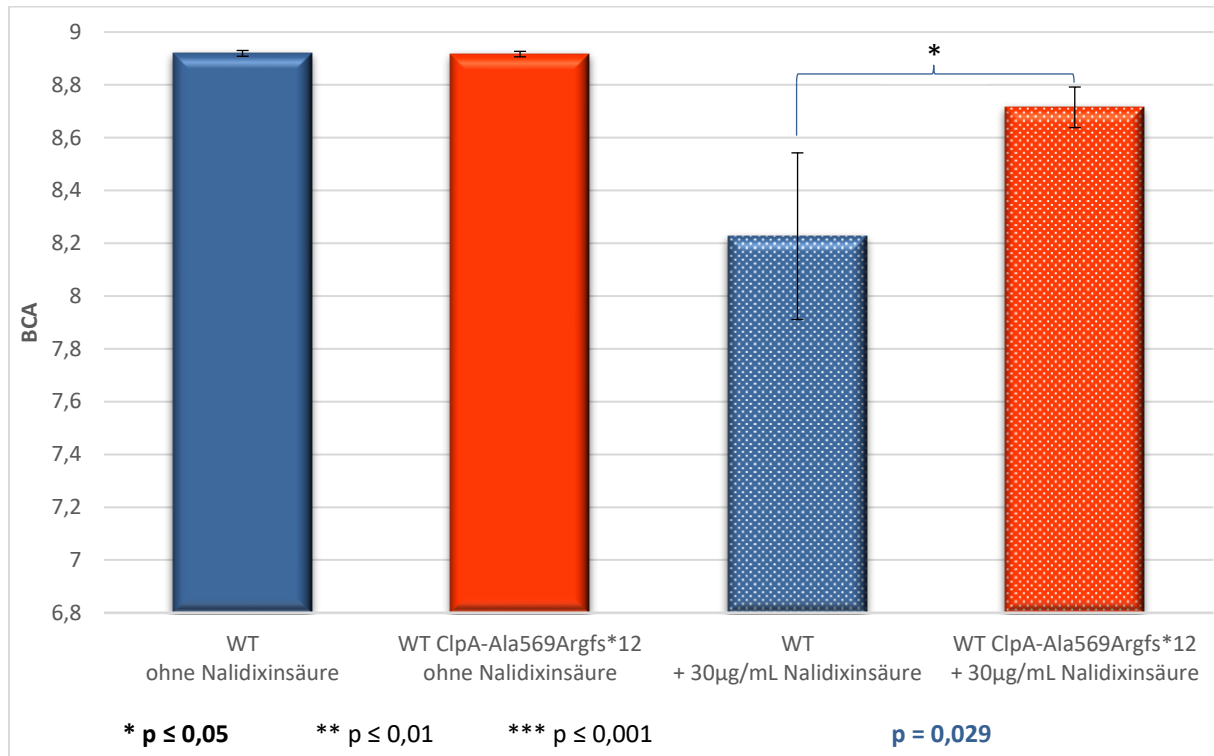


Abbildung 5.5–2: Wachstum nach acht Stunden mit bzw. ohne Nalidixinsäure

Aufgetragen sind die Werte des oCelloScope™ spezifischen Algorithmus BCA nach acht Stunden nach der Behandlung mit Nalidixinsäure für den Stamm *E. coli* WT (in Blau dargestellt) und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 (in Rot dargestellt). Die vollständig ausgefüllten Säulen zeigen die beiden Stämme ohne Antibiotikabehandlung und die gemusterten Säulen stellen die Stämme mit Nalidixinsäurebehandlung dar. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von vier voneinander unabhängigen biologischen Proben. Das Ergebnis des t-Tests mit $p = 0,029$ zeigt die Signifikanz des Unterschiedes der beiden Stämme an.

Nach acht Stunden nach der Behandlung mit Nalidixinsäure ist ein deutlicher Unterschied in der Überlebensrate des Stammes *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 zu erkennen. Zur Bestätigung wurde zunächst mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) ein Levene-Test (Levene 1960), zur Prüfung auf gleiche bzw. unterschiedliche Varianzen, und im Anschluss ein Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen durchgeführt. Das Ergebnis von $p = 0,029$ zeigt, dass sich das Wachstum nach den acht Stunden zwischen den beiden Stämmen signifikant unterscheidet und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 im Vergleich zum *E. coli* WT eine höhere Überlebensrate nach der Behandlung mit Nalidixinsäure aufzeigt.

5.5.2 Hemmung der Transkription

Der Stamm *E. coli* WT und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 wurden des Weiteren mit dem Antibiotikum Rifampicin behandelt. Rifampicin hemmt die DNA-abhängige RNA-Polymerase der Bakterien, wodurch die Transkription nicht ablaufen kann (Hartmann et al. 1967). So wie in dem Kapitel 5.5.1 für das Antibiotikum Nalidixinsäure beschrieben, wurde das Experiment auch mit dem Antibiotikum Rifampicin durchgeführt. Als Konzentration wurde 25 µg/mL gewählt, da diese bereits von der Arbeitsgruppe von Engelberg-Kulka etabliert worden war (Sat et al. 2001). Die Abbildung 5.5–3 zeigt das Wachstumsverhalten beider Stämme unter Zugabe von Rifampicin als Auftragung des oCelloScope™ gerätespezifischen Algorithmus BCA gegen die Zeit.

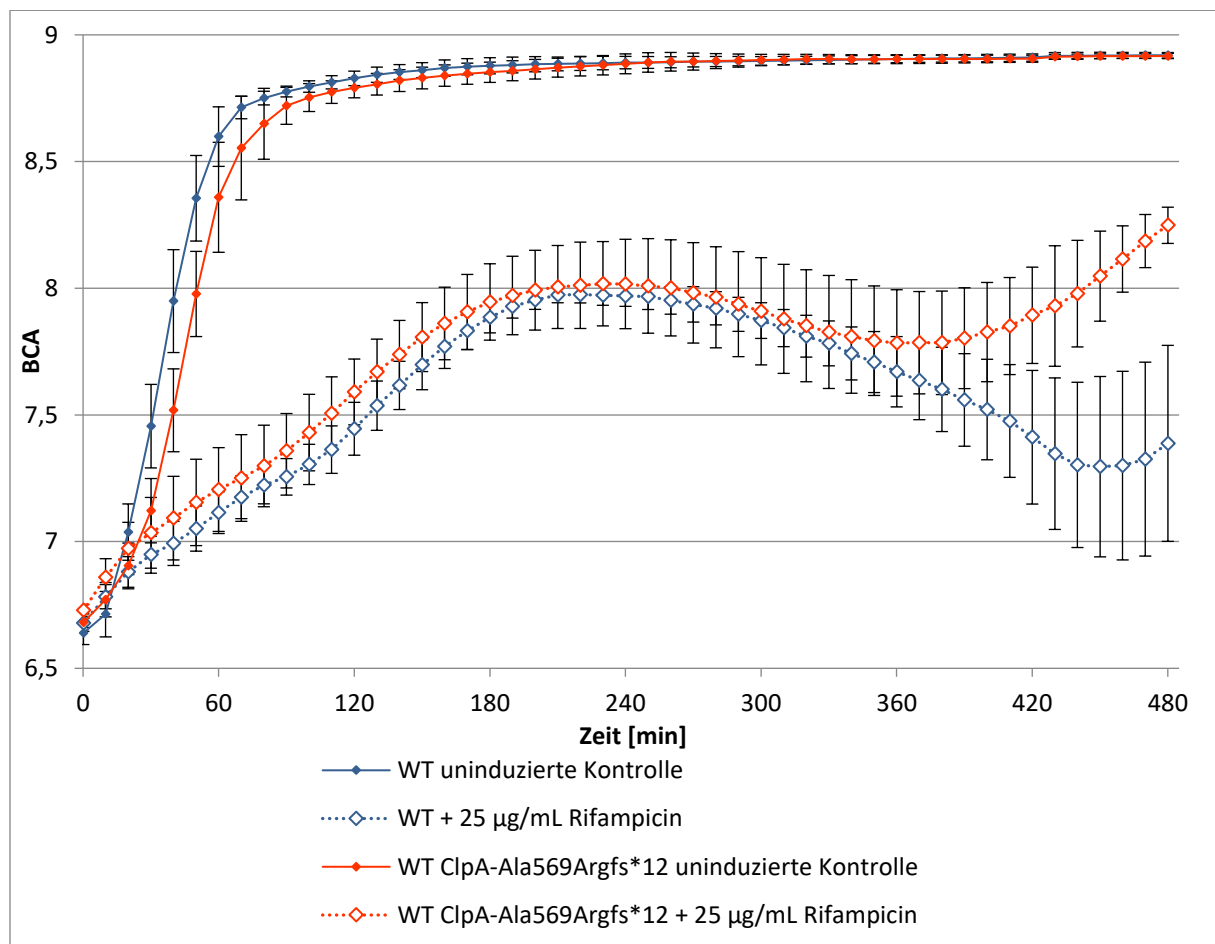


Abbildung 5.5–3: Wachstumsverhalten unter Zugabe des Antibiotikums Rifampicin

Aufgetragen sind die Werte des oCelloScope™ spezifischen Algorithmus BCA gegen die Zeit in Minuten. Gemessen wurde über einen Zeitraum von acht Stunden alle zehn Minuten bei 37 °C. In Blau ist das Wachstumsverhalten des Stammes *E. coli* WT und in Rot der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 dargestellt. Die farbig ausgefüllten Rauten zeigen den Verlauf der uninduzierten Kontrollen und die nicht gefüllten Rauten den der mit Rifampicin behandelten Proben. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von sechs voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Auch hier wurde das Wachstum nach einem definierten Zeitpunkt von acht Stunden nach der Behandlung mit Rifampicin betrachtet und in einem Säulendiagramm gegenübergestellt (vgl. Abbildung 5.5–4).

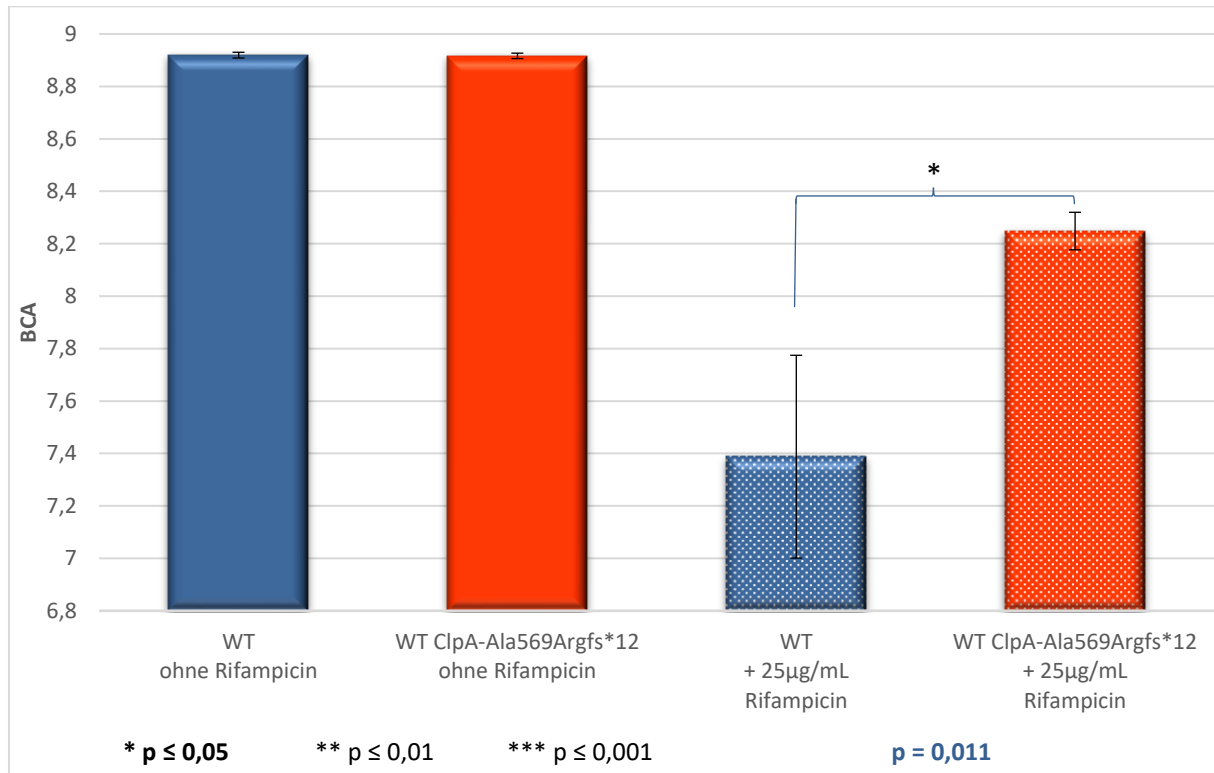


Abbildung 5.5–4: Wachstum nach acht Stunden mit bzw. ohne Rifampicin

Aufgetragen sind die Werte des oCelloScope™ spezifischen Algorithmus BCA nach acht Stunden nach der Behandlung mit Rifampicin für den Stamm *E. coli* WT (in Blau dargestellt) und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 (in Rot dargestellt). Die vollständig ausgefüllten Säulen zeigen die beiden Stämme ohne Antibiotikabehandlung und die gemusterten Säulen stellen die Stämme mit Rifampicinbehandlung dar. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von sechs voneinander unabhängigen biologischen Proben. Das Ergebnis des t-Tests mit $p = 0,011$ zeigt die Signifikanz des Unterschiedes der beiden Stämme an.

Der Unterschied in dem Wachstumsverhalten nach acht Stunden wird wiederum deutlich sichtbar. Nach dem mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) durchgeführten Levene-Test ergab sich aus dem Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen mit dem Ergebnis von $p = 0,011$ ein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate der beiden Stämme nach achtstündiger Inkubation nach Rifampicinzugabe. Die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 zeigte im Vergleich zum *E. coli* WT eine höhere Überlebensrate auf.

5.5.3 Hemmung der Translation

Zuletzt wurden, um die Auswirkungen der *clpA*-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System anhand des Wachstumsverhalten zu zeigen, der Stamm *E. coli* WT und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 mit dem dritten Antibiotikum Spectinomycin behandelt. Spectinomycin bindet an die 30S-Untereinheit der 70S-Ribosomen der Bakterien und blockiert dadurch die Proteinbiosynthese (Davies/Anderson/Davis 1965). Experimentell wurde wiederum nach demselben Prinzip verfahren, wie bereits für die Antibiotika Nalidixinsäure und Rifampicin (vgl. Kapitel 5.5.1 und 5.5.2). Zur Induktion wurde eine Konzentration von 200 µg/mL eingesetzt. Ähnlich wie bei Rifampicin, war auch diese Spectinomycinkonzentration bereits von der Arbeitsgruppe von Engelberg-Kulka etabliert worden (Sat et al. 2001). Die Abbildung 5.5–5 zeigt das Wachstumsverhalten des Stammes *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 unter Zugabe von Spectinomycin als Auftragung des oCelloScope™ gerätespezifischen Algorithmus BCA gegen die Zeit.

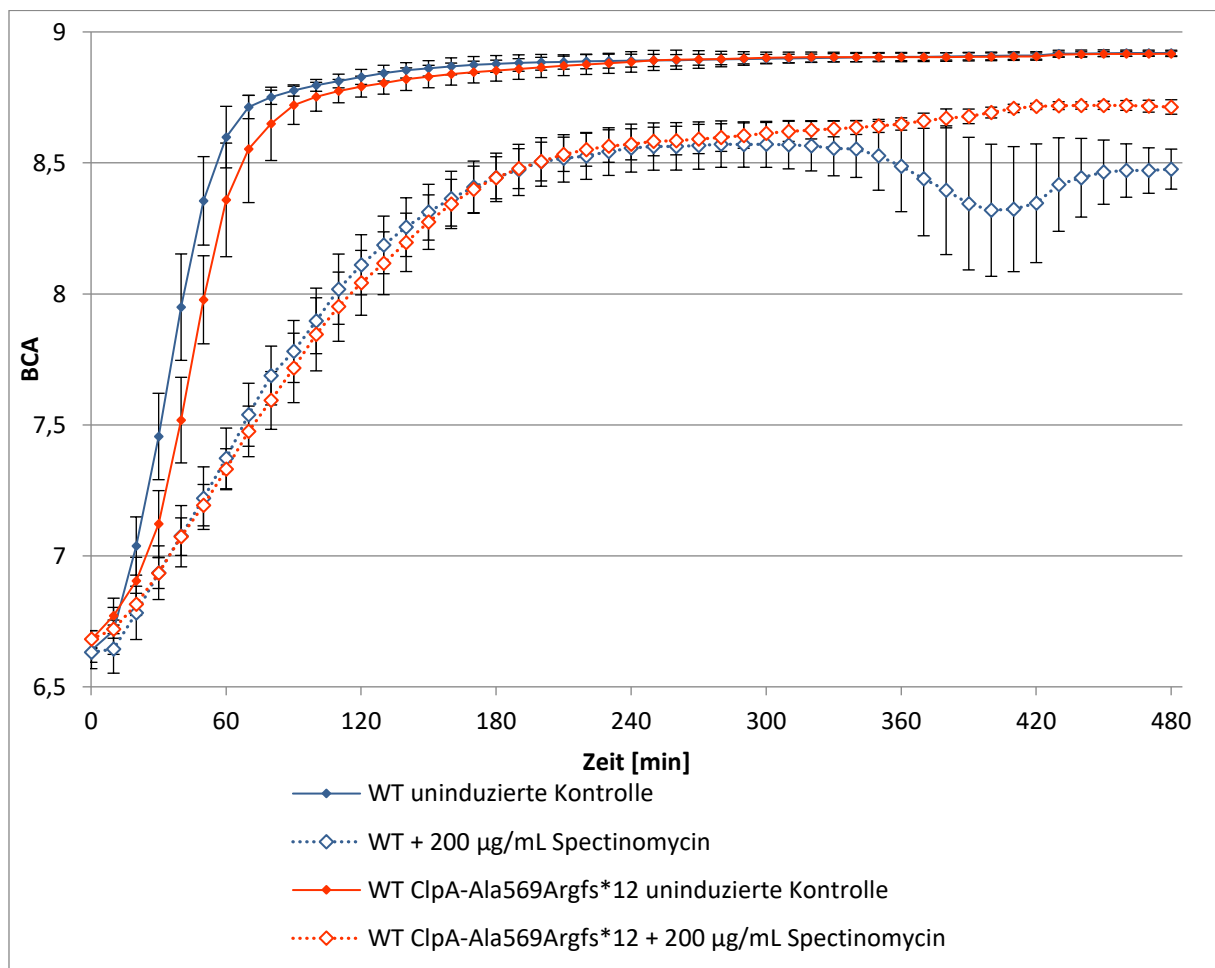


Abbildung 5.5–5: Wachstumsverhalten unter Zugabe des Antibiotikums Spectinomycin

Aufgetragen sind die Werte des oCelloScope™ spezifischen Algorithmus BCA gegen die Zeit in Minuten. Gemessen wurde über einen Zeitraum von acht Stunden alle zehn Minuten bei 37 °C. In Blau ist das Wachstumsverhalten des Stammes *E. coli* WT und in Rot der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 dargestellt. Die farbig ausgefüllten Rauten zeigen den Verlauf

der uninduzierten Kontrollen und die nicht gefüllten Rauten den der mit Spectinomycin behandelten Proben. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von sechs voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Die Abbildung 5.5–6 zeigt in einem Säulendiagramm das Wachstum des Stammes *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 zu dem definierten Zeitpunkt von acht Stunden nach der Behandlung mit Spectinomycin.

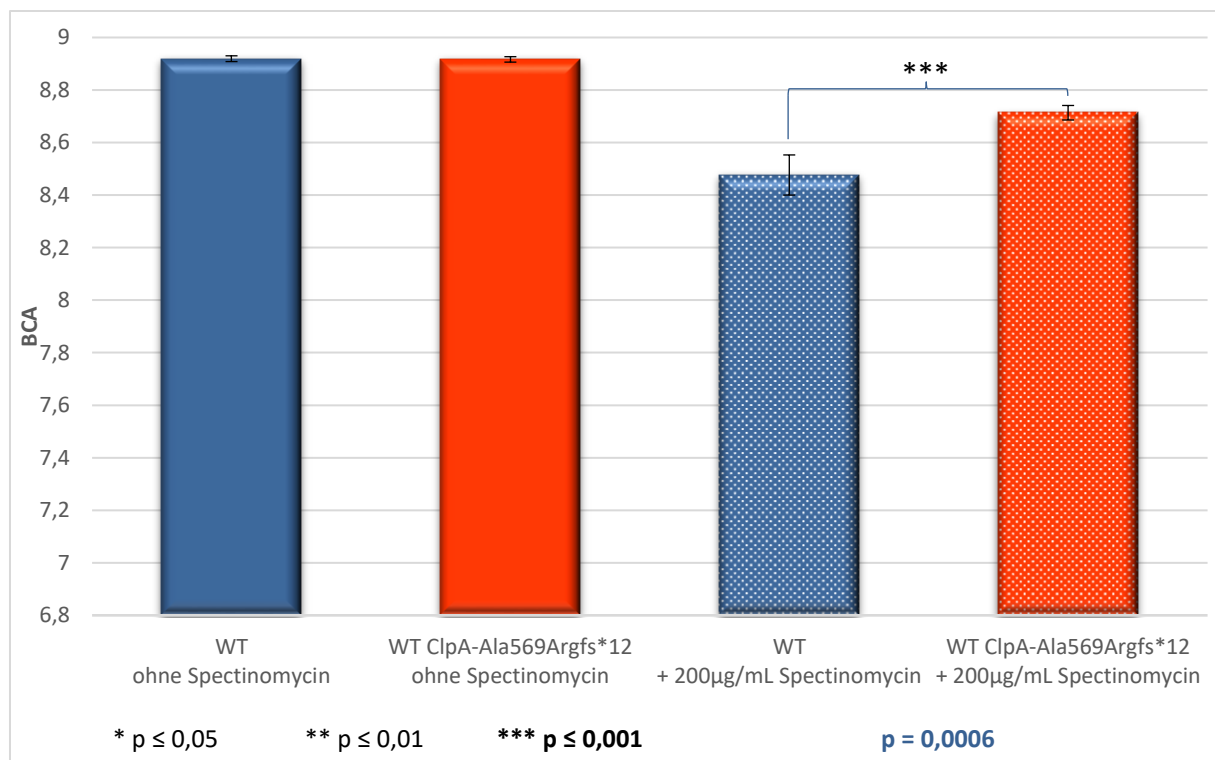


Abbildung 5.5–6: Wachstum nach acht Stunden mit bzw. ohne Spectinomycin

Aufgetragen sind die Werte des oCelloScope™ spezifischen Algorithmus BCA nach acht Stunden nach der Behandlung mit Spectinomycin für den Stamm *E. coli* WT (in Blau dargestellt) und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 (in Rot dargestellt). Die vollständig ausgefüllten Säulen zeigen die beiden Stämme ohne Antibiotikabehandlung und die gemusterten Säulen stellen die Stämme mit Spectinomycinbehandlung dar. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von sechs voneinander unabhängigen biologischen Proben. Das Ergebnis des t-Tests mit $p = 0,0006$ zeigt die Signifikanz des Unterschiedes der beiden Stämme an.

Auch nach der Behandlung mit dem Antibiotikum Spectinomycin ist nach den acht Stunden Inkubationszeit ein Unterschied im Wachstum zu erkennen. Der mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) durchgeführte Levene-Test ergab, dass gleiche Varianzen vorliegen, sodass im Anschluss ein Zweistichproben t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen durchgeführt wurde. Mit dem Ergebnis von $p = 0,0006$ liegt ein deutlich signifikanter Unterschied in der Überlebensrate der beiden Stämme un-

ter Spectinomycinbehandlung vor. Die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 zeigte im Vergleich zum *E. coli* WT eine höhere Überlebensrate nach der achtstündigen Inkubation auf.

5.6 Auswirkungen der *clpA*-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System anhand von Expressionsanalysen

Neben der Analyse des Wachstumsverhaltens (vgl. Kapitel 5.5) sollten die Auswirkungen der *clpA*-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System auch anhand von Expressionsanalysen untersucht werden. Dazu wurde methodisch die quantitative *real-time* PCR (RT-qPCR) (vgl. Kapitel 8.2.3.4) genutzt. Wie in dem vorherigen Kapitel 5.5 bereits beschrieben, handelt es sich bei MazF, dem stabilen Toxin des MazEF Antitoxin-Toxin System, um eine Endoribonuklease (Muñoz-Gómez et al. 2004; Zhang et al. 2003). MazF kann daher an einigen bestimmten Stellen in den meisten mRNAs schneiden. Es werden dementsprechend auch die Transkripte von ribosomalen Proteinen gespalten, wodurch die Ribosomen-Biogenese gestört wird (Culviner/Laub 2018). Culviner und Laub zeigten, dass sowohl *upstream* des Gens *rplJ*, welches für das ribosomale Protein L10 der 50S-Untereinheit codiert, als auch im Gen *rplJ* Erkennungsstellen für das Toxin MazF liegen (Culviner/Laub 2018). In RT-qPCR Analysen wurde daher das Operon mit den Genen *rplJ*, *rplL*, *rpoB* und *rpoC* untersucht. Für diese Untersuchungen wurden zum einen der Bakterienstamm *E. coli* WT und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 und zum anderen die Mutanten *E. coli* MIII, *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa verwendet. Eine Tageskultur dieser fünf Stämme bzw. Mutanten wurde jeweils für alle drei voneinander unabhängigen, biologischen Proben bis zu einer optischen Dichte von etwa $OD_{600\text{ nm}} \approx 0,5$ herangezogen (vgl. Kapitel 8.2.3.1). Die anschließende Isolierung der Gesamt-RNA, die Qualitätsbestimmung dieser RNA und die cDNA-Synthese erfolgte, wie diese Methoden in den Kapiteln 8.2.3.2, 8.2.3.3 bzw. 8.2.3.4.2 beschrieben sind. Die für die quantitative *real-time* PCR (qPCR) eingesetzten Oligonukleotide sind in der Tabelle 8.1–3 aufgeführt und anhand von Kapitel 8.2.3.4.1 entwickelt worden. Zwei Oligonukleotide zur Untersuchung des Gens *rplJ* wurden als Ausnahme nicht selbst anhand der Software „Primer Express® for Real-Time PCR, Version 3.0“ konzipiert, sondern die Oligonukleotidsequenz wurde aus dem Paper (Culviner/Laub 2018) übernommen. Das Oligonukleotid *rplJ_5_-19_RT_HPLC* entspricht dem Primer qPC149 und das Oligonukleotid *rplJ_3_59_RT_HPLC* dem Primer qPC150 (Culviner/Laub 2018, Table S6). Im Anschluss erfolgte die qPCR inklusive der Auswertung anhand der Kapitel 8.2.3.4.3 und 8.2.3.4.4. Als Referenzgen war bereits im Arbeitskreis für die verwendeten Stämme unter normalen Wachstumsbedingungen das Gen *dnaQ* etabliert worden, welches dementsprechend auch für diese Expressionsanalysen genutzt wurde. Sämtliche Rohdaten (Ct-Werte) zur quantitative *real-time* PCR (RT-qPCR) sind im Anhang im Kapitel 10.6.1 aufgeführt. Die folgende Abbildung 5.6–1 zeigt die relative Genexpression als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (vgl.

Kapitel 8.2.3.4.4) der einzelnen Gene des Operons in Bezug auf das Referenzgen *dnaQ* und den Bakterienstamm *E. coli* WT. Für das Gen *rplJ* wurden zwei verschiedene Primerpaare eingesetzt: Zum einen *rplJ_5_-19_RT_HPLC* und *rplJ_3_59_RT_HPLC*, welche von Culviner und Laub übernommen wurden. Die Expression wurde unter *rplJ 1* aufgetragen. Zum anderen wurde das im Gen bindende Primerpaar *rplJ_5_298_RT_HPLC* und *rplJ_3_357_RT_HPLC* verwendet, gekennzeichnet mit *rplJ 2*.

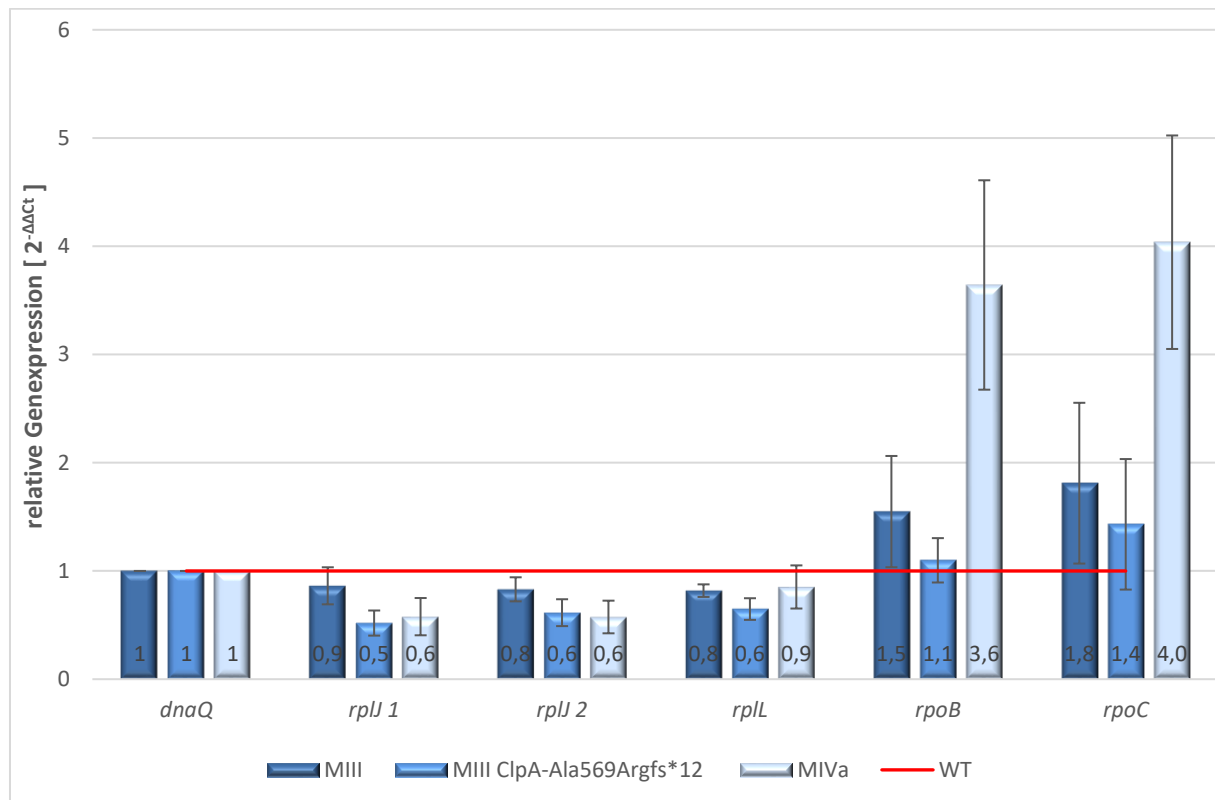


Abbildung 5.6–1: Relative Genexpression des Operons mit den Genen *rplJ*, *rplL*, *rpoB* und *rpoC* bezogen auf *E. coli* WT. Aufgetragen ist die relative Genexpression, berechnet als $2^{-\Delta\Delta C_t}$, für die Gene *rplJ*, *rplL*, *rpoB* und *rpoC*. Für das Gen *rplJ* wurden zwei Primerpaare verwendet, hier mit *rplJ 1* und *rplJ 2* gekennzeichnet. Als Referenzgen dient *dnaQ*, bei dem die relative Genexpression auf eins festgelegt wurde. Der Stamm *E. coli* WT wurde als Referenzstamm auch mit einer relativen Genexpression von eins definiert (rote Linie). Die dunkelblauen Säulen beschreiben die Mutante *E. coli* MIII, die mittelblauen die Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und die hellblauen Säulen die Mutante *E. coli* MIVa. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Die Tabelle 5.6–1 zeigt die zu Abbildung 5.6–1 gehörigen Ergebnisse der relativen Genexpression mit der zugehörigen Standardabweichung des Operons mit den Genen *rplJ*, *rplL*, *rpoB* und *rpoC*. Außerdem ist der p-Wert des Zweistichproben t-Tests, jeweils bezogen auf *E. coli* WT, aufgeführt. Berechnet wurden diese Werte mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) und bei $p < 0,05$ wurde von einer statistischen Signifikanz ausgegangen.

Ergebnisse

Tabelle 5.6–1: Relative Genexpression des Operons mit den Genen *rplJ*, *rplL*, *rpoB* und *rpoC* bezogen auf *E. coli* WT

Gen	<i>E. coli</i> Mutante	Relative Genexpression $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Standardabweichung	p-Wert
<i>rplJ</i> 1	MIII	0,863	0,171	0,150
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12	0,519	0,116	0,009
	MIVa	0,578	0,172	0,026
<i>rplJ</i> 2	MIII	0,830	0,111	0,059
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12	0,615	0,124	0,016
	MIVa	0,575	0,151	0,020
<i>rplL</i>	MIII	0,818	0,058	0,016
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12	0,648	0,010	0,013
	MIVa	0,852	0,199	0,164
<i>rpoB</i>	MIII	1,549	0,514	0,103
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12	1,099	0,205	0,246
	MIVa	3,642	0,967	0,021
<i>rpoC</i>	MIII	1,811	0,742	0,100
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12	1,431	0,603	0,171
	MIVa	4,037	0,986	0,017

Generell liegt die relative Genexpression für die beiden Gene *rplJ* und *rplL* für die drei Mutanten *E. coli* MIII, *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa unter der des Stammes *E. coli* WT. Sobald eine *clpA*-Mutation vorliegt, das betrifft die Mutanten *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa, ist diese verringerte Genexpression für *rplJ* signifikant. Die Gene *rpoB* und *rpoC* werden hingegen stärker exprimiert, vor allem die Mutante *E. coli* MIVa zeigt eine deutlich höhere relative Genexpression im Vergleich zum *E. coli* WT. Die Betrachtung der p-Werte bestätigt die Signifikanz der erhöhten Genexpression bei der Mutante *E. coli* MIVa im Vergleich zu dem Wildtypstamm.

Zur besseren Betrachtung der Auswirkungen der *clpA*-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System wurden zwei einzelne Säulendiagramme erstellt. Die relative Genexpression der vermessenen Gene wurde von der Mutante *E. coli* MIII, welche keine *clpA*-Mutation aufweist, zum einen im Vergleich zur Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 (vgl. Abbildung 5.6–2) und zum anderen im Vergleich zur Mutante *E. coli* MIVa (vgl. Abbildung 5.6–3) aufgetragen.

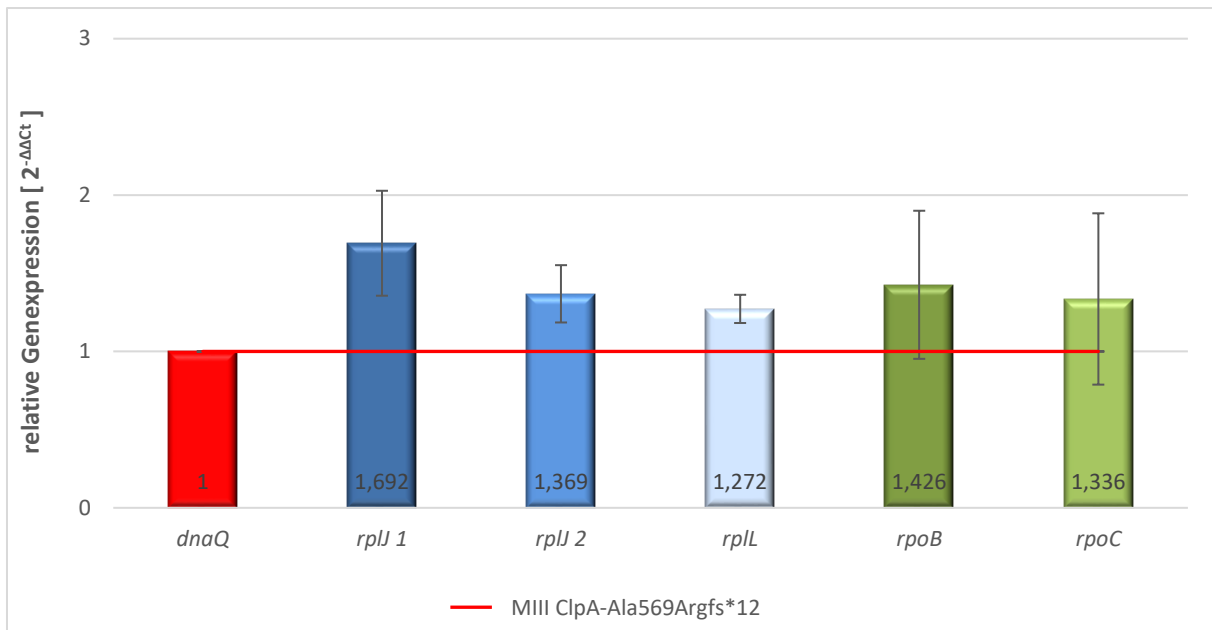


Abbildung 5.6–2: Relative Genexpression des Operons mit den Genen *rplJ*, *rplL*, *rpoB* und *rpoC* der Mutante *E. coli* MIII bezogen auf *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12

Aufgetragen ist die relative Genexpression, berechnet als $2^{-\Delta\Delta C_t}$, für die Gene *rplJ*, *rplL*, *rpoB* und *rpoC*. Für das Gen *rplJ* wurden zwei Primerpaare verwendet, hier mit *rplJ* 1 und *rplJ* 2 gekennzeichnet. Als Referenzgen dient *dnaQ*, bei dem die relative Genexpression auf eins festgelegt wurde. Die Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 wurde als Referenzstamm auch mit einer relativen Genexpression von eins definiert (rote Linie). Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen biologischen Proben.

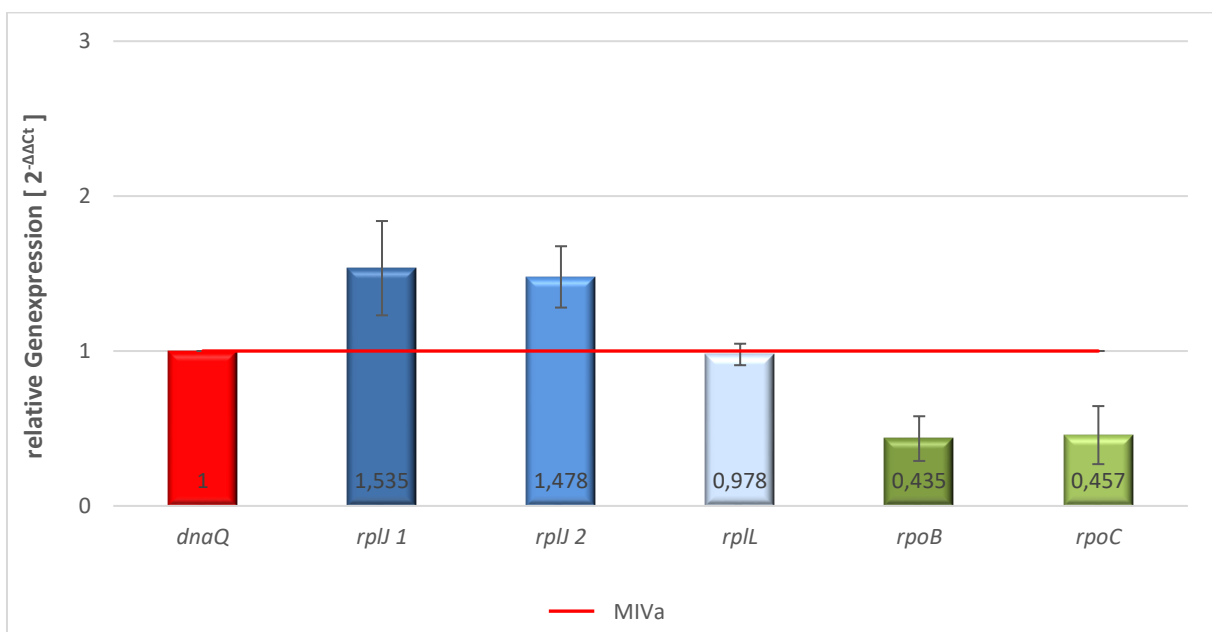


Abbildung 5.6–3: Relative Genexpression des Operons mit den Genen *rplJ*, *rplL*, *rpoB* und *rpoC* der Mutante *E. coli* MIII bezogen auf *E. coli* MIVa

Aufgetragen ist die relative Genexpression, berechnet als $2^{-\Delta\Delta C_t}$, für die Gene *rplJ*, *rplL*, *rpoB* und *rpoC*. Für das Gen *rplJ* wurden zwei Primerpaare verwendet, hier mit *rplJ* 1 und *rplJ* 2 gekennzeichnet. Als Referenzgen dient *dnaQ*, bei dem die relative Genexpression auf eins festgelegt wurde. Die Mutante *E. coli* MIVa wurde als Referenzstamm auch mit einer relativen Genexpression von eins definiert (rote Linie). Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Ergebnisse

In der Abbildung 5.6–2 und der Abbildung 5.6–3 wird deutlich, dass die relative Genexpression von *rplJ* erhöht ist, sobald keine *clpA*-Mutation vorliegt. Dies wird mit beiden verwendeten *rplJ*-Primerpaaren deutlich. Andersherum gesagt wird durch die *clpA*-Mutation die relative Genexpression von *rplJ* gemindert. Die Unterschiede in der Genexpression von *rplL* sind zwischen den beiden Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 deutlicher zu sehen als in Bezug auf die Mutante *E. coli* MIVa. Wie bereits in der Abbildung 5.6–1 gezeigt, wird auch hier die unterschiedliche Genexpression der Gene *rpoB* und *rpoC* deutlich.

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz dieser Unterschiede der relativen Genexpression wurde mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) der Levene-Test und im Anschluss ein Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen durchgeführt. Die Ergebnisse der p-Werte dazu sind in der folgenden Tabelle 5.6–2 gegenübergestellt. Bei $p < 0,05$ konnte von einer statistischen Signifikanz ausgegangen werden.

Tabelle 5.6–2: Ergebnisse des Zweistichproben t-Tests als p-Werte als Maß der statistischen Signifikanz

Gen	<i>E. coli</i> Mutanten	<i>E. coli</i> MIII bezogen auf <i>E. coli</i> MIII ClpA-Ala569Argfs*12 (vgl. Abbildung 5.6–2)	<i>E. coli</i> MIII bezogen auf <i>E. coli</i> MIVa (vgl. Abbildung 5.6–3)
<i>rplJ</i> 1		0,035	0,047
<i>rplJ</i> 2		0,037	0,026
<i>rplL</i>		0,017	0,317
<i>rpoB</i>		0,130	0,011
<i>rpoC</i>		0,200	0,019

Wie der Tabelle 5.6–2 zu entnehmen ist, sind die Unterschiede der relativen Genexpression für *rplJ* generell signifikant. Für das Gen *rplL* ist die Expression nur im Vergleich der Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 signifikant unterschiedlich. Bei den beiden Genen *rpoB* und *rpoC* zeigt sich für die Mutante *E. coli* MIVa eine statistisch signifikante veränderte Genexpression.

Mit dem Bakterienstamm *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 wurden auch RT-qPCR Untersuchungen durchgeführt. Wiederum wurde das Gen *rplJ* verwendet und zusätzlich das Gen *upp*. Beide Gene wurden bereits im Zusammenhang mit dem MazEF Antitoxin-Toxin System und damit einhergehendem veränderten Expressionsverhalten beschrieben (Culviner/Laub 2018). Das Säulendiagramm in Abbildung 5.6–4 zeigt die relative Genexpression dieser beiden Gene in Bezug auf das Referenzgen *dnaQ* und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12.

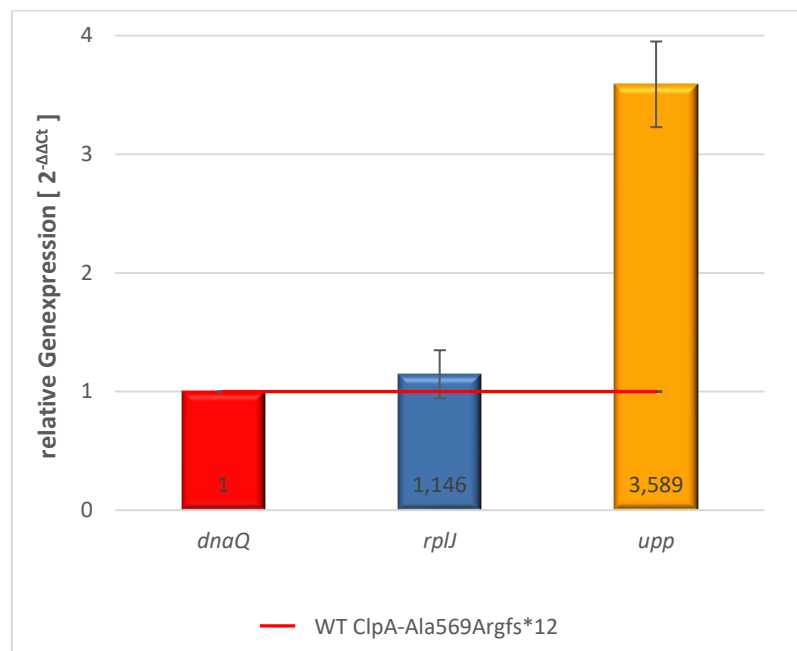


Abbildung 5.6–4: Relative Genexpression der Gene *rplJ* und *upp* von *E. coli* WT bezogen auf *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12. Aufgetragen ist die relative Genexpression, berechnet als $2^{-\Delta\Delta C_t}$, für die Gene *rplJ* und *upp*. Für das Gen *rplJ* wurde hier nur ein Primerpaar verwendet, dieses entspricht dem Paar *rplJ* 1 in den vorherigen Diagrammen. Als Referenzgen dient *dnaQ*, bei dem die relative Genexpression auf eins festgelegt wurde. Die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 wurde als Referenzstamm auch mit einer relativen Genexpression von eins definiert (rote Linie). Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Die relative Genexpression von *rplJ*, verwendet wurden die Oligonukleotide *rplJ*_5_-19_RT_HPLC und *rplJ*_3_59_RT_HPLC (\cong *rplJ* 1), ist in dem Stamm *E. coli* WT im Vergleich zum Referenzstamm *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 erhöht, jedoch nicht signifikant. Der mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) durchgeführte Zweistichproben t-Test ergibt ein $p = 0,34$. Das Gen *upp* wird dagegen im Wildtyp deutlich stärker exprimiert als bei der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12, bei dem eine *clpA*-Mutation vorliegt. In dem Zweistichproben t-Test wurde ein p -Wert von 0,006 ermittelt. Die hier verwendeten Oligonukleotide *upp*_5_28_RT_HPLC und *upp*_3_152_RT_HPLC sind ebenfalls von Culviner und Laub übernommen worden und entsprechen den Primern qPC145 und qPC146 (Culviner/Laub 2018, Table S6).

5.7 Auswirkungen der *clpA*-Mutation im Zusammenhang mit ROS anhand von Expressionsanalysen

Des Weiteren sollten die Auswirkungen der *clpA*-Mutation auch im Zusammenhang mit reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species* (ROS)) anhand von Expressionsanalysen untersucht werden. Ebenso wie bei dem Zusammenhang mit dem MazEF Antitoxin-Toxin System im Kapitel 5.6 wurde hier methodisch die quantitative *real-time* PCR (RT-qPCR) (vgl. Kapitel 8.2.3.4) genutzt. Anhand der Thesen von Sen *et al.*, dass nur eine bestimmte Menge an freiem Eisen in der Zelle vorliegen darf, um zum einen vor DNA-Läsionen durch in der Fenton-Reaktion (Fenton 1894) gebildeten Hydroxyl-Radikale (Haber/Weiss 1934) zu schützen, andererseits jedoch eine bestimmte Menge vorliegen muss, um oxidierte Eisen-Schwefel-Cluster wieder regenerieren zu können (Sen/Zhou/Imlay 2020), wurden verschiedene Gene in diesem Zusammenhang in Expressionsanalysen untersucht. Das Ferritin-ähnliche Protein Dps neutralisiert freies Eisen, sodass die Fenton-Reaktion vermindert abläuft (Zhao *et al.* 2002). Als Ausgleich, um genügend freies Eisen für die Regeneration der Eisen-Schwefel-Cluster vorliegen zu haben, können die Proteasen Clp(S)AP und ClpXP, die Dps abbauen können, als eine Art Puffer-System fungieren (Sen/Zhou/Imlay 2020). Es galt dementsprechend als erstes zu überprüfen, ob durch das Vorliegen einer *clpA*-Mutation, welche zum Ausfall der Protease ClpAP führt, die zweite ATPase ClpX des Protease-Komplexes verstärkt exprimiert wird.

Generell wurden für die Untersuchungen der Auswirkungen der *clpA*-Mutation im Zusammenhang mit ROS der Bakterienstamm *E. coli* WT und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 bzw. die Mutanten *E. coli* MIII, *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa verwendet. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige, biologische Proben herangezogen (vgl. Kapitel 8.2.3.1). Im Anschluss erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA, die Qualitätsbestimmung dieser RNA und die cDNA-Synthese, wie diese Methoden in den Kapiteln 8.2.3.2, 8.2.3.3 bzw. 8.2.3.4.2 beschrieben sind. Die für die quantitative *real-time* PCR (qPCR) eingesetzten Oligonukleotide (vgl. Kapitel 8.2.3.4.1) sind jeweils der Tabelle 8.1–3 zu entnehmen. Im Anschluss erfolgte die qPCR inklusive der Auswertung anhand der Kapitel 8.2.3.4.3 und 8.2.3.4.4. Als Referenzgen für diese Expressionsanalysen diente wiederum das für die verwendeten Stämme unter normalen Wachstumsbedingungen bereits etablierte Gen *dnaQ*. Sämtliche Rohdaten (Ct-Werte) zur quantitativen *real-time* PCR (RT-qPCR) sind im Anhang im Kapitel 10.6.2 aufgeführt.

Die folgende Abbildung 5.7–1 zeigt die relative Genexpression als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (vgl. Kapitel 8.2.3.4.4) von *clpX*, welches für die, neben der ATPase ClpA, zweite vorkommende ATPase ClpX codiert, in Bezug auf das Referenzgen *dnaQ* und den Bakterienstamm *E. coli* WT.

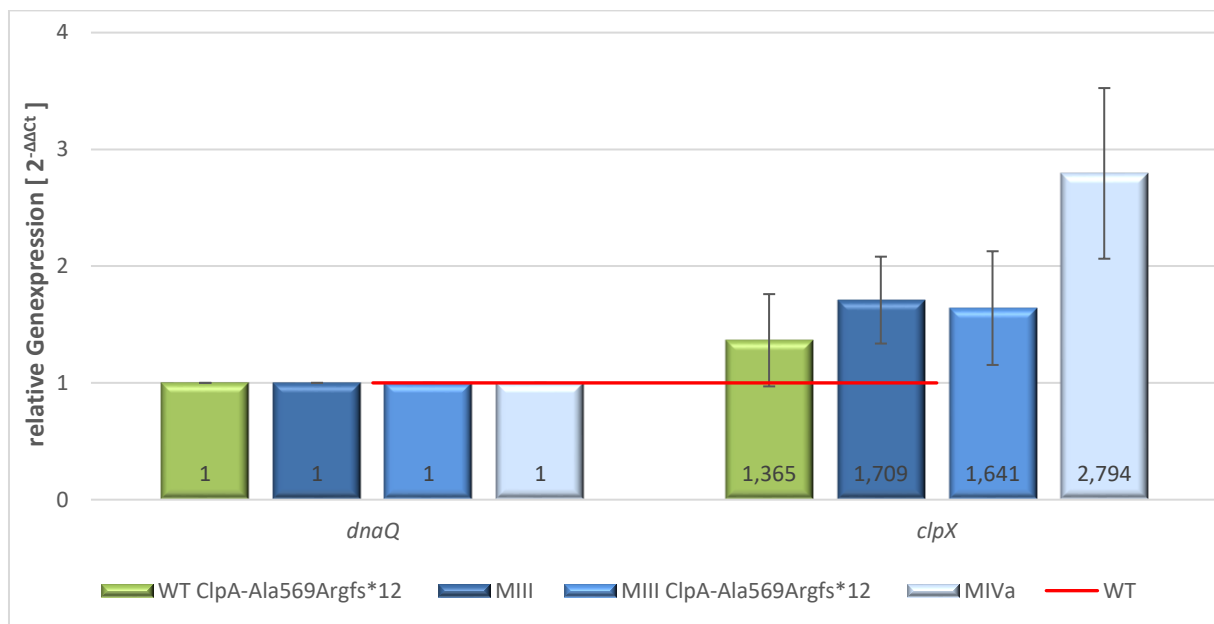


Abbildung 5.7–1: Relative Genexpression des Gens *clpX* bezogen auf *E. coli* WT

Aufgetragen ist die relative Genexpression, berechnet als $2^{-\Delta\Delta C_t}$, für das Gen *clpX*. Als Referenzgen dient *dnaQ*, bei dem die relative Genexpression auf eins festgelegt wurde. Der Stamm *E. coli* WT wurde als Referenzstamm auch mit einer relativen Genexpression von eins definiert (rote Linie). Die grünen Säulen beschreiben die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12, die dunkelblauen die Mutante *E. coli* MIII, die mittelblauen die Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und die hellblauen Säulen die Mutante *E. coli* MIVa. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Durch das Vorliegen der *clpA*-Mutation in der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 wird das Gen *clpX* etwas stärker exprimiert, jedoch nicht signifikant, im Vergleich zum Stamm *E. coli* WT. Dies bestätigt auch der mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) durchgeführte Zweistichproben t-Test ($p = 0,25$, damit $> 0,05$). Auch bei der Betrachtung der Mutanten *E. coli* MIII, *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa untereinander ist kein signifikanter Unterschied in der relativen Genexpression von *clpX* zu verzeichnen. In den Zweistichproben t-Tests liegt der p-Wert jeweils über 0,05, und zwar bei 0,86 zwischen *E. coli* MIII und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 bzw. bei 0,08 zwischen *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa.

Im Anschluss war von Interesse, ob die Bakterienzelle als Ausgleich den Auswirkungen der *clpA*-Mutation und dem damit einhergehenden verminderten Abbau von Dps und dem dadurch niedrigeren Gehalt an freiem Eisen, welches weniger für die Regenerierung der oxidierten Eisen-Schwefel-Cluster zur Verfügung stand, entgegenwirken konnte. Als potenzielle Möglichkeit einer Gegenregulation wurde die Expression der Katalasen und Peroxidasen geprüft. Bei einer Aufregulation dieser, könnte mehr H_2O_2 eliminiert werden, das wiederum vor der verstärkten Oxidation von Eisen-Schwefel-Clustern schützt (Sen/Zhou/Imlay 2020). Aufgrund von im Arbeitskreis vorliegenden, bis-

Ergebnisse

lang unveröffentlichten Daten einer Transkriptomanalyse der zum Teil auch hier untersuchten Stämme (Heisig, A., Groth, P., persönliche Mitteilung), wurde zuerst die relative Genexpression von *katE*, welches für die Katalase bzw. Hydroperoxidase II codiert, untersucht. Die Abbildung 5.7–2 zeigt die relative Genexpression als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ von *katE* in Bezug auf das Referenzgen *dnaQ* und den Bakterienstamm *E. coli* WT (links) bzw. *E. coli* MIII (rechts).

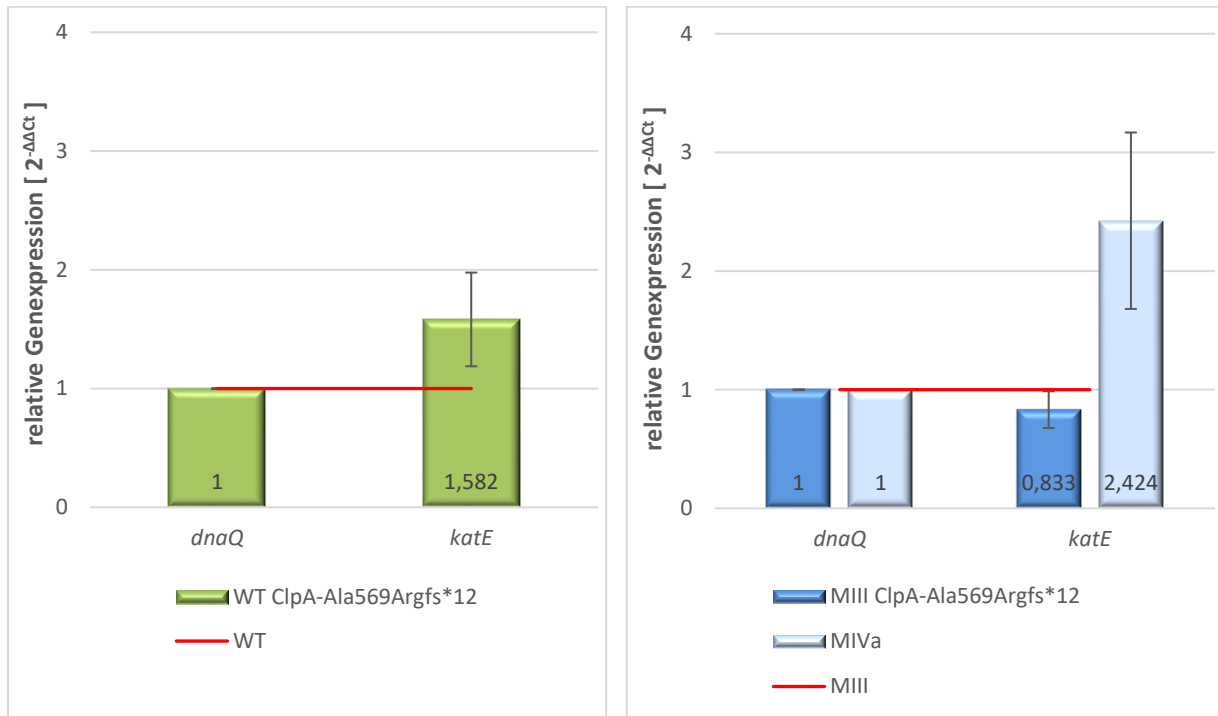


Abbildung 5.7–2: Relative Genexpression des Gens *katE* bezogen auf *E. coli* WT (links) bzw. *E. coli* MIII (rechts) Aufgetragen ist die relative Genexpression, berechnet als $2^{-\Delta\Delta Ct}$, für das Gen *katE*. Als Referenzgen dient *dnaQ*, bei dem die relative Genexpression auf eins festgelegt wurde. Der Stamm *E. coli* WT im linken Säulendiagramm bzw. die Mutante *E. coli* MIII im rechten Säulendiagramm wurden jeweils als Referenzstamm auch mit einer relativen Genexpression von eins definiert (jeweils die rote Linie). Die grünen Säulen beschreiben die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12, die mittelblauen die Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und die hellblauen Säulen die Mutante *E. coli* MIVa. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen biologischen Proben.

In der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 wird das Gen *katE* im Vergleich zum Stamm *E. coli* WT stärker exprimiert. Statistisch gesehen ist der Anstieg der relativen Genexpression noch nicht stark genug, um von einer Signifikanz auszugehen, der p-Wert des mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) durchgeführten Zweistichproben t-Tests liegt bei 0,06 und damit noch leicht über 0,05. Bei der Betrachtung der Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa kann bei einem p-Wert von 0,04 von einer statistischen Signifikanz ausgegangen werden.

Im Anschluss an die Expressionsanalysen zu *katE*, wurden auch die weiteren Katalasen bzw. Peroxidasen untersucht. Dazu wurden die Gene *katG*, codiert für die Katalase bzw. Hydroperoxidase I, *ahpC* und *ahpF*, welche jeweils für die beiden Komponenten der Peroxidase bzw. der Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase codieren, verwendet. Die Abbildung 5.7–3 zeigt die relative Genexpression als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ von *katG*, *ahpC* und *ahpF* in Bezug auf das Referenzgen *dnaQ* und den Bakterienstamm *E. coli* WT. Zum Vergleich wurde auch die Genexpression von *katE* dem Säulendiagramm hinzugefügt.

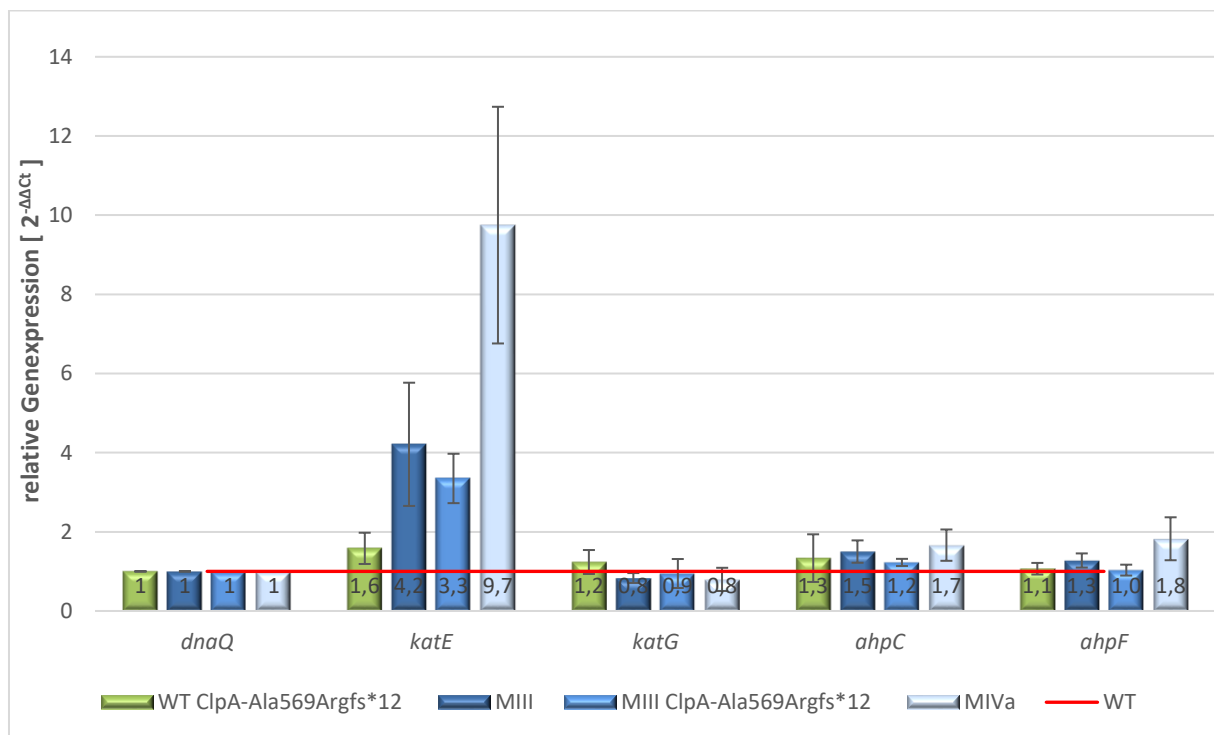


Abbildung 5.7–3: Relative Genexpression der Katalasen bzw. Peroxidasen bezogen auf *E. coli* WT

Aufgetragen ist die relative Genexpression, berechnet als $2^{-\Delta\Delta Ct}$, für die Gene *katE*, *katG*, *ahpC* und *ahpF*. Als Referenzgen dient *dnaQ*, bei dem die relative Genexpression auf eins festgelegt wurde. Der Stamm *E. coli* WT wurde als Referenzstamm auch mit einer relativen Genexpression von eins definiert (rote Linie). Die grünen Säulen beschreiben die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12, die dunkelblauen die Mutante *E. coli* MIII, die mittelblauen die Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und die hellblauen Säulen die Mutante *E. coli* MIVa. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Die Tabelle 5.7–1 zeigt die zu Abbildung 5.7–3 gehörigen Ergebnisse der relativen Genexpression mit der zugehörigen Standardabweichung für die Gene *katE*, *katG*, *ahpC* und *ahpF*. Außerdem ist der p-Wert des Zweistichproben t-Tests, jeweils bezogen auf *E. coli* WT, aufgeführt. Berechnet wurden diese Werte mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) und bei $p < 0,05$ wurde von einer statistischen Signifikanz ausgegangen.

Ergebnisse

Tabelle 5.7–1: Relative Genexpression der Katalasen bzw. Peroxidasen bezogen auf *E. coli* WT

Gen	<i>E. coli</i> Mutante	Relative Genexpression $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Standardabweichung	p-Wert
<i>katE</i>	WT ClpA-Ala569Argfs*12	1,582	0,394	0,063
	MIII	4,210	1,557	0,035
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12	3,348	0,623	0,011
	MIVa	9,748	2,989	0,018
<i>katG</i>	WT ClpA-Ala569Argfs*12	1,238	0,302	0,153
	MIII	0,833	0,125	0,073
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12	0,947	0,366	0,412
	MIVa	0,798	0,293	0,178
<i>ahpC</i>	WT ClpA-Ala569Argfs*12	1,335	0,602	0,218
	MIII	1,501	0,283	0,046
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12	1,227	0,090	0,024
	MIVa	1,663	0,395	0,050
<i>ahpF</i>	WT ClpA-Ala569Argfs*12	1,068	0,147	0,255
	MIII	1,276	0,179	0,058
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12	1,032	0,138	0,361
	MIVa	1,824	0,543	0,060

Neben der erhöhten relativen Genexpression von *katE* wird deutlich, dass die anderen Katalasen bzw. Peroxidasen nicht verstärkt exprimiert werden. Für die Gene *katG* und *ahpF* liegen die p-Werte generell über 0,05 und somit ist der Expressionsunterschied nicht signifikant. Für *ahpC* liegt bezogen auf *E. coli* WT eine erhöhte Expression vor. Werden allerdings die Stämme bzw. Mutanten *E. coli* WT mit *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 bzw. *E. coli* MIII mit *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa verglichen, so ist der Unterschied in der relativen Genexpression von *ahpC* nicht mehr signifikant (vgl. Abbildung 5.7–4). Mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) wurde zur Überprüfung der Signifikanz ein Zweistichproben t-Test durchgeführt. Der p-Wert liegt bei 0,218, wenn man den Stamm *E. coli* WT und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 miteinander vergleicht. Für die Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 liegt der p-Wert bei 0,020 und bei *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa bei 0,255. Für die Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 ergibt sich demnach eine signifikante Erniedrigung in der relativen Genexpression von *ahpC*.

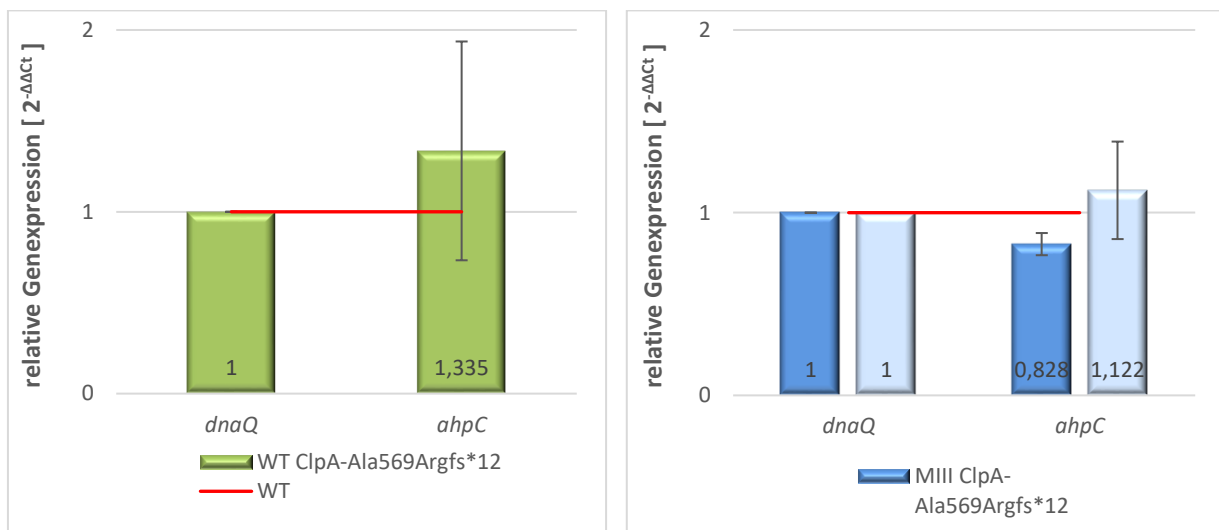


Abbildung 5.7–4: Relative Genexpression des Gens *ahpC* bezogen auf *E. coli* WT (links) bzw. *E. coli* MIII (rechts) Aufgetragen ist die relative Genexpression, berechnet als $2^{-\Delta\Delta Ct}$, für das Gen *ahpC*. Als Referenzgen dient *dnaQ*, bei dem die relative Genexpression auf eins festgelegt wurde. Der Stamm *E. coli* WT im linken Säulendiagramm bzw. die Mutante *E. coli* MIII im rechten Säulendiagramm wurden jeweils als Referenzstamm auch mit einer relativen Genexpression von eins definiert (jeweils die rote Linie). Die grünen Säulen beschreiben die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12, die mittelblauen die Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und die hellblauen Säulen die Mutante *E. coli* MIVa. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Nachdem die relative Genexpression der Katalasen und Peroxidasen analysiert worden war, wurde anschließend auch das Gen *dps* untersucht. Generell wird Dps (*DNA-binding protein from starved cells*) bei *Escherichia coli* in der stationären Wachstumsphase induziert (Almirón et al. 1992). Außerdem kommt es durch oxidativen Stress zu einer verstärkten Expression (Lomovskaya/Kidwell/Matin 1994). Als Gegenregulation wird Dps von den Proteasen ClpAP und ClpXP abgebaut (Sen/Zhou/Imlay 2020; Stephani/Weichart/Hengge 2003). Durch die vorliegende *clpA*-Mutation und der damit ausfallenden Protease ClpAP kann in diesen Bakterienstämmen weniger Dps abgebaut werden. Daher galt es zu überprüfen, ob das Gen *dps* weniger stark exprimiert wird. Die Abbildung 5.7–5 zeigt die relative Genexpression als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ von *dps* in Bezug auf das Referenzgen *dnaQ* und den Bakterienstamm *E. coli* WT.

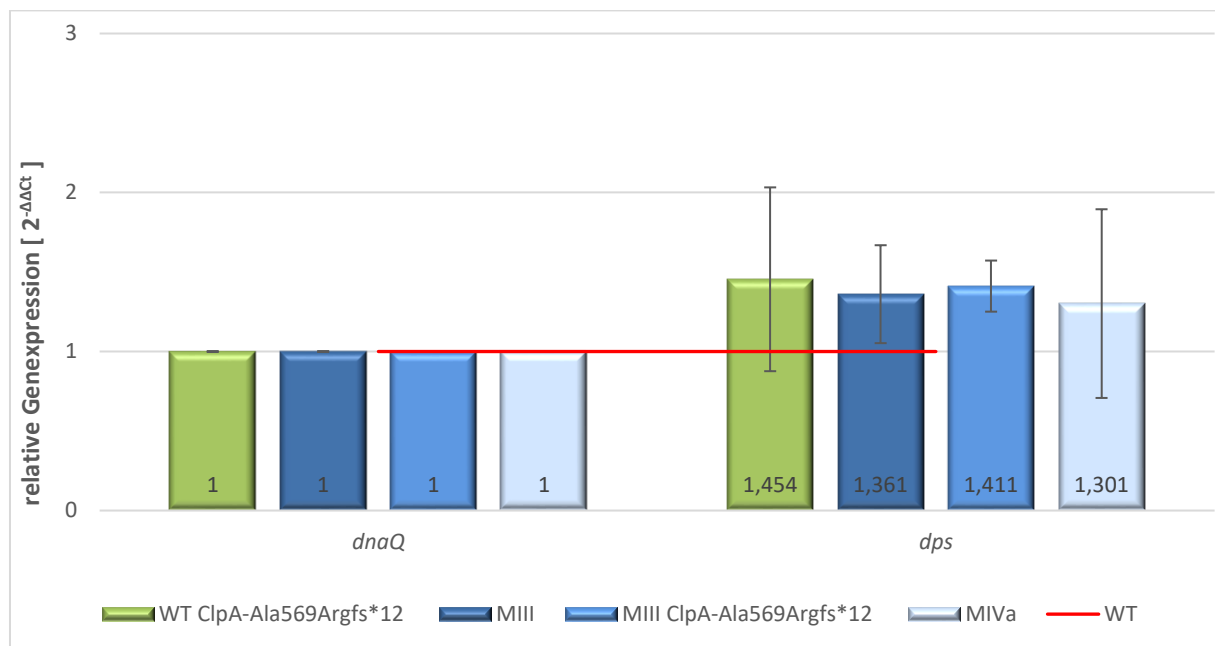


Abbildung 5.7–5: Relative Genexpression des Gens *dps* bezogen auf *E. coli* WT

Aufgetragen ist die relative Genexpression, berechnet als $2^{-\Delta\Delta C_t}$, für das Gen *dps*. Als Referenzgen dient *dnaQ*, bei dem die relative Genexpression auf eins festgelegt wurde. Der Stamm *E. coli* WT wurde als Referenzstamm auch mit einer relativen Genexpression von eins definiert (rote Linie). Die grünen Säulen beschreiben die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12, die dunkelblauen die Mutante *E. coli* MIII, die mittelblauen die Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und die hellblauen Säulen die Mutante *E. coli* MIVa. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Durch das Vorliegen der *clpA*-Mutation in der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 wird das Gen *dps* im Vergleich zum Stamm *E. coli* WT nicht weniger exprimiert, sondern leicht stärker, jedoch nicht signifikant. Dies bestätigt auch der mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) durchgeführte Zweistichproben t-Test ($p = 0,153$, damit $> 0,05$). Auch bei der Betrachtung der Mutanten *E. coli* MIII, *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa bezogen auf *E. coli* WT ist eine leicht erhöhte Expression zu sehen. Diese ist bei den beiden Mutanten *E. coli* MIII ($p = 0,090$) und *E. coli* MIVa ($p = 0,236$) auch nicht signifikant. Bei der Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 ergibt sich im Zweistichproben t-Test ein p -Wert von $0,024$ im Vergleich zum *E. coli* WT. Wird allerdings die Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 im Vergleich zur Mutante *E. coli* MIII betrachtet, ergibt sich ein p -Wert von $0,256$ und damit liegt keine signifikante Veränderung in der relativen Genexpression von *dps* vor.

Abschließend wurden die Eisen-Schwefel-Cluster abhängigen Enzyme des Citratzyklus mit der quantitativen *real-time* PCR (RT-qPCR) in Bezug auf eine veränderte relative Genexpression analysiert. Zum

einen wurde das Gen *acnB* untersucht, welches für die Aconitase B bzw. Dehydratase codiert und im Citratzyklus die Reaktion von Citrat zu Isocitrat katalysiert. Bei oxidativem Stress oder unter Eisenmangel entfällt die katalytische Aktivität und resultierende Apoproteine können spezifisch mRNA binden und je nach Bindungsstelle entweder die Transkriptstabilität erhöhen oder die Translation hemmen (Tang et al. 2005). Unter den normalen Wachstumsbedingungen sollte sich auch in den Stämmen mit der *clpA*-Mutation keine veränderte Expression ergeben, da es nicht zu einem Eisenmangel kommt. Zum anderen wurde das Gen *sdhC* analysiert, welches für ein Membranprotein der Succinat-Dehydrogenase, die aus vier Untereinheiten besteht, codiert. Die Succinat-Dehydrogenase katalysiert im Citratzyklus die Reaktion von Succinat zu Fumarat. *sdhC* ist dabei das erste Gen des Operons, *downstream* gefolgt von *sdhD*, *sdhA* und *sdhB*. Letzteres codiert für eine der zwei katalytischen Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase und beinhaltet drei Eisen-Schwefel-Cluster als prosthetische Gruppe (Darlison/Guest 1984). Da alle vier Gene über das Operon reguliert werden, wurde für die Untersuchung der relativen Genexpression das erste Gen der Transkriptionseinheit *sdhC* verwendet. Die Abbildung 5.7–6 zeigt die relative Genexpression als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ von *acnB* und *sdhC* in Bezug auf das Referenzgen *dnaQ* und den Bakterienstamm *E. coli* WT.

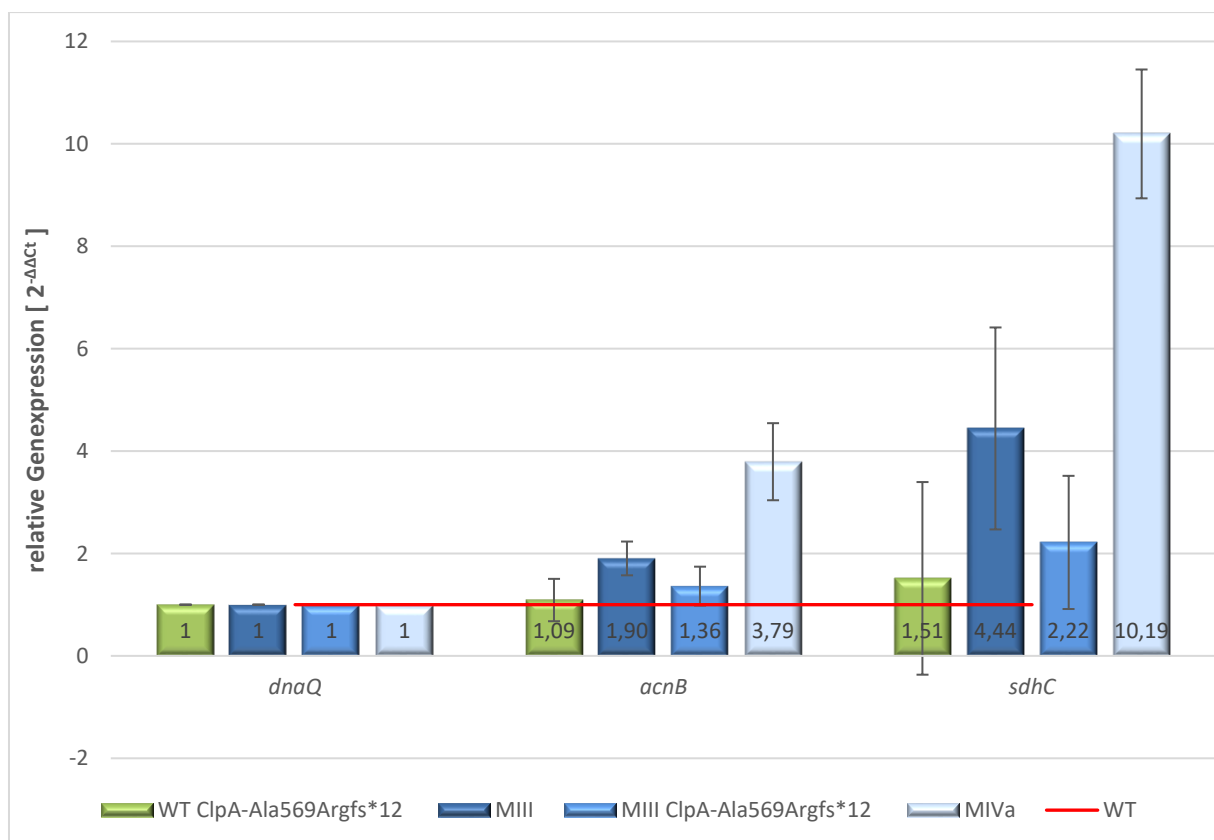


Abbildung 5.7–6: Relative Genexpression der Gene *acnB* und *sdhC* bezogen auf *E. coli* WT

Aufgetragen ist die relative Genexpression, berechnet als $2^{-\Delta\Delta Ct}$, für die Gene *acnB* und *sdhC*. Als Referenzgen dient *dnaQ*, bei dem die relative Genexpression auf eins festgelegt wurde. Der Stamm *E. coli* WT wurde als Referenzstamm auch mit einer

relativen Genexpression von eins definiert (rote Linie). Die grünen Säulen beschreiben die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12, die dunkelblauen die Mutante *E. coli* MIII, die mittelblauen die Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und die hellblauen Säulen die Mutante *E. coli* MIVa. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Allein durch die *clpA*-Mutation kommt es nicht zu einer veränderten relativen Expression der Gene *acnB* und *sdhC*. Dies wird deutlich, wenn der Stamm *E. coli* WT und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 im Vergleich betrachtet werden. Ein Zweistichproben t-Test, welcher mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) durchgeführt wurde, bestätigt diese Beobachtungen. Die p-Werte dazu lauten 0,37 für *acnB* und 0,34 für *sdhC*, damit sind diese größer als 0,05 und die Unterschiede nicht signifikant. Das Gen *acnB* ist im Vergleich zu *E. coli* WT bei *E. coli* MIII ($p = 0,021$) und bei *E. coli* MIVa ($p = 0,012$) signifikant erhöht. Untereinander betrachtet gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen *E. coli* MIII und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 ($p = 0,068$). Die Mutante *E. coli* MIVa weist auch im Vergleich zu *E. coli* MIII eine erhöhte Genexpression für *acnB* auf ($p = 0,008$). Für das Gen *sdhC* zeigt sich eine ähnliche relative Genexpression. *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant erhöhte Expression ($p = 0,047$ bzw. $p = 0,003$). Zwischen den Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 gibt es jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,090$); zwischen *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa ist dieser hingegen wieder signifikant ($p = 0,007$).

5.8 Auswirkungen der *clpA*-Mutation auf den Superspiralisierungsgrad der Bakterienzellen

Zur weiteren Charakterisierung der *clpA*-Mutation wurde der Einfluss auf den Superspiralisierungsgrad untersucht. Dazu wurde das von Mobarak Abu Mraheil etablierte Luciferase Reportersystem genutzt (Abu Mraheil 2004; Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013). Allerdings wurde ein neues Gerät, das Mithras LB 940 von der Firma Berthold Technologies GmbH & Co. KG, zur Messung der Lumineszenz verwendet, sodass die bereits beschriebenen Referenzstämme erneut genutzt wurden, um die Methode zu validieren (Arntjen 2011). Dazu wurden zum einen die *E. coli* Stämme JTT1 und RS2 verwendet. Der JTT1 stellt den Ausgangsstamm dar mit einem unveränderten Superspiralisierungsgrad. Die dazu isogene Mutante RS2 weist eine Mutation im Gen *topA* auf, wodurch die negative Superspiralisierung verstärkt wird. Zum anderen wurden der Stamm *E. coli* WT und die Mutante *E. coli* WT-3-1 genutzt. Auch diese Stämme sind isogen zueinander und die Mutante WT-3-1 zeichnet sich dabei durch zwei Mutationen im Gen *gyrA* aus. Dadurch weist diese Mutante im Vergleich zum Wildtyp einen verminderten negativen Superspiralisierungsgrad auf. Sämtliche Rohdaten zur Bestimmung des Superspiralisierungsgrades über den Qsc-Wert, sowohl für die DNA der Referenzstämme als auch für

die der Mutanten, sind im Anhang im Kapitel 10.7 aufgeführt. Die Abbildung 5.8–1 zeigt die Ergebnisse der Messung der Referenzstämmen.

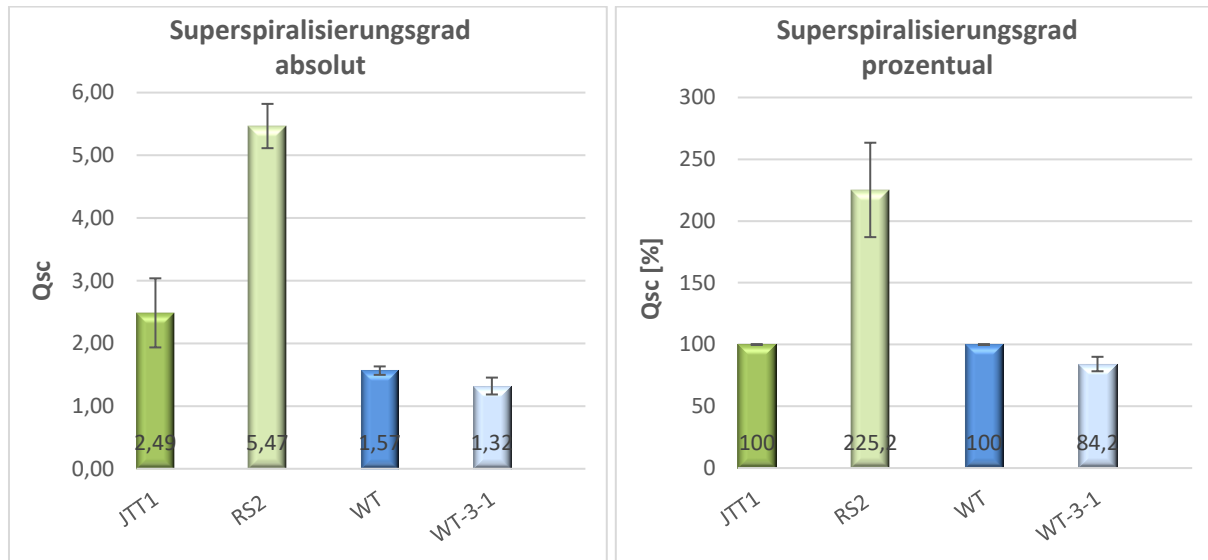


Abbildung 5.8–1: Superspiralisierungsgrad der Referenzstämmen als Qsc-Wert absolut (links) und prozentual (rechts)
 In Grün sind die zueinander isogenen Stämme *E. coli* JTT1 und *E. coli* RS2 aufgetragen und in Blau die isogenen Stämme *E. coli* WT und *E. coli* WT-3-1. Dargestellt sind die absoluten Qsc-Werte in dem linken Diagramm und die prozentualen Qsc-Werte im rechten. Bei der prozentualen Darstellung sind die Ausgangs- bzw. Wildtypstämme *E. coli* JTT1 und *E. coli* WT auf 100 % gesetzt worden. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Die Qsc-Wert Bestimmung der Referenzstämmen entsprach den Erwartungen. Bei der Mutante *E. coli* RS2 konnte eine verstärkte negative Superspiralisierung der DNA auf 225 % gezeigt werden und bei der Mutante *E. coli* WT-3-1 wurde ein verminderter Superspiralisierungsgrad auf 84 % gemessen. Somit zeigte sich auch mit dem neuen Luminometer Mithras LB 940 das gleiche Verhältnis wie in vorherigen Arbeiten (Abu Mraheil 2004; Arntjen 2011). Die Methode konnte demnach unter diesen Bedingungen auch für die Bestimmung des Superspiralisierungsgrades der DNA der *clpA*-Mutanten und ihren zugehörigen Referenzstämmen verwendet werden.

Zunächst wurden der Stamm *E. coli* WT und die CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 untersucht. Die Abbildung 5.8–2 zeigt die zugehörigen Qsc-Werte.

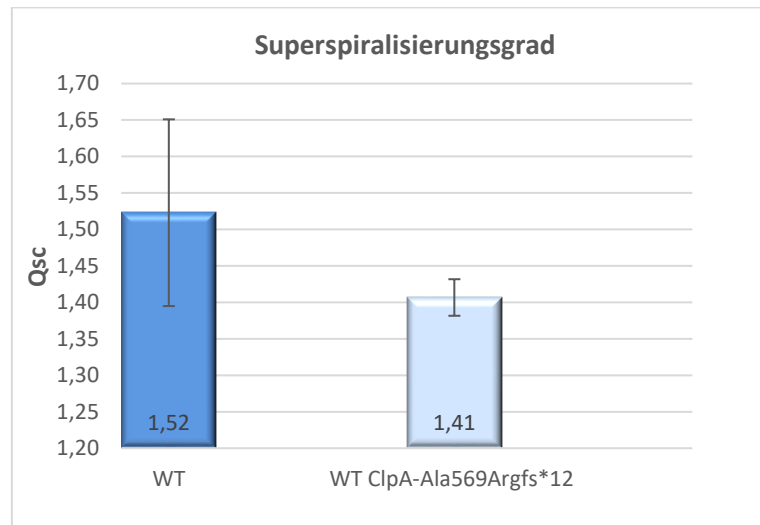


Abbildung 5.8–2: Superspiralisierungsgrad des Stammes *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12. Dargestellt sind die absoluten Qsc-Werte. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Der Qsc-Wert der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 ist leicht vermindert, jedoch nicht signifikant. Dies bestätigt auch der mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) durchgeführte Zweistichproben t-Test unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen ($p = 0,233$, damit $> 0,05$). Im prozentualen Vergleich, bei dem der DNA-Superspiralisierungsgrad des Wildtyps auf 100 % festgelegt wurde, wurde für *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 ein Wert von 92,4 % ermittelt.

Außerdem wurden die Mutanten *E. coli* MIII, *E. coli* MIVa und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 auf ihren DNA-Superspiralisierungsgrad untersucht. Die folgende Abbildung 5.8–3 stellt die Ergebnisse gegenüber.

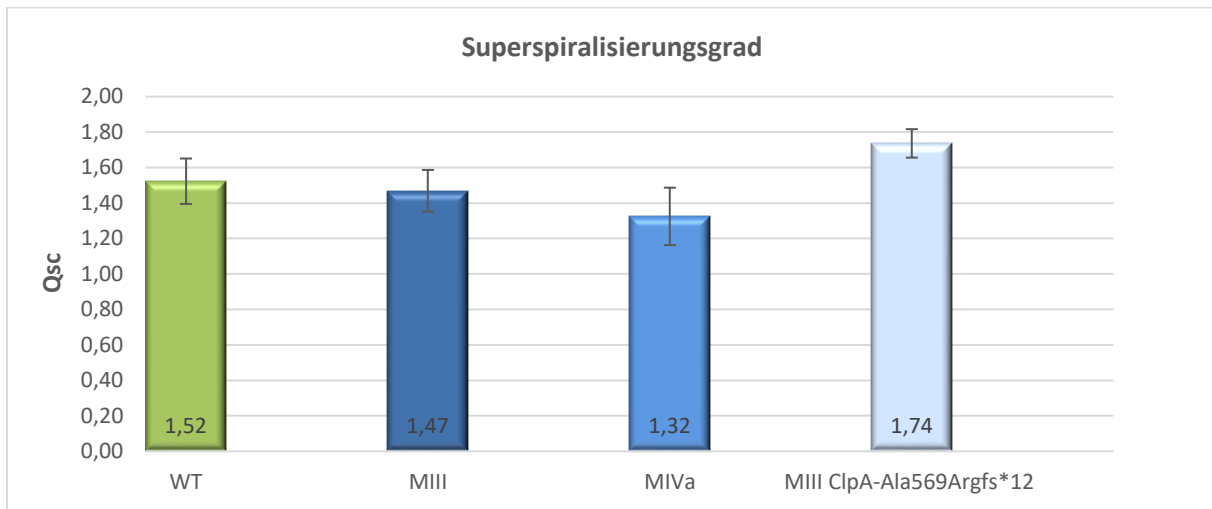


Abbildung 5.8–3: Superspiralisierungsgrad des Stammes *E. coli* WT und der Mutanten *E. coli* MIII, MIVa und MIII ClpA-Ala569Argfs*12

Dargestellt sind die absoluten Qsc-Werte. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung von drei voneinander unabhängigen biologischen Proben.

Generell gab es nur leichte Unterschiede im DNA-Superspiralisierungsgrad der vermessenen *E. coli* Stämme. Tendenziell entsprachen die Ergebnisse von *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa jedoch den Vermutungen und spiegeln die Ergebnisse vorheriger Arbeiten wider (Arntjen 2011). Besonders hervorzuheben ist jedoch die CRISPR-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12. Zwischen der Mutante *E. coli* MIII und der CRISPR-Mutante konnte ein Anstieg im negativen Superspiralisierungsgrad von 1,47 auf 1,74 verzeichnet werden. Ein mit Excel (Microsoft 365 Apps for Enterprise) durchgeführter Zweistichproben t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen zeigte die Signifikanz der unterschiedlichen Qsc-Werte: $p = 0,016$.

6 Diskussion

6.1 Charakterisierung der *clpA*-Mutation

Zur Charakterisierung der Funktion von ClpA konnte Joel R. Hoskins zeigen, dass ein Fusionsprotein aus RepA und GFP *in-vivo* über die Protease ClpAP unter ATP-Verbrauch abgebaut werden kann (Hoskins et al. 2000). Für das Fusionsprotein wurden verschiedene Bereiche des N-terminalen Bereichs von RepA mit GFP gekoppelt: Diese Bereiche umfassen entweder 15, 46 oder 70 Aminosäuren. Demnach reichen bereits 15 Aminosäuren von RepA, um als Erkennungssequenz für die ATPase ClpA zu fungieren. *In-vitro* wurde jedoch gezeigt, dass die Fluoreszenzabnahme von RepA(1-70)GFP stärker und schneller erfolgte als mit RepA(1-15)GFP (Hoskins/Kim/Wickner 2000). Weiterhin wurde gezeigt, dass der Abbau spezifisch über die Protease ClpAP und nicht über die Protease ClpXP abläuft, da eine *clpX*-Knockout-Variante bei derselben Behandlung keine Fluoreszenz zeigt; der Abbau aber weiter über die Protease ClpAP läuft (Hoskins/Kim/Wickner 2000, Fig. 9 D). Außerdem findet in *clpP*-Knockout-Mutanten kein Abbau des GFP-Fusionsproteins statt; die Proteasekomponente ClpP ist also ebenfalls erforderlich (Hoskins/Kim/Wickner 2000, Fig. 9 D).

In dieser Arbeit wurde der *in-vivo* Funktionstest von ClpA (vgl. Kapitel 8.2.1.5) zum Nachweis der Funktionalität der ATPase ClpA in verschiedenen Bakterienstämmen eingesetzt, wofür das Plasmid pRepA(1-70)GFP, das die stärkste Fluoreszenz zeigt, genutzt wurde. Erstmals konnte damit über diesen Funktionstest in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass es sich bei der *clpA*-Mutation der Selektionsmutante *E. coli* MIVa um eine Knockout-Mutation handelt: Im Vergleich zu der Vorläufermutante *E. coli* MIII zeigt nur die Mutante *E. coli* MIVa eine Fluoreszenz. Der Abbau des GFP-Fusionsproteins über die Protease ClpAP funktioniert dementsprechend nur in der Vorläufermutante ohne *clpA*-Mutation (vgl. Kapitel 5.1). Außerdem wird die Hypothese, welche sich aus der Publikation von Kim *et al.* ergab, bestätigt. Für die Komplexbildung der ATPase-Einheiten ClpA mit der Proteasekomponente ClpP sind in *Escherichia coli* die Aminosäuren Ile-617, Gly-618 und Leu-619 in ClpA essentiell (Kim et al. 2001). Da beide Komponenten ClpA und ClpP für einen funktionierenden Komplex nötig sind, deutet der Nachweis der Fluoreszenz in der Mutante *E. coli* MIVa darauf hin, dass durch die *clpA*-Mutation bzw. den resultierenden *frameshift* im Bereich der Bindestelle für ClpP die Komplexbildung ClpAP in *E. coli* MIVa unterbunden ist.

Des Weiteren wird deutlich, dass dieser *in-vivo* Funktionstest von ClpA auch bei Wildtyp-Stämmen und klinischen Isolaten angewendet werden kann, wofür allerdings einige Anpassungen im Zuge dieser Arbeit vorgenommen werden mussten, wie beispielsweise die Anpassung der L-Arabinose-Konzentration zur Induktion des P_{araB}-Promotors.

In der Literatur sind einige Mutationen im Gen *clpA* beschrieben. Dabei handelt es sich jedoch um Mutationen, die beispielsweise gezielt in konservierte Regionen der N-Domäne eingeführt wurden, um die Funktion dieser bestimmten Bereiche bzw. Domänen des Proteins näher zu charakterisieren (Erbse et al. 2008). Die N-Domäne des Proteins ClpA, als eine von drei funktionellen Bereichen der ATPase, neben den zwei Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD 1 & 2) (Guo et al. 2002b), ist für die Substratspezifität verantwortlich. Diese Spezifität kann z. B. durch das Adapterprotein ClpS, welches an die N-Domäne bindet, beeinflusst werden (Dougan et al. 2002). Die Aminosäuren Arg-90 und Arg-131 in der N-Domäne sind dabei für die vollständige Funktion der ATPase erforderlich. Eine einzelne Mutation an einer der beiden Positionen vermindert den Abbau eines Substrats um das Dreifache, eine Doppelmutation verstärkt diesen Effekt nochmals deutlich (Erbse et al. 2008). Ein weiterer konservierter Bereich des Proteins ClpA von *E. coli* beschreibt das Motiv GYVG (Gly-539, Tyr-540, Val-541, Gly-542) der Schleife zwischen der kleinen und großen Unterdomäne des Moduls D2 (vgl. Abbildung 3.5–1). Dabei wird durch die Tyrosinreste Tyr-540 der sechs ClpA Monomere der innere Bereich der von ClpA geformten zentralen Pore gebildet. Mutationen an diesem Tyr-540 führen dazu, dass der Proteinabbau nicht mehr erfolgt (Erbse et al. 2008; Guo et al. 2002b; Hinnerwisch et al. 2005). Die ATP-Hydrolyse ist bei diesen Mutanten (Y540C und Y540A) jedoch nicht betroffen (Farbman/Gershenson/Licht 2008). Neben Mutationen in der N-Domäne und der Schleife zwischen den Unterdomänen des Moduls D2 (= NBD 2) wurden in den beiden Nukleotid-Bindungsdomänen noch weitere Substitutionen eingeführt. Dabei wurden in den Walker-B Motiven (hhhhDE; h \triangleq hydrophobe Aminosäure) der beiden NBD, die entscheidend für die ATPase Aktivität sind (Hanson/Whiteheart 2005; Iyer et al. 2004), Mutationen entweder jeweils einzeln oder als Doppelmutation eingeführt. Die Aminosäure Glutaminsäure als zentrales Element für die ATP-Spaltung wurde jeweils durch Alanin ersetzt. In diesen Mutanten konnte ATP nach wie vor gebunden werden, jedoch nicht mehr hydrolysiert werden. Dabei wurde deutlich, dass auch die ATP-Hydrolyse in beiden Domänen entscheidend für eine effektive Proteinprozessierung ist (Kress/Mutschler/Weber-Ban 2009). In einer anderen Arbeitsgruppe wurden in diesen beiden Nukleotid-Bindungsdomänen jeweils in den Walker-A Motiven (GXXXXGKT; X \triangleq beliebige Aminosäure) (Hanson/Whiteheart 2005) einzeln ein Lysin durch ein Glutamin (K220Q bzw. K501Q) ersetzt. Dies führte dazu, dass durch die Mutation in der Domäne I die Hexamerbildung von ClpA ausbleibt und kein Proteinabbau möglich war. Durch die zweite Mutation in Domäne II wurde allerdings ein Hexamer gebildet, jedoch konnte keine ATP-Hydrolyse stattfinden. Der Proteinabbau war ebenfalls nicht möglich (Singh/Maurizi 1994).

In der Literatur sind, neben den bereits beschriebenen experimentellen Mutationen in dem Gen *clpA* zur Charakterisierung der Funktion der einzelnen Domänen, keine natürlich vorkommenden Mutati-

onen beschrieben, die sich aufgrund des Kontaktes zu Antibiotika oder als Einwirkung durch Umwelteinflüsse bzw. oxidativen Stress etabliert haben. Dementsprechend handelt es sich bei der *clpA*-Mutation in dieser Arbeit um eine Mutation, welche erstmalig im Zusammenhang mit der Behandlung von *Escherichia coli* mit Fluorchinolonen etabliert worden ist. Andere Arbeitsgruppen beschreiben Veränderungen in der Funktion der Proteasekomponente ClpP aufgrund von Einwirkungen durch Antibiotika. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heike Brötz-Oesterhelt hat eine neue Antibiotikaklasse gefunden: Die Acyldepsipeptide (ADEPs) wirken sowohl gegen gramnegative als auch grampositive Bakterien und agieren mit der Protease ClpP als Zielstruktur (Brötz-Oesterhelt et al. 2005). Mit dem Antibiotikum ADEP1 und fluoreszenzmarkiertem Casein wurde die Proteaseaktivität *in-vitro* untersucht und gezeigt, dass die Protease ClpP unter der Einwirkung von ADEPs nicht nur kurze Peptide, wie im Normalfall üblich, sondern auch ungefaltete Polypeptide abbauen kann. Die Interaktion mit der ATPase ClpA wird dabei aufgehoben (Kirstein et al. 2009). Anhand der Protease ClpP aus *Bacillus subtilis* wurde ein Modell entwickelt, welches den Abbau größerer Polypeptide durch ClpP unter der Einwirkung von ADEPs veranschaulichen sollte. ADEPs würden bei der Bindung an ClpP für eine erhöhte Beweglichkeit der N-terminalen Bereiche von ClpP sorgen und damit einen axialen Tunnel öffnen (Lee et al. 2010). Eine weitere Arbeitsgruppe hingegen beschreibt einen anderen Mechanismus. Sie veranschaulichten anhand einer Kristallstruktur von ADEP1, welches an ClpP aus *E. coli* gebunden ist, dass die Bindung den N-terminalen Bereich von ClpP stabilisiert und durch eine entstehende offene Konformation eine axiale Pore arretiert wird (Li et al. 2010). Die N-terminalen Schleifen der jeweiligen ClpP-Proteine zeigen im Tetradecamer dabei nach außen und bilden eine auf 20 Å vergrößerte Pore (Li et al. 2010; Malik/Brötz-Oesterhelt 2017). Das ADEP1 imitiert das konservierte IGL-Bindungsmotiv der ATPase (vgl. Kapitel 3.6 und 5.1) und interagiert auf diese Art mit der Protease ClpP (Kim et al. 2001; Li et al. 2010). In beiden Fällen, zum einen durch die in dieser Arbeit untersuchte *clpA*-Mutation und zum anderen durch die Einwirkung bzw. Bindung des Antibiotikums ADEP1, wird kein Komplex aus den beiden Komponenten ClpA und ClpP ausgebildet. Die Auswirkungen sind jedoch unterschiedlich. Durch die Behandlung mit ADEPs kommt es zu einer Funktionsänderung, sodass durch die nun unkontrolliert arbeitende Protease die Zellteilung beeinträchtigt ist und dies abschließend zum Zelltod führt (Brötz-Oesterhelt et al. 2005; Kirstein et al. 2009). Durch die *clpA*-Mutation wird der Proteinabbau nur selektiv beeinflusst. Im Zusammenspiel mit dem MazEF Antitoxin-Toxin System kann es dadurch auch zu einem besseren Überleben der Zelle führen (vgl. Kapitel 5.5 und 6.4). Die Wirkung des Antibiotikums ADEP1 sollte durch die in dieser Arbeit untersuchte *clpA*-Mutation jedoch nicht beeinflusst sein. Im Gegenteil könnte es eher zu einer verstärkten Wirkung bzw. einer schnelleren Wirkung kommen, da das ADEP1 nicht mehr mit ClpA um die Bindungsstelle von ClpP (IGL-Bindungsmotiv) konkurriert (Li et al. 2010). Ähnlich wie die ADEPs aktivieren auch die Imipridone, v. a. das ONC212, die bakterielle Protease ClpP (Jacques et al. 2020). Ursprünglich wur-

den diese Substanzen in der Erforschung neuer Tumortheraeutika gefunden und wurden dort zum Teil noch unter anderen Namen, wie z. B. dem TIC10, beschrieben (Allen et al. 2013). Da diese Stoffe als Target die Protease ClpP der Mitochondrien aufweisen, wurde auch die bakterielle ClpP-Protease als möglicher Angriffspunkt untersucht. Gezeigt wurde, dass das ONC212 die bakterielle Protease ClpP für den Abbau von Peptiden und Proteinen aktivieren kann, jedoch bei einer zehnfach höheren Konzentration im Vergleich zu dem ADEP1. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *Escherichia coli* Wildtyp-Stämme bereits eine Resistenz gegenüber dem ONC212 aufgrund ihres effektiven Effluxes aufweisen. Demnach zeigt sich die antimikrobielle Wirkung vor allem bei grampositiven Bakterien (Jacques et al. 2020).

Des Weiteren werden in der Literatur auch Inhibitoren der Protease ClpP beschrieben. Die Gruppe der β -Lactone hemmen die katalytische Triade der Serinprotease bei *Staphylococcus aureus* und weiteren grampositiven Bakterien (Böttcher/Sieber 2008; Compton et al. 2013). Generell werden diese Wirkstoffe und davon weiter entwickelte Abkömmlinge jedoch nicht angewendet, auch aufgrund ihrer niedrigen Stabilität und Selektivität (Hackl et al. 2015). Auch die Gruppe der β -Sultame wurden als ClpP-Inhibitoren dargelegt; sie sorgen dafür, dass der aktive ClpP-Komplex in zwei inaktive Heptamere zerlegt wird (Gersch et al. 2014). Gegen die gramnegativen Bakterien hingegen wurden deutlich weniger potenzielle Inhibitoren der Protease ClpP beschrieben. Jedoch werden nun die α -Amino Diphenyl Phosphonat Ester als Inhibitoren der Protease ClpP von *Escherichia coli* erforscht (Moreno-Cinos et al. 2019b). Eine dieser Substanzen führt nach der Behandlung von *E. coli* zu einem deutlich verschlechterten Wachstum unter nitrosaktivem Stress, vergleichbar mit einer *clpP*-Knockout-Mutante (Moreno-Cinos et al. 2019a; Moreno-Cinos et al. 2019b; Robinson/Brynildsen 2015).

Außerdem werden auch Substanzen beschrieben, die eine Wirkung auf die ATPasen zeigen. Die ATPase ClpX bei *Staphylococcus aureus* wird durch einen Wirkstoff, Dihydrothiazepine 334, beeinflusst und in ihrer Funktion inhibiert. Die Oligomerisation wird verhindert und auch die Komplexbildung von ClpXP bleibt nicht bestehen (Fetzer et al. 2017). Des Weiteren wurde durch die Behandlung die Toxinproduktion von *Staphylococcus aureus* und auch MRSA-Stämmen deutlich reduziert vergleichbar mit einer *clpX*-Knockout-Mutante (Fetzer et al. 2017; Frees et al. 2003; Moreno-Cinos et al. 2019a). Wirkstoffe gegen die ATPase gramnegativer Bakterien sind bislang in der Literatur nicht beschrieben.

6.1.1 Komplementation der *clpA*-Mutation

Aufgrund vorangegangener sorgfältiger Überlegungen und Planungen, zu welchem Zweck die Komplementationsplasmide eingesetzt werden sollten, konnten erfolgreich verschiedene solcher Plasmidi-

de konstruiert werden, die vielfältig eingesetzt werden konnten. Dabei wurde zum einen auf die Kopienzahl des verwendeten Vektors geachtet. Damit die Anzahl der Genkopien möglichst nahe am natürlichen Vorkommen in der Bakterienzelle lag, wurde das *medium-copy* Plasmid pACYC184 ausgewählt. Dieses Plasmid liegt mit etwa 10 Kopien pro Zelle vor (Atlung/Christensen/Hansen 1999). Zum anderen wurde beachtet, dass das eingesetzte Plasmid auch neben anderen Plasmiden in der Bakterienzelle koexistieren konnte und keine Inkompatibilität vorliegt (Novick 1987). Da zur phänotypischen Charakterisierung der verschiedenen Bakterienstämme ein plasmidbasierter *in-vivo* Funktionstest genutzt wurde, sollten die konstruierten Komplementationsplasmide auch mit dem dort eingesetzten Plasmid pRepA(1-70)GFP, einem pBR322-Derivat mit dem *origin of replication* von pMB1, kompatibel sein. Dies gelang einerseits dadurch, dass der ausgewählte Vektor pACYC184 mit p15A einen anderen *origin of replication* besaß und andererseits durch das Vorliegen anderer Antibiotikaresistenzgene selektiert werden konnte. So wurde ermöglicht, die Komplementationsplasmide einzeln für die Experimente zu nutzen oder auch in Kombination für den phänotypischen plasmidbasierten Funktionstest von ClpA. Der einzelne Einsatz der konstruierten Komplementationsplasmide zur Charakterisierung der *clpA*-Mutation in Bezug auf das Wachstumsverhalten bzw. auf die Antibiotikaempfindlichkeit wird in den nachfolgenden Kapiteln 6.2 und 6.3 diskutiert.

An dieser Stelle wurde zunächst der kombinierte Einsatz der Komplementationsplasmide im *in-vivo* Funktionstest von ClpA genutzt, um die Dominanz des Wildtyp-Allels phänotypisch hervorzuheben. Ursprünglich wurde ein sogenannter Dominanztest bei *Escherichia coli* Stämmen, welche resistent gegenüber Nalidixinsäure sind, beschrieben (Hane/Wood 1969). Es folgten weitere Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass bei hoch resistenten *E. coli* Stämmen gegenüber Fluorchinolonen sich die MHK nicht verändert, wenn mithilfe eines Plasmids das Gen *gyrA* in einer mutierten Version (S83L und D87G) dem bereits in *gyrA* mutierten Stamm hinzugefügt wurde. Jedoch erniedrigte sich die MHK deutlich, wenn dieser eigentlich hoch resistente *E. coli* Stamm mit einem Plasmid transformiert wurde, welches das Gen *gyrA* in seiner Wildtyp-Form trägt (Heisig/Schedletzky/Falkenstein-Paul 1993). Die Wildtyp-Gyrase sorgt nun für die Empfindlichkeit des Stammes gegenüber den Fluorchinolonen und überdeckt die Eigenschaften der mutierten Form. Damit wurde der Dominanzeffekt der Gyrase beschrieben.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Komplementationsexperimenten in Bezug auf das Gen *clpA* konnte ein ähnlicher Effekt beschrieben werden. Bei der Betrachtung des *in-vivo* Funktionstests von ClpA zur Charakterisierung der phänotypischen Eigenschaften der *clpA*-Mutation, konnte über den Abbau des RepA-markierten Proteins GFP gezeigt werden, dass die Wildtyp-Variante des Gens *clpA* gegenüber der mutierten Form dominiert (vgl. Abbildung 5.4–1). Mechanistisch war dies auch so zu erwarten. Als Kontrolle für einen Abbau des markierten Proteins GFP über den Proteasekomplex

ClpAP diente die Mutante *E. coli* MIII, die dementsprechend keine Fluoreszenz zeigte. Im Gegensatz dazu zeigte die Mutante *E. coli* MIVa eine deutliche Fluoreszenz, aufgrund des Nichtabbaus von GFP aufgrund der *clpA*-Mutation und der damit verbundenen fehlenden Ausbildung des Proteasekomplexes aus ClpA und ClpP. Zusätzlich wurde die Kontrolle mit dem Plasmid pHPAS10-01.1 durchgeführt. Dieses Plasmid entsprach den Komplementationsplasmiden, nur ohne der zu komplementierenden Genabschnitte von *clpA*. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass allein durch das Einführen eines zusätzlichen Plasmids und damit beispielsweise eines zusätzlichen Antibiotikaresistenzgens zur Selektion die phänotypischen Eigenschaften wie der GFP-Abbau und dadurch die Fluoreszenz beeinflusst wurden. Den Erwartungen entsprechend zeigte sich eine deutliche Fluoreszenz vergleichbar mit dem Stamm *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP. Wurde der Stamm *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP zusätzlich mit den Plasmiden pHPAS10-01.3 bzw. pHPAS10-01.4 transformiert, zeigte sich in dem durchgeführten *in-vivo* Funktionstest von ClpA keine Fluoreszenz, vergleichbar mit der Mutante *E. coli* MIII (vgl. Abbildung 5.4–1). Durch die beiden Komplementationsplasmide wurde die Wildtyp-Variante von *clpA* ergänzt. Der Unterschied der beiden Plasmide lag in der Promotorsequenz (vgl. Abbildung 5.2–2 und Abbildung 5.2–3). Jedoch ist die Sequenz in dem Sinne vergleichbar, dass sich in beiden eine σ^{70} -Faktor Erkennungssequenz wiederfindet. Der Sigma-70-Faktor wird auch als *house keeping* bezeichnet (Hawley/McClure 1983; Helmann/Chamberlin 1988). Er ermöglicht die Bindung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase im Promotorbereich der entsprechenden Gene und initiiert deren Transkription unter normalen Bedingungen in wachsenden *E. coli* Bakterienzellen (Gross et al. 1998; Gruber/Gross 2003). Dementsprechend war zu erwarten, dass *clpA* in beiden Plasmiden gleichermaßen unter den normalen Wachstumsbedingungen exprimiert wurde. Dadurch, dass im *in-vivo* Funktionstest von ClpA mit den beiden Komplementationsplasmiden keine Fluoreszenz zu erkennen war, wurde deutlich, dass das *clpA* Wildtyp-Allel der genomischen *clpA*-Mutation dominierte. Des Weiteren konnte durch die Komplementation mit der dominanten Wildtyp-Variante von *clpA* im Umkehrschluss der Einfluss der *clpA*-Mutation auf den Abbau bestimmter Proteine rückgeschlossen und bestätigt werden.

6.1.2 Konstruktion genomischer *clpA*-Mutanten mit dem CRISPR/Cas9-System

Bei der Konstruktion der genomischen *clpA*-Mutanten wurde eine zu dem Zeitpunkt neuartige Methode verwendet, welche es zunächst für die in dieser Arbeit genutzten *Escherichia coli* Stämme zu optimieren und etablieren galt. Dabei gab es verschiedene Aspekte, die beachtet werden mussten. Im Folgenden sind diese einzelnen näher diskutiert.

6.1.2.1 Etablierung der Anwendung des no-SCAR Systems

Für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System wurde das von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather beschriebene und auf *Escherichia coli* optimierte no-SCAR System (*Scarless Cas9 Assisted Recombineering*) angewendet (Reisch/Prather 2015). Für diese Methode wurde zunächst stets ein passendes pKDsgRNA-Plasmid konstruiert. Dabei galt es, 20 Nukleotide des jeweils zu adressierenden Gens auszutauschen (vgl. Kapitel 8.2.2.10.1). Für diesen Austausch wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden angewendet. Zum einen wurde das Plasmid mit dem Nukleotidaustausch über SOEing, einer Fusions-PCR (vgl. Kapitel 8.2.2.2 und 5.3.1.1) konstruiert und zum anderen über eine Art inverse PCR, der *Round-the-horn* Klonierung, angefertigt (vgl. Kapitel 8.2.2.3 und 5.3.2.1.1 bzw. 5.3.2.2.1). Beide Methoden waren dabei erfolgreich und die pKDsgRNA-Plasmide konnten gezielt verändert werden. Die Variante über SOEing wurde dafür zunächst etabliert. Jedoch zeigte sich dabei ein hoher Material- und Enzymverbrauch, da viele Einzelschritte nötig waren, bis das Plasmid vollständig konstruiert war. Dementsprechend wurde auf eine kostengünstigere und effektivere Methode gewechselt und sich an dem in den *Current Protocols* beschriebenen „*Alternate Protocol 3*“ orientiert (Reisch/Prather 2017). Der dort beschriebene Primer PtetR wurde zunächst übernommen (vgl. PtetR_pKDsgRNA_3_5335, Tabelle 8.1–3). Dieses Oligonukleotid ermöglicht aufgrund seiner Phosphat-Gruppe am 5'-Ende eine deutlich einfachere und schnellere Konstruktion des gewünschten pKDsgRNA-Plasmids. Des Weiteren bindet dieses Oligonukleotid neben der zu verändernden Sequenz, wodurch ein universeller Einsatz für die Konstruktion sämtlicher pKDsgRNA-Plasmide gewährt wird. Im weiteren Verlauf der Konstruktion verschiedener pKDsgRNA-Plasmide für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System wurde der Primer PtetR weiter optimiert. Der pKDsgRNA_3_5335_PO4 bezeichnete Primer wurde am 3'-Ende um ein Nukleotid im Vergleich zum PtetR Primer gekürzt. Dadurch ergaben sich mehrere Vorteile: Zum einen wurde die Annealing-Temperatur dieses Primers damit an die des zugehörigen 5'-Primers bzw. seinen bindenden Bereich angepasst. Zum anderen sorgte diese Veränderung für eine erhöhte Spezifität des Primers. Die Paarung von Guanin und Cytosin wird stärker ausgebildet aufgrund der Ausbildung von drei Wasserstoffbrücken im Vergleich von nur zweien bei dem Paar Adenin und Thymin. Der sich nun ergebende Guaninrest am 3'-Ende des optimierten Primers sorgt durch die stärkere Bindung der drei Wasserstoffbrücken für eine bessere und korrekte Bindung des Primers und steigert damit die Spezifität des Oligonukleotids in der PCR-Reaktion (Apte/Daniel 2009). Bezeichnet wird dieses Phänomen im Primer-Design als GC Clamp (Apte/Daniel 2009; Thermo Fisher Scientific 2019). Der in den *Current Protocols* beschriebenen „*Alternate Protocol 3*“ erwähnte Primer sgRNA-target-F wurde nicht genutzt. Mit der angegebenen Sequenz, die 3' an die gewählten 20 Nukleotide der crRNA gehängt werden sollte, sollte der Übergang zum bindenden Bereich des Plasmids geschaffen werden (Reisch/Prather 2017). Bei der genaueren Sequenzanalyse mit Vector NTI Advance™ 11.5 fiel auf, dass die angege-

bene Sequenz 5'-GTTTTAGAGCTGTGAAAACAGC-3' nicht hundertprozentig an der gewünschten Stelle band, sondern nur mit 63,6 %. An einer weiteren Stelle band sie mit 68,2 %. Zudem konnte die Sequenz noch an anderen Bereichen mit bis zu 72,7 % Übereinstimmung als 3'-Primer binden. In einer PCR mit dem Primer PtetR stände weniger Primer für diese Reaktion aufgrund unspezifischer Bindungen zur Verfügung. Außerdem ist fraglich, ob überhaupt das gewünschte Produkt entstehen würde, da der Primer am 3'-Ende nicht bindet. An der anderen Position, an der eine Übereinstimmung von 68,2 % vorliegt, ist die Produktbildung etwas wahrscheinlicher, da dort von den 14 Nukleotiden am 3'-Ende 12 binden. Es würde ein 923 bp großes Fragment amplifiziert werden, dass sich auch aufgrund der geringeren Größe als die knapp 7 kb des vollständigen Amplifikats leichter bilden würde. Dementsprechend wurden für die Konstruktion der pKDsgRNA-Plasmide in dieser Arbeit zwei eigene 5'-Primer entwickelt, die am 3'-Ende, welches der Übergang zum Ursprungsplasmid darstellt, mit der Sequenz 5'-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3' vollständig binden (vgl. pKDsgRNA_clpA_MIVa_5_5336 bzw. pKDsgRNA_clpA_Mut14_5_5336, Tabelle 8.1–3). Mit jeweils entsprechend einem dieser Primer und dem optimierten PtetR-Primer konnte innerhalb kürzester Zeit effektiv das jeweils benötigte pKDsgRNA-Plasmid konstruiert werden.

Die Möglichkeit der Anwendung der Methode des Pyrosequencing® für die Überprüfung der konstruierten pKDsgRNA-Plasmide auf den Einbau der korrekten gewünschten 20 Nukleotide des Zielgens der genomischen Mutagenese stellte einen weiteren Vorteil dar. Die für die Sequenzierung benötigten Primer wurden so konzipiert, dass sie für alle pKDsgRNA-Plasmide universell nutzbar waren und dementsprechend nur einmal entwickelt werden mussten. Da die Pyrosequencing®-Apparatur vor Ort zur Verfügung stand, brauchten die zu analysierenden Proben nicht zunächst bei einer Fremdfirma zum Sequenzieren in Auftrag gegeben werden. Innerhalb eines Tages lagen daher die Ergebnisse vor, zudem konnten auch mehrere Proben parallel bearbeitet werden. So konnte die kostengünstige und schnelle Methode des Pyrosequencing® (Ronaghi 2001) genutzt werden, um den kurzen Sequenzbereich von Interesse zu analysieren. Auch in anderen Bereichen ist das Pyrosequencing® eine geeignete Methode, um schnelle und kostengünstige Analysen durchzuführen. So ermöglicht das Pyrosequencing® generell die Analyse von (Punkt-)Mutationen und wird zur Detektion sogenannter SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) genutzt (Fakhrai-Rad/Pourmand/Ronaghi 2002). Ein großes und weit verbreitetes bzw. weit gefächertes Einsatzgebiet der Methode Pyrosequencing® ist auch der Nachweis von Antibiotikaresistenz vermittelnden Mutationen (Haanperä/Huovinen/Jalava 2005; Hopkins/Arnold/Threlfall 2007; Naas/Poirel/Nordmann 2006; Sinclair/Arnold/Woodford 2003). Es können aber nicht nur chromosomale Resistenzmutationen nachgewiesen werden, sondern auch, wie bei der in dieser Arbeit genutzten Anwendung der Kontrolle der pKDsgRNA-Plasmide, kurze Bereiche einer Plasmid-DNA sequenziert werden. Eine neuere Anwendung ist die Detektion von sogenannten PMQR (*plasmid-mediated quinolone resistance*) Genen. Ein neues PMQR Gen ist das *aac(6')*-

Ib-cr. Das Gen *aac(6′)-Ib* codiert für eine gewöhnliche Aminoglykosid Acetyltransferase und vermittelt die Resistenz gegenüber den Aminoglykosid-Antibiotika wie z. B. Kanamycin und Amikacin. Der namentliche Zusatz „-cr“ steht für Ciprofloxacin-Resistenz, da dieses Enzym in der Lage ist, auch Ciprofloxacin und Norfloxacin zu acetylieren (vgl. Kapitel 3.3.3). Dafür ist ein Austausch zweier Aminosäuren verantwortlich: Trp102Arg und Asp179Tyr (Robicsek et al. 2006). Die beiden zugrunde liegenden SNPs wurden in Alignments einiger Sequenzen mit T304C/A und G535T ermittelt und dafür das Pyrosequencing® etabliert (Guillard et al. 2010). Eine weitere Optimierung dahingegen, dass anstelle einer herkömmlichen PCR eine *real-time* PCR dem Pyrosequencing® vorgeschaltet wurde, ermöglichte weitere Zeit- und Kosteneinsparungen. Innerhalb von drei Stunden war es nun möglich 48 Isolate zu extrahieren und zu sequenzieren. Ein großer Vorteil ergibt sich für Routinelaboratorien diese mittlerweile am meisten verbreitete Variante der PMQR schnell zu analysieren (Guillard et al. 2013).

6.1.2.2 Auswahl einer geeigneten sgRNA in Bezug auf die Targetspezifität

Generell handelt es sich bei dem no-SCAR System bereits um eine optimierte Methode zur Anwendung der genomischen Mutagenese bei *Escherichia coli* (Reisch/Prather 2015). In Vorläufermethoden, bei denen ein anderes Plasmidsystem Anwendung fand, wurde in acht von zwölf untersuchten Zielgenen trotz der Verwendung von tracrRNA und eines genspezifischen Spacers durch den Einsatz der Endonuklease *Cas9* kein Zelltod bewirkt (Cui/Bikard 2016). Mit dem Plasmidsystem, welches in der no-SCAR Methode verwendet wurde und auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam, konnten viele verschiedene Bereiche im Genom von *Escherichia coli* adressiert werden. Neun von den zuvor genannten zwölf Targets wurden getestet. Davon konnten sieben einen *Cas9*-induzierten Zelltod vermitteln (Reisch/Prather 2017). In den anderen zwei Targets konnte das no-SCAR System keinen Zelltod hervorrufen, da die gewählten 20 Nukleotide der sgRNA zum Positionieren der *Cas9* an die gewünschte Stelle im Genom einen besonders hohen GC-Gehalt aufwiesen. Ein besonders hoher bzw. niedriger GC-Gehalt kann die Aktion der Endonuklease negativ beeinflussen (Wang et al. 2014). Dementsprechend hat der GC-Gehalt der sgRNA einen Einfluss auf die Effizienz der genomischen Mutagenese (Ren et al. 2014). Optimalerweise liegt er zwischen 40-60 % (Liu et al. 2016). Der GC-Gehalt der einzelnen N₂₀-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten pKDsgRNA-Plasmide ist der nachfolgenden Tabelle 6.1–1 zu entnehmen. Angegeben sind darin zum einen der GC-Gehalt der kompletten N₂₀-Sequenz, als auch der GC-Gehalt der letzten zwölf bzw. sechs Nukleotide *upstream* der PAM-Stelle. Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather unterscheiden im GC-Gehalt zwischen der kompletten N₂₀-Sequenz und den zwölf Nukleotiden *upstream* der PAM-Stelle. Sie empfehlen ebenfalls einen GC-Gehalt zwischen 40-60 % und würden vermeiden, dass dieser unter 20 % bzw. über 80 % liegt. Generell betonen sie jedoch, dass für *Escherichia coli* dazu noch nicht ausreichend

genügend Daten vorliegen (Reisch/Prather 2017). Die in dieser Arbeit genutzten N₂₀-Sequenzen liegen im gesamten GC-Gehalt mit 55 % in dem empfohlenen Bereich und bei der Betrachtung der zwölf Nukleotide, ist nur bei dem Plasmid pKDsgRNA-HPclpA-MIVa mit 66,7 % eine leichte Erhöhung zu verzeichnen. Dennoch liegt der GC-Gehalt hier noch weit unter 80 %. Eine weitere Arbeitsgruppe, welche sich zwar mit der Optimierung der sgRNA bei der Anwendung des CRISPR/*Cas9*-Systems in *Drosophila* beschäftigt, konnte zeigen, dass der GC-Gehalt der sechs Nukleotide PAM-proximal für die Effizienz entscheidend ist. Die dort verwendete Endonuklease entsprach allerdings der auch in dieser Arbeit genutzten: *Cas9* aus *Streptococcus pyogenes*. Sie konnten zeigen, dass ab mindestens vier „G“ bzw. „C“ dieser sechs Nukleotide der Erfolg der genomischen Mutagenese bei über 60 % lag (Ren et al. 2014). Dies entspricht einem GC-Gehalt in diesem Bereich von mindestens 67 %. In dieser Arbeit waren jeweils fünf der sechs Nukleotide „G“ bzw. „C“, was einem GC-Gehalt von 83,3 % entsprach (vgl. Tabelle 6.1–1). Dementsprechend wurde die sgRNA in den verschiedenen pKDsgRNA-Plasmiden in dieser Arbeit so konstruiert, dass sie geeignet für die genomische Mutagenese war.

Tabelle 6.1–1: GC-Gehalt der N₂₀-Sequenzen der verwendeten pKDsgRNA-Plasmide

Plasmid	N ₂₀ -Sequenz	GC-Gehalt (in %)		
		Gesamt (= 20 nt PAM-proximal)	12 nt PAM-proximal	6 nt PAM-proximal
pKDsgRNA-HPclpA	CGAAATCG <u>AGAAAGCGCACC</u>	55,0	58,3	83,3
pKDsgRNA-HPclpA-MIVa	ACGAAATCG <u>AGAAAGCGCACC</u>	55,0	66,7	83,3
pKDsgRNA-HPclpA-Mut14	ACGAATCG <u>AGAAAGCGCACC</u>	55,0	58,3	83,3

Legende:
 Der unterstrichene Bereich der N₂₀-Sequenz entspricht den 12 nt PAM-proximal.
 Der fett gedruckte Bereich der N₂₀-Sequenz entspricht den 6 nt PAM-proximal.

Des Weiteren sollte bei der Betrachtung des GC-Gehaltes verstärkt auch auf den Anteil von „G“ geachtet werden. Bei vermehrten „G“-Wiederholungen steigt die Wahrscheinlichkeit eine PAM-Stelle (5'-NGG-3') in der N₂₀-Sequenz zu finden. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System negativ beeinflusst wird (Malina et al. 2015). In allen drei N₂₀-Sequenzen der hier verwendeten pKDsgRNA-Plasmide liegen keine weiteren PAM-Stellen vor. Die Endonuklease *Cas9* wurde dadurch nicht beeinträchtigt.

Außerdem galt es zu beachten, dass die zwölf Nukleotide PAM-proximal so spezifisch für das durch das CRISPR/*Cas9*-System zu verändernde Target sind, dass es keinen zusätzlichen Sequenzabschnitt gibt, der komplett identisch ist und zudem noch eine PAM-Stelle im Anschluss beinhaltet. Ein starker *off-target* Effekt würde zum Zelltod führen, wohingegen ein schwächerer repariert werden würde (Reisch/Prather 2017). Dieses könnte gegebenenfalls zu kleinen Fehlern in der Sequenzabfolge führen. Generell wurden die N₂₀-Sequenzen wie in Kapitel 8.2.2.10.1 beschrieben mit dem Cas-OFFinder

überprüft (Bae/Park/Kim 2014; Molecular Genome Engineering Lab - Hanyang University Korea 2016). Zudem wurde nachträglich dieses Programm noch abweichend verwendet, um die Spezifität der 12 nt PAM-proximal Region zu kontrollieren. Dazu wurden die 15 Nukleotide PAM-proximal der N₂₀-Sequenz verwendet. Das Programm benötigt dies als minimale Sequenzeingabe, daher wurden nicht nur die zwölf Nukleotide gewählt. Mit der Einstellung der *Mismatch*-Anzahl auf „3“ und der Endonuklease-Auswahl auf „SpCas9 from *Streptococcus pyogenes*: 5'-NRG-3' (R = A oder G)“ wurde die Sequenz übermittelt. Mit der Auswahl der „NRG“ PAM-Stelle wurde dadurch noch weitläufiger gesucht. Die angezeigten Ergebnisse der gefundenen Targets wurden nun dahingegen untersucht, ob eine weitere Position im Genom vorhanden war, bei der dieselbe 12 nt Sequenz vorliegt und sich im Anschluss ein PAM-Stelle befindet. Alle gefundenen Positionen wiesen mindestens ein *Mismatch* innerhalb der zwölf Nukleotide auf. Dementsprechend war sichergestellt, dass die verwendete N₂₀-Sequenz auch diesen optionalen Aspekt beachtete.

Bei diesen Betrachtungen, als der Fokus vor allem auf den zwölf Nukleotiden PAM-proximal lag, viel im Nachhinein auf, dass bei der indirekten Mutagenese über die Zwischenstufe *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14 die einzuführende Mutation zwar im Bereich der N₂₀-Sequenz lag, jedoch nicht innerhalb der zwölf Nukleotide. Dies erklärt im Anschluss die schlechtere Effizienz der genomischen Mutagenese in diesem Stamm.

Ein weiterer Aspekt zielt ebenfalls auf die Targetspezifität ab. Durch die Induktion der Endonuklease *Cas9* kommt es gewöhnlich zu einer Zellzahlabnahme zwischen induzierten und uninduzierten Bakterienzellen von 10³ bis 10⁵ (Reisch/Prather 2017). Eine darunter liegende Abnahme spricht für eine schlechte Targetspezifität. Eine Zellzahlabnahme um den Faktor 10 liefert höchst wahrscheinlich keinen Erfolg in der genomischen Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System (Reisch/Prather 2017). Wird der Quotient aus der Koloniezahlanzahl der Bakterienzellen, welche das Plasmid pCas9-CR4 und ein pKDsgRNA-Plasmid tragen, von denjenigen, die auf Spectinomycin und Chloramphenicol wachsen und jenen, die auf diesen beiden Antibiotika und dem Zusatz von Anhydrotetracyclin wachsen, gebildet, kann die Targetspezifität charakterisiert werden. Generell lag dieser Quotient in dieser Arbeit weit über 100 und kam an die 1000 heran. Jedoch konnte keine Zellzahlabnahme um den Faktor 10⁴ bzw. 10⁵ erreicht werden. Da diese Untersuchung pro genomischer Mutagenese jeweils nur einmal durchgeführt wurde, konnten keine statistischen Betrachtungen dazu erhoben werden. Des Weiteren war der Unterschied zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen teilweise nicht mehr genau auszählbar. Dies ließ jedoch im Umkehrschluss auf einen Zellzahlunterschied mindestens im Bereich des 10³-Faktors zurückschließen. Bei der genomischen Mutagenese von *E. coli* WT mit der *clpA*-Mutation aus *E. coli* MIVa (vgl. Kapitel 5.3.1) zeigte sich beispielsweise eine Zellzahlabnahme von 1408 Kolonien auf zwei Kolonien auf Anhydrotetracyclin. Der Quotient liegt mit 704 also bei einem

Faktor von $0,7 \times 10^3$ etwas unter den gewöhnlichen Zellzahlabnahmen. Generell wurden demnach nicht die starken Unterschiede wie bei den Versuchen von Christopher R. Reisch und Krista-la L. J. Prather erlangt, jedoch lag die Targetspezifität im ausreichenden Bereich.

6.1.2.3 Auswahl eines geeigneten Oligonukleotids

Neben den Aspekten der Targetspezifität und der Auswahl einer geeigneten sgRNA, kann auch die Wahl des Oligonukleotids einen Einfluss auf die genomische Mutagenese ausüben. Wie in dem Kapitel 8.2.2.10.2 beschrieben, wurden die in dieser Arbeit verwendeten langen Oligonukleotide für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/Cas9-System mit dem Programm mFold (Zuker 2003; Zuker o. J.) auf ihre Sekundärstrukturen überprüft. Der folgenden Tabelle 6.1–2 sind die Ergebnisse dieser Analyse, die Faltungsenergien, als ΔG in kcal/mol zu entnehmen. Aufgeführt ist jeweils das niedrigste ΔG . Die jeweils fünf wahrscheinlichsten Sekundärstrukturen, welche mit dem Programm mFold generiert wurden, mit ihren zugehörigen ΔG -Werten sind im Anhang in Kapitel 10.2 aufgeführt.

Tabelle 6.1–2: Sekundärstrukturanalyse der langen Oligonukleotide

Oligonukleotid	Charakteristik	Länge [nt]	Sequenz (5' → 3')	Sekundärstrukturanalyse: Maximale Faltungsenergie ΔG [kcal/mol]
clpA_1702delA_noSCAR	<i>clpA</i> aus <i>E. coli</i> MIVa	81	GTCCATCACCTGCAAGAGGAT-GTTGAACACGTCCGGGTGCGC-TTCTCGATTTTCGTCCAGCAGC-AGCACCGCATGTGGATGC	-9,91
clpA_1702insA_noSCAR	<i>clpA</i> aus <i>E. coli</i> WT	82	GTCCATCACCTGCAAGAGGAT-GTTGAACACGTCCGGGTGCGC-CITTCTCGATTTTCGTCCAGCA-GCAGCACCGCATGTGGATGC	-9,28

Dementsprechend wiesen beide Oligonukleotide ein geringeres ΔG auf als ein maximal zu verwendendes von -12,5 kcal/mol (Reisch/Prather 2017). Es wurde angenommen, dass diese Oligonukleotide so genutzt werden konnten. Ansonsten wäre es möglich gewesen, diese zu verändern, indem die Lage leicht verschoben werden hätte können, sodass sich die einzuführende Mutation nicht mehr exakt mittig des Oligonukleotids befunden hätte. Viele weitere Möglichkeiten der Position des Oligonukleotides wären möglich gewesen, um eine bessere maximale Faltungsenergie in der Sekundärstrukturanalyse zu erzielen. Allein, dass zwischen der einzuführenden Mutation und dem Ende des Oligonukleotids noch mindestens 15 bp liegen, sollte beachtet werden (Reisch/Prather 2017).

Bei der näheren Betrachtung der Sekundärstrukturen der verwendeten Oligonukleotide (vgl. Kapitel 10.2) fällt auf, dass die möglichen Sekundärstrukturen im Allgemeinen untereinander sehr ähnlich sind. Generell bildet sich eine längere *stem*-Struktur aus, die auch bei der *clpA*-Deletionsmutation gebildet wird. Durch den etwas niedrigeren ΔG -Wert (-9,91 statt -9,28 kcal/mol) ersichtlich, wird die Struktur dann sogar noch einfacher gebildet (vgl. Abbildung 10.2–1 und Abbildung 10.2–6). Auffällig ist jedoch außerdem, dass die Sekundärstruktur 5 des Oligonukleotids *clpA_1702insA_noSCAR* nicht bei den Strukturen von *clpA_1702delA_noSCAR* bei der Sekundärstrukturanalyse mit dem Programm mFold auftritt. Im Umkehrschluss tritt diese Struktur nur in der Wildtypvariante auf und nicht bei der Mutante *E. coli* MIVa. Möglicherweise bevorzugt die Mutante *E. coli* MIVa demnach die andere Sekundärstruktur. Bei genauerer Betrachtung der zusätzlich aufgetretenen und unerwünschten Mutationen bei der genomischen Mutagenese von *E. coli* MIVa mit der *clpA*-Wildtypsequenz aus *E. coli* WT sticht eine Mutation besonders hervor, da diese gleich dreimal auftritt: Die Deletion eines Adeninukleotids *upstream* der bekannten Mutation in *E. coli* MIVa in den CRISPR-Mutanten #14, #58 und #178 (vgl. Kapitel 5.3.2.1.3, Abbildung 5.3–6). Wenn diese Deletion in einer erneuten Sekundärstrukturanalyse eingeführt wird, fällt auf, dass sich die eine spezielle Struktur der Wildtypform (Sekundärstruktur 5 von *clpA_1702insA_noSCAR*, Abbildung 10.2–10) nun nicht mehr ausbildet. Ansonsten bildet sich die bekannte *stem*-Struktur und die ΔG -Werte bleiben identisch (vgl. Abbildung 6.1–1). Diese Zusatzmutation scheint aufzutreten, um die eigentliche *stem*-Struktur, die *E. coli* MIVa bevorzugt, weiter verstärkt zu begünstigen.

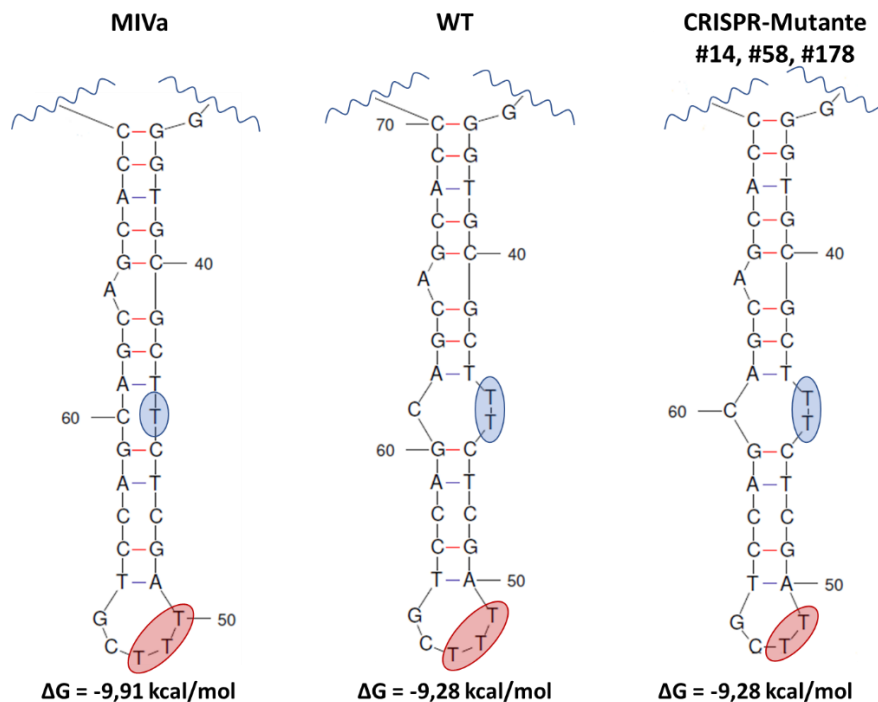


Abbildung 6.1–1: Sekundärstrukturen mit ihren zugehörigen ΔG -Werten (modifiziert nach: Zuker o. J.)

Dargestellt sind Ausschnitte der Sekundärstrukturanalyse mit ihren zugehörigen Faltungsenergien als ΔG . Die blau markierten Bereiche zeigen die Position der bekannten *clpA*-Mutation. In Rot hinterlegt ist die Position der unerwünschten zusätzlichen Mutation während der genomischen Mutagenese mit dem CRISPR/Cas9-System.

Ein weiterer Diskussionspunkt für das Oligonukleotid bezieht sich auf dessen Konstruktion. Entgegen den Angaben von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather wurden in dieser Arbeit die Phosphothioat-Brücken nicht nur am 5'-Ende verwendet (Reisch/Prather 2017), sondern die letzten vier Nukleotide beider Enden des Oligonukleotids wurden über die Phosphothioat-Brücken verknüpft (vgl. Tabelle 8.1–3 und Kapitel 8.2.2.10.2). Generell wurden die Oligonukleotide durch diese Modifikation vor dem Abbau durch extra- und intrazelluläre Nucleasen geschützt (Putney/Benkovic/Schimmel 1981). Bei *Escherichia coli* gibt es vorrangig 3' → 5' Exonucleasen (Lovett 2011, Table 1). Diese stehen vor allem im Zusammenhang mit verschiedenen Reparaturmechanismen und der *proof reading*-Funktion der Polymerasen. Das für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/Cas9-System konstruierte Oligonukleotid wurde so ausgewählt, dass dieses mit dem *lagging strand* korrespondiert (vgl. Kapitel 8.2.2.10.2). Es wurde bereits gezeigt, dass dadurch eine höhere Rekombinationsfrequenz erzeugt werden konnte (Ellis et al. 2001). Mechanistisch wird das Oligonukleotid durch das Protein Beta, einem Bestandteil des λ -Red-Systems, welches ssDNA bindet (Poteete 2001), im Zuge der Replikation an die zu ihm komplementäre Region, dem Eltern-DNA-Strang, der als Vorlage für die Synthese des *lagging strand* dient, herangeführt (Murphy 2016). Demnach wird das Oligonukleotid während der Replikation des Bakterienchromosoms zwischen den Okazaki-Fragmenten integriert (Huen et al. 2006; Radecke et al. 2006). Während dieser *lagging strand* Syn-

these der Replikation spielt neben der DNA-abhängigen DNA-Polymerase III, der Hauptpolymerase der Replikation (Gefter et al. 1971; Marians et al. 1998), auch die DNA-Polymerase I eine entscheidende Rolle (Kurth/O'Donnell 2009; Lovett 2011). Diese Polymerase besitzt eine 5' → 3' Exonukleaseaktivität (Klett/Cerami/Reich 1968) und wurde anfänglich auch als Exonuklease VI bezeichnet. Daher ist die Verwendung der Phosphothioat-Brücken am 5'-Ende des Oligonukleotids besonders entscheidend. Während die DNA-Polymerase I über ihre Exonukleaseaktivität im Zuge der Prozessierung die RNA-Primer abbaut, synthetisiert sie im gleichen Zuge in 5' → 3' Richtung den DNA-Strang und füllt damit die Lücken zwischen den Okazaki-Fragmenten (Kurth/O'Donnell 2009). Bei dieser Polymerase-Reaktion wird der nukleophile Angriff der freien 3'-OH-Gruppe am Ende des DNA-Stranges auf das α -Phosphat eines freien einzubauenden Nukleotids katalysiert. Eine Phosphodiesterbindung wird geknüpft. Durch die Phosphothioat-Brücken zwischen den letzten vier Nukleotiden des Oligonukleotids ist die freie endständige 3'-OH-Gruppe nicht beeinträchtigt (vgl. Abbildung 8.2–12, Kapitel 8.2.2.10.2). Jedoch könnten diese Brücken die DNA-Polymerase I anders beeinflussen als die gewöhnlichen Phosphodiester. Generell wurden allerdings auch Phosphothioat-Modifikationen in genomischer DNA verschiedener Bakterienstämme gefunden (Wang et al. 2007). Des Weiteren ist der Einsatz von Oligonukleotiden mit Phosphothioat-Brücken an ihren 3'-Enden beschrieben, um eine PCR-Reaktion zu optimieren, wenn Polymerasen mit *proof reading*-Funktion zum Einsatz kommen (Skerra 1992). Bei der *proof reading*-Funktion handelt es sich um eine 3' → 5' Exonukleaseaktivität. Die Degradierung des Oligonukleotides kann dementsprechend über den Einsatz der Phosphothioat-Brücken verhindert werden. Diese modifizierten Primer fanden auch Anwendung in einer Art sequenzspezifischen PCR zum Nachweis von SNPs, bei der eine Polymerase mit *proof reading*-Aktivität zum Einsatz kam (Zhang/Li 2003). Zu beachten gilt jedoch, dass generell durch die Modifikation, bei der es zu einem Austausch von einem Sauerstoffatom zu einem Schwefelatom kommt, ein Chiralitätszentrum generiert wird (Nawrot et al. 2008). Bei Restriktionsendonukleasen konnte gezeigt werden, dass diese abhängig von der Stereochemie eine Phosphothioat-modifizierte DNA unterschiedlich schneiden (Potter/Eckstein 1984). Bei verschiedenen anderen Nukleasen konnte ebenfalls eine solche Abhängigkeit gezeigt werden. Jedoch ist nicht generell immer ein Diastereomer dem anderen überlegen; die Stereochemieabhängigkeit kann bei den jeweiligen Enzymen unterschiedlich sein (zusammengefasst von: Nawrot et al. 2008). Bei den Herstellungsmethoden der Primer mit Phosphothioat-Brücken ist der Standard, eine Zufallsmischung der Diastereomere zu generieren (Stec/Zon/Uznanski 1985). Auch bei der Bestellung der Phosphothioat-Oligonukleotide bei Invitrogen™, die zu Thermo Fisher Scientific gehören, konnte nicht zwischen den Diastereomeren ausgewählt werden (Thermo Fisher Scientific o. J.). Generell ist die Exonukleaseaktivität jedoch durch die Verwendung der Phosphothioat-Brücken an den 3'-Enden der Oligonukleotide, auch in racemischen Gemischen, eingeschränkt. Auch die Polymerasen bemerken die Phosphothioat-Verknüpfungen,

jedoch nur in ihrer *proof reading*-Aktivität, den 3' → 5' Exonukleasen. Dort konnte auch gezeigt werden, dass eins der beiden Diastereomere bevorzugt die Exonukleaseaktivität beeinflusst. Aber auch bereits ein racemisches Gemisch der Phosphothioat-verknüpften Oligonukleotide konnte die *proof reading*-Funktion der verwendeten Polymerase mehr unterdrücken als ein herkömmliches Oligonukleotid mit reinen Phosphodiesterbindungen (Nawrot et al. 2008). Die eigentliche Funktion der Polymerase, das Verknüpfen von Phosphodiesterbindungen und damit das Verlängern des DNA-Stranges, wurde durch die Verwendung der zusätzlichen Phosphothioat-Brücken am 3'-Ende des Oligonukleotids nicht beeinträchtigt. Da die während der genomischen Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System einzuführende Mutation sich relativ mittig des ca. 80 nt langen Oligonukleotids befand, welches im Ganzen zwischen den Okazaki-Fragmenten eingebaut werden und von der Polymerase verlängert werden sollte, hätte das 3'-Ende nicht zwingend vor dem Abbau der Exonuklease, der *proof reading*-Funktion der Polymerase, geschützt werden müssen. Eine Phosphothioat-Modifikation am 5'-Ende des Oligonukleotids, wie von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather beschrieben, wäre demnach für diese Anwendung ausreichend gewesen (Reisch/Prather 2017). Die zusätzliche Modifikation am 3'-Ende hat jedoch auch keine negativen Auswirkungen gezeigt.

6.1.2.4 Betrachtung der Effizienz der genomischen Mutagenese

Generell wurde von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather das auch in dieser Arbeit genutzte no-SCAR System (*Scarless Cas9 Assisted Recombineering*) als Anwendung des CRISPR/*Cas9*-Systems speziell für *Escherichia coli* entwickelt (Reisch/Prather 2015). Sie betonen, dass das System auch für den Bakterienstamm *E. coli* MG1655 effizient nutzbar ist, also auch für Stämme, bei denen keine Mutation in dem Gen *mutS* vorliegt, welche eine höhere Mutationseffizienz aufgrund des defekten *mismatch-repair* Systems aufweisen (Reisch/Prather 2017). Es handelt sich bei dem Stamm *E. coli* MG1655 jedoch ebenfalls um einen Laborstamm. Er ist ein Abkömmling des *E. coli* K-12 eines Diphtheriepatienten aus dem Jahr 1922 (Bachmann 1972; Bachmann 1996). Der Phage Lambda und der F-Faktor sind nicht mehr vorhanden und außerdem liegt eine Uracil Auxotrophie vor (Blattner et al. 1997; Jensen 1993). Aufgrund seiner wenigen genetischen Veränderungen nähert sich der Labor-Bakterienstamm einem Wildtyp stark an. In dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich mit Wildtyp-Stämmen gearbeitet, nämlich einem klinischen Stuhlisolat und seinen Abkömmlingen aus Selektionsexperimenten (Heisig/Tschorny 1994). Generell kann das no-SCAR System bei den meisten *E. coli* Stämmen angewendet werden, jedoch kann dabei die Effizienz variieren und niedriger sein als bei den K-12-Stämmen wie *E. coli* MG1655 (Reisch/Prather 2017). Dementsprechend war zu erwarten, dass in dieser Arbeit Unterschiede in der Effizienz der genomischen Mutagenese mit dem

CRISPR/*Cas9*-System, bzw. speziell mit dem no-SCAR System, im Vergleich zu den von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather beschriebenen Daten auftreten konnten.

Des Weiteren ist die Effizienz der genomischen Mutagenese auch von der Art der mit dem CRISPR/*Cas9*-System einzuführenden Mutation abhängig. So werden Deletionen und kurze Insertionen deutlich weniger effizient als Punktmutationen in das bakterielle Genom integriert; es sei dabei dementsprechend nötig mehrere Dutzend Kolonien zu überprüfen, um eine mit der gewünschten Mutation zu finden (Reisch/Prather 2017). Da in dieser Arbeit ausschließlich kleine Deletionen bzw. Insertionen und keine einfachen Punktmutationen in das Genom von *Escherichia coli* eingeführt wurden, erklärt sich die niedrigere Effizienz dieser Mutagenese. Für die genomische Mutagenese von *E. coli* WT mit der *clpA*-Deletion betrug die Effizienz 4 % (2 von 50 getesteten Kolonien) und bei *E. coli* MIII mit der *clpA*-Deletion 2,85 % (2 von 70 getesteten Kolonien), wobei bei der Mutagenese von *E. coli* MIII zusätzliche unerwünschte Mutationen aufgetreten sind, wie im Anschluss in einer Genomsequenzierung bestätigt wurde (Heisig, A., Groth, P., persönliche Mitteilung) (vgl. Kapitel 10.4). Zur Steigerung der Effektivität könnte eine kleine Alternative der Methode getestet werden. So könnte anstelle des langen Oligonukleotids doppelsträngige DNA für die genomische Mutagenese genutzt werden. Die DNA sollte dabei große Bereiche aufweisen, die homolog zum Bakteriengenom sind. Da die gewünschte Mutation bereits in einem anderen *Escherichia coli* Stamm vorlag, könnte ein Bereich von 400 bp bis 1 kb, bei dem die gewünschte Mutation mittig liegt und dementsprechend an beiden Enden lange Homologiebereiche bestehen, mit einer PCR amplifiziert werden und als dsDNA für die genomische Mutagenese genutzt werden. Dieser Ansatz könnte einen Vorteil der Effizienz aufweisen (Reisch/Prather 2017). Bei der herkömmlichen homologen Rekombination unter Verwendung des λ -Red-Systems dagegen zeigt sich dieser Vorteil in der Effektivität jedoch nicht. Für Deletionen und Insertionen von mindestens 20 Nukleotiden liegt die Rekombinationsfrequenz bei 10^{-4} bis 10^{-5} (Sharan et al. 2009; Thomason et al. 2014). Durch die Verwendung von ssDNA, wie der Oligonukleotide, wird die Rekombinationsrate auf 0,1 % bis 1 % erhöht (Costantino/Court 2003; Ellis et al. 2001). Dies zeigt, dass die Verwendung von dsDNA bei dem λ -Red-System für diesen Mutationstyp weniger effizient ist. Dementsprechend würde auch mit dem no-SCAR System der Einsatz der dsDNA nicht zwingend einen Vorteil in der Effizienz erwarten lassen, um schwierige Mutationen (größere Deletionen bzw. Insertionen) verbessert in das Bakteriengenom einführen zu können. Generell ist jedoch anzumerken, dass sich unter Verwendung des CRISPR/*Cas9*-Systems in Kombination mit dem λ -Red-System die Effizienz im Vergleich zu dem herkömmlichen λ -Red-System allein verbessert hat, auch wenn diese immer noch gering erscheint.

Neben der durch die Wahl einer geeigneten sgRNA hervorgerufenen Targetspezifität (vgl. Kapitel 6.1.2.2) und der damit verbundenen möglichst reduzierten *off-target* Effekte (Cho et al. 2014; Hsu et

al. 2013; Lin et al. 2014; Zhang et al. 2015), sind jedoch vor allem bei Untersuchungen mit embryonalen Stammzellen von Mäusen oder auch frühen menschlichen Embryos ebenfalls unerwartete Mutationen im Bereich des zu verändernden Targets (*on-target*) aufgetreten und beschrieben worden (Alanis-Lobato et al. 2021; Geng et al. 2021; Kosicki/Tomberg/Bradley 2018; Lee/Kim 2018). Dies verdeutlicht die Dringlichkeit der genauen Untersuchung der genomischen Mutanten mithilfe der Sequenzierung, um Abweichungen, die während der genomischen Mutagenese aufgetreten sind, feststellen zu können. Dementsprechend sind die teilweise aufgetretenen unerwünschten *on-target* Mutationen der in dieser Arbeit generierten genomischen *clpA*-Mutanten bei *Escherichia coli* nicht zwingend als ungewöhnlich einzustufen. Die Notwendigkeit der durchgeführten Sequenzierungen (vgl. Kapitel 10.3 und 10.4 im Anhang) spiegelt sich darin wider, bevor phänotypische Untersuchungen durchgeführt werden und Rückschlüsse auf die Auswirkungen einer Mutation gezogen werden.

Zusammenfassend konnten generell genomische *clpA*-Mutanten mit dem CRISPR/*Cas9*-System konstruiert werden (*E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12) (vgl. Kapitel 5.3.1 und 5.3.3) und das no-SCAR System von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather für die Mutagenese von *Escherichia coli* Wildtyp-Stämmen im Zuge dieser Arbeit etabliert werden. Dies galt vor allem für den Mutationstyp der Deletion, der bekanntermaßen nicht so einfach und effektiv, wie eine Punktmutation, umzusetzen ist (Reisch/Prather 2017). Bei der Mutagenese von *E. coli* MIII zeigten sich jedoch im Anschluss in der Genomsequenzierung zwei weitere unerwünschte Mutationen (vgl. Kapitel 10.4 im Anhang, Abbildung 10.4–2 und Abbildung 10.4–3) (Heisig, A., Groth, P., persönliche Mitteilung). Die Mutagenese von *E. coli* MIVa zeigte in mehreren Versuchen den erfolgreichen Einbau der gewünschten *clpA*-Mutation, jedoch brachte sie zusätzliche unerwartete *on-target* Mutationen mit sich, welche im Zuge der Sanger-Sequenzierung festgestellt wurden (vgl. Kapitel 5.3.2). Die zusätzlich parallel durchgeführten Experimente der Komplementation konnten die *clpA*-Wildtyp Variante in der Mutante *E. coli* MIVa etablieren (vgl. Kapitel 5.2 und 6.1.1). Phänotypisch konnte dies ebenfalls durch den *in-vivo* Funktionstest von ClpA bestätigt werden (vgl. Kapitel 5.4.1 und 6.1). Dies deutet auf einen methodischen Zusammenhang im Zuge der Verwendung des no-SCAR Systems hin. Die vorhandene *clpA*-Mutation konnte nicht zurück in die *clpA*-Wildtyp Variante mutiert werden bzw. nicht ohne zusätzliche unerwünschte *on-target* Mutationen mit sich zu bringen. Das in dieser Arbeit genutzte und von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather konstruierte Plasmid pCas9-CR4 weist eine SsrA-Markierung auf (vgl. Kapitel 8.2.2.10.1). Diese wurde C-terminal von *cas9* angefügt, um eine stärkere Kontrolle über die Expression von *cas9* zu erreichen, da die SsrA-Markierung als eine Erkennungssequenz für die Protease ClpP gilt und damit ein schnellerer bzw. effizienterer Abbau von *Cas9* erreicht wird (McGinness/Baker/Sauer 2006; Reisch/Prather 2015). SsrA-markierte Proteine

können sowohl von der Protease ClpXP als auch von der Protease ClpAP erkannt und abgebaut werden (Gottesman et al. 1998). In der stationären Wachstumsphase von *Escherichia coli* ändert sich das Verhältnis von ClpXP und ClpAP. Ein verstärktes Vorkommen der Protease ClpAP in dieser Phase äußert sich auch in einem verstärkten Abbau SsrA-markierter Proteine (Farrell/Grossman/Sauer 2005). Generell ist jedoch die Protease ClpXP für 90 % des Abbaus SsrA-markierter Proteine verantwortlich (Lies/Maurizi 2008). Durch die Zugabe von Anhydrotetracyclin wird die Expression der SsrA-markierten Endonuklease *Cas9* im Zuge der genomischen Mutagenese induziert. Im Anschluss ist wichtig, dass die Endonuklease auch wieder effektiv eliminiert wird. Denkbar ist, dass durch die Überexpression von *Cas9* sämtliche Proteasen benötigt werden, um die Endonuklease wieder in der Anzahl zu dezimieren. Jedoch ist die Protease ClpAP in der Mutante *E. coli* MIVa (GK 575) aufgrund der vorliegenden *clpA*-Mutation defekt (vgl. Kapitel 5.1). Vorstellbar ist dadurch eine verzögerte Reduzierung der Endonuklease *Cas9* während der genomischen Mutagenese, wodurch ein erneutes Schneiden des Genoms und eine darauf folgende fehlerbehaftete Reparatur ausgelöst werden könnte. Dies könnte die zusätzlich aufgetretenen *on-target* Mutationen erklären. Die vorhandene *clpA*-Mutation hindert daran, die Methode der genomischen Mutagenese mit dem no-SCAR System erfolgreich einzusetzen, um genau diese Mutation zu eliminieren.

6.2 Einfluss der *clpA*-Mutation auf das Wachstumsverhalten

Im Rahmen dieser Arbeit galt es u. a. auch die *clpA*-Mutation phänotypisch zu charakterisieren. Dazu wurde zunächst das Wachstumsverhalten betrachtet und mit verschiedenen Stämmen verglichen. Zuerst wurde das Wachstumsverhalten der Stämme des Komplementationsexperimentes ermittelt (vgl. Kapitel 5.2 und 5.4.2). Dabei wurde zum ersten Mal deutlich, dass keine eindeutigen Unterschiede im Wachstumsverhalten zu verzeichnen sind. Gewiss entsprach dies bei der Mutante *E. coli* MIVa mit dem Kontrollplasmid pHPAS10-01.1 den Erwartungen, jedoch zeigte die Wachstumskurve des Stammes *E. coli* MIVa pHPAS10-01.4 einen ähnlichen Verlauf bzw. auch eine vergleichbare Steigung mit der Kurve des Referenzstammes *E. coli* MIVa. Die Mutante *E. coli* MIII hingegen wies ein deutlich schnelleres Wachstumsverhalten auf, sichtbar an der größeren Steigung der Wachstumskurve, die mit den Daten generiert wurde, die zeitgleich mit dem oCelloScope™ aufgenommen wurden (vgl. Abbildung 5.4–4). Somit konnten gerätespezifische Faktoren als Gründe für die voneinander abweichenden Wachstumsverhalten ausgeschlossen werden. Über das Komplementationsplasmid pHPAS10-01.4 wurde der Mutante *E. coli* MIVa die genetische Information für die ATPase Einheit der Protease ClpAP in seiner Wildtyp-Form hinzugefügt. Die daraus resultierende vollständige Funktionalität der Protease konnte mithilfe des *in-vivo* Funktionstests von ClpA erfolgreich bestätigt werden (vgl. Kapitel 5.4.1, Abbildung 5.4–1 und Kapitel 6.1.1). Demnach wurde deutlich, dass die Komple-

mentation jedoch keine Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten zeigte. Im Anschluss wurden die Stämme betrachtet, bei denen die *clpA*-Mutation direkt in das Bakteriengenom integriert wurde. So stand bei dem Vergleich des Stammes *E. coli* WT (GK 571) und der CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 (GK 4542) zunächst lediglich die *clpA*-Mutation im Vordergrund. In LB-Medium zeigten beide Stämme kein unterschiedliches Wachstumsverhalten zueinander (vgl. Abbildung 5.4–5). Ein leicht verzögertes Wachstum wies die CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 in M9Glu-Medium auf. Die Steigung der beiden Wachstumskurven in der exponentiellen Phase verläuft jedoch annähernd parallel (vgl. Abbildung 5.4–6). Dies verdeutlicht, dass die beiden Stämme keine unterschiedliche Generationszeit aufweisen. Demnach war auch im direkten Vergleich des Wildtyps mit der CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 ersichtlich, dass die *clpA*-Mutation allein keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Bakterienstämme besaß. Zur Verifikation dieser Beobachtung, wurde zuletzt das Wachstumsverhalten im Zusammenhang mit weiteren im Zuge der Selektion aufgetretenen Mutationen betrachtet. Dazu wurden als Vergleich die beiden Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa mit der zweiten CRISPR-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 (GK 4686) gegenübergestellt (vgl. Abbildung 5.4–7). Die Mutante *E. coli* MIVa geht direkt aus *E. coli* MIII hervor. Aufgrund der Selektion auf Chinolonen-haltigem Medium, weisen beide Stämme die typischen Mutationen der Targets der Fluorchinolone auf (Bagel et al. 1999; Heisig/Tschorny 1994). Auch unter dem Hintergrund vorhandener Mutationen in den Genen *gyrA*, *parC* und *marR* war bei der CRISPR-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 kein signifikant abweichendes Wachstumsverhalten im Vergleich zu der verwandten Mutante *E. coli* MIII zu beobachten. Das Wachstumsverhalten von *E. coli* MIVa unterschied sich deutlich von den anderen beiden Mutanten. Demnach ist generell zu sagen, dass unter normalen Wachstumsbedingungen die *clpA*-Mutation kein verändertes Wachstumsverhalten bewirkt. Anders verhält es sich allerdings unter der Zugabe von Antibiotika. Das Wachstumsverhalten in Bezug auf die *clpA*-Mutation unter induzierten Bedingungen wird in Kapitel 6.4 diskutiert. Des Weiteren deuten die Unterschiede im Wachstumsverhalten unter normalen, uninduzierten Bedingungen zwischen den beiden Mutanten *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa darauf hin, dass sich noch weitere Varianten im Genom dieser beiden *E. coli* Stämme befinden. Diese Vermutung konnte durch die erfolgte Genomsequenzierung beider Stämme bestätigt werden (Heisig, A., Groth, P., persönliche Mitteilung) (vgl. Kapitel 10.4). Dementsprechend könnten die Mutationen in den regulatorischen Bereichen der Gene *yafV* oder *ycjX* (vgl. Abbildung 10.4–4 und Abbildung 10.4–5), welche in der Genomsequenzierung von *E. coli* MIVa ermittelt wurden, für das langsamere Wachstum dieser Mutante unter normalen Wachstumsbedingungen verantwortlich sein.

Auch in der Literatur wird beschrieben, dass *Escherichia coli* Stämme mit einer Mutation bzw. einem Defekt in ClpA generell keine Defizite im Wachstum aufzeigen. Dies gilt sowohl in einem Minimalmedium als auch in einem Vollmedium (Katayama et al. 1988). Des Weiteren wird dargestellt, dass eine

clpA-Knockout-Mutante ein vergleichbares Wachstum wie der zugehörige Wildtypstamm und auch wie eine *clpP*-Knockout-Mutante aufweist. Eine *clpX*-Knockout-Mutante wächst im Vergleich zu den drei anderen verwandten Stämmen schlechter (Hoskins/Kim/Wickner 2000). Diese Literaturdaten zu den *clpA*-Mutanten im Vergleich zu dem jeweils verwandten Wildtypstamm decken sich mit den in dieser Arbeit generierten Ergebnissen.

6.3 Einfluss der *clpA*-Mutation auf die Antibiotikaempfindlichkeit

Zur weiteren phänotypischen Untersuchung der *clpA*-Mutation wurde neben der Untersuchung des Wachstumsverhaltens auch die minimale Hemmkonzentration verschiedener Antibiotika(klassen) bestimmt (vgl. Kapitel 5.4.3). Ein Augenmerk wurde dabei auf die Aminoglykoside gelegt, für die die MHK sowohl bei Stämmen mit genomischer *clpA*-Mutation als auch bei Stämmen des Komplementationsexperimentes bestimmt wurde.

Aminoglykoside binden an die 30S-Untereinheit der Ribosomen und inhibieren die Translokation im Elongationszyklus der Proteinbiosynthese, wodurch es zu einem Einbau inkorrektter Aminosäuren in das Protein kommen kann (Cabañas/Vázquez/Modolell 1978; Wilson 2009). Diese vermehrt gebildeten *nonsense*-Proteine werden u. a. in die Bakterienmembran eingelagert, wodurch diese permeabler für weitere Moleküle der Aminoglykoside wird (Busse/Wöstmann/Bakker 1992). Es kommt zur Lyse der Bakterienzellen. Eine bakterizide Wirkung ergibt sich dadurch für die Aminoglykoside.

Der Proteasekomplex ClpAP ist u. a. für den Abbau denaturierter oder defekter Proteine zuständig (Gottesman/Maurizi 1992). Sobald die in dieser Arbeit untersuchte *clpA*-Mutation vorliegt, kann der Komplex aus ClpA und ClpP nicht eingegangen werden (vgl. Kapitel 5.1). Ein Abbau der *nonsense*-Proteine wird verhindert, sie werden vermehrt in die Zellmembran eingelagert und bei einer Behandlung mit Aminoglykosiden können diese dadurch noch schneller die Zellmembran passieren und ihre Wirkung entfalten. Durch die *clpA*-Mutation sind die betroffenen Bakterienzellen sensibler gegenüber Aminoglykosiden bzw. andersherum sind die Bakterien unempfindlicher dem Antibiotikum gegenüber, sobald die *clpA*-Mutation komplementiert wird.

Diese Unterschiede in den MHK-Werten sind gering, jedoch zeigt sich die Tendenz eindeutig. Bei Bakterienstämmen mit einer höheren Grundresistenz gegenüber Aminoglykosiden würden sich die Unterschiede sicherlich deutlicher in den MHK-Daten (absolute Zahlen) widerspiegeln. Jedoch galt die Bestimmung der Aminoglykosid MHK lediglich zur näheren Charakterisierung der *clpA*-Mutation. Die Tendenz reichte für die Aussage aus, sodass keine weiteren Stämme, mit höherer Aminoglykosid-Grundresistenz, zusätzlich genomisch in dem Gen *clpA* mit dem CRISPR/*Cas9*-System verändert wurden.

In der Literatur wird bei *Escherichia coli* bezüglich einer Aminoglykosid-Resistenz nur ein Zusammenhang mit einer anderen ATPase geschlossen. Die ATPase RavA, welche wie ClpA ebenfalls zur Familie der AAA+ ATPasen gehört, hat eine Chaperon-Funktion und hilft Proteinen bei der korrekten Faltung (Snider/Houry 2006). Zudem ist beschrieben, dass RavA dafür verantwortlich ist, die Bakterienzellen gegenüber Aminoglykosiden zu sensibilisieren. Ausschlaggebend ist dafür speziell die ATPase Aktivität. Dies wurde mit einer Mutation im Walker-A Motiv, mit der auch die Aktivität der ATPase ClpX nachgewiesen wurde (Wojtyra et al. 2003), in Bezug auf Kanamycin gezeigt (Wong et al. 2014). Hingegen zeigen *ravA*-Mutanten eine erhöhte Resistenz gegenüber Gentamicin (El Khoury et al. 2022; Felix et al. 2022). Diese Erkenntnisse sind entgegengesetzt zu den Ergebnissen in dieser Arbeit, da eine Mutation in der ATPase ClpA nicht mit einer Aminoglykosid-Resistenz einhergeht, sondern dadurch die Bakterienzelle sensibilisiert wird. Jedoch hat die ATPase RavA auch eine andere Funktion als die ATPase ClpA. Wohingegen RavA für die richtige Faltung der Proteine sorgt, vermittelt ClpA im Komplex mit ClpP den Abbau defekter bzw. *nonsense*-Proteine. Diese eher konträre Funktion lässt beide Zusammenhänge gegenüber der Aminoglykosid-Resistenz plausibel erscheinen. Bei anderen Spezies hingegen wird ebenfalls ein Zusammenhang der ATPase ClpA mit der Aminoglykosid-Resistenz beschrieben, und zwar bei *Stenotrophomonas maltophilia* (Huang et al. 2018). Bei *S. maltophilia* handelt es sich um ein gramnegatives Bakterium, welches eine intrinsische Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika besitzt und vermehrt nosokomiale Infektionen hervorruft (Palleroni/Bradbury 1993; Sánchez 2015). Von einem klinischen Isolat wurde eine ClpA-Deletionsmutante erstellt und die minimale Hemmkonzentration für verschiedene Aminoglykosid-Antibiotika bestimmt, jeweils im Vergleich mit dem ursprünglichen klinischen Isolat und der Mutante, welche zusätzlich wieder in *clpA* komplementiert wurde. Dabei konnte deutlich eine Abnahme in der MHK für die Deletionsmutanten gezeigt werden, wohingegen die Komplementation für *clpA* nur einen leichten Anstieg in den MHK-Werten hervorbrachte. Des Weiteren wurde ClpA als potenzielles adjuvantes Target genannt; ein Knockout der ATPase ClpA könnte die Behandlung mit Aminoglykosid-Antibiotika begünstigen (Huang et al. 2018). Diese Ergebnisse bei *Stenotrophomonas maltophilia* spiegeln diejenigen, die in dieser Arbeit für *Escherichia coli* erzeugt wurden, wider. Auch bei *Pseudomonas aeruginosa* wurde bereits der Effekt, dass es einen Zusammenhang zwischen der Funktionalität der Proteasen und der Wirkung der Aminoglykoside gibt, beschrieben. Die Proteasen schützen die Bakterienzellen vor mistranslatierten Proteinen. Mutationen in den Proteasen verstärken im Umkehrschluss die Aminoglykosid-Sensitivität. Somit könnten Arzneistoffe, die die Proteasen als ihren Angriffspunkt haben, in der Klinik eingesetzt werden, um die Effizienz der Aminoglykoside, z.B. bei der Behandlung einiger ESKAPE-Erreger, zu steigern (Hinz et al. 2011).

Bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für verschiedene weitere Antibiotika in Bezug auf die CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 zeigte sich kein Unterschied in den MHK-Daten im Vergleich zu *E. coli* WT (GK 571). Hierbei wurde ausschließlich die *clpA*-Mutation betrachtet ohne das Zusammenspiel weiterer Mutationen, wie zum Beispiel Fluorchinolon-*target*-Mutationen in den Genen *gyrA* bzw. *parC* oder Mutationen, die den Efflux der Zelle verändern, z. B. im Gen *marR*, im Hintergrund. Dabei wurde deutlich, dass die *clpA*-Mutation allein keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit dieser Antibiotika hat (vgl. Tabelle 5.4–2).

6.4 Auswirkungen der *clpA*-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System

Die Auswirkungen der *clpA*-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System wurden an zwei methodisch unterschiedlichen Experimenten gezeigt. Zum einen wurde von verschiedenen Stämmen das Wachstumsverhalten untersucht (vgl. Kapitel 5.5) und zum anderen wurden für diese Bakterienstämme Expressionsanalysen durchgeführt (vgl. Kapitel 5.6).

Für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens wurden der Bakterienstamm *E. coli* WT und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 miteinander verglichen und dabei mit unterschiedlichen Antibiotika induziert. Das Antibiotikum Nalidixinsäure als Hemmstoff der DNA-Replikation wurde bereits im Zusammenhang mit dem MazEF Antitoxin-Toxin System beschrieben, jedoch wurden für die Induktion sehr voneinander abweichende Konzentrationen verwendet. Es wurden wenige Mikrogramm pro Milliliter (10 µg/mL) (Erental et al. 2014) bis hin zu mehreren Milligramm pro Milliliter (1–5 mg/mL) (Hazan/Sat/Engelberg-Kulka 2004) eingesetzt. Nach voran gegangenen Experimenten zur Etablierung der Methode wurden in dieser Arbeit 30 µg/mL Nalidixinsäure genutzt, das für beide Stämme einer Konzentration 10xMHK entsprach. Dabei ist ein Unterschied in dem Wachstumsverhalten des Stammes *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 im induzierten Zustand deutlich zu erkennen (vgl. Abbildung 5.5–1). Nach einem definierten Zeitpunkt von acht Stunden nach der Induktion durch Nalidixinsäure ist der Unterschied in der Überlebensrate der beiden Stämme zudem signifikant nachweisbar (vgl. Abbildung 5.5–2). In der Literatur wird gezeigt, dass $\Delta mazEF$ -Mutanten eine höhere prozentuale Überlebensrate nach der Behandlung mit Nalidixinsäure aufweisen als der zugehörige Wildtypstamm (Hazan/Sat/Engelberg-Kulka 2004). Begründet wird diese Beobachtung damit, dass bekannt ist, dass ein Thyminmangel DNA-Schäden verursachen kann (Ahmad/Kirk/Eisenstark 1998) und dass darüber der MazEF induzierte Zelltod ausgelöst werden kann (Sat/Reches/Engelberg-Kulka 2003). Somit können auch andere Substanzen, die DNA-Schäden verursachen, den MazEF induzierten Zelltod induzieren bzw. andersherum ist das MazEF Antitoxin-Toxin System am Absterbeprozess der Bakterien, der durch DNA-Schäden ausgelöst wurde, beteiligt

(Hazan/Sat/Engelberg-Kulka 2004). Bei den Bakterienstämmen mit der in dieser Arbeit untersuchten *clpA*-Mutation kommt es zu einem ähnlichen Phänomen wie bei den $\Delta mazEF$ -Mutanten. Beide zeigen eine erhöhte Überlebensrate nach der Induktion mit Nalidixinsäure. Aufgrund der *clpA*-Mutation und dem daraus resultierenden Ausbleiben der ClpAP-Komplexbildung wird das labile Antitoxin MazE nicht mehr abgebaut. In der Zelle liegt demnach genügend Antitoxin vor um das Toxin MazF zu antagonisieren. Das Gleichgewicht aus Antitoxin und Toxin wurde demnach in der Bakterienzelle verschoben und die *clpA*-Mutation sorgt somit im Zusammenhang mit dem MazEF Antitoxin-Toxin System für ein verbessertes Überleben nach der Antibiotikazugabe (vgl. zusammenfassende Abbildung 6.4–1). Auch für die beiden Antibiotika Rifampicin als Hemmstoff der Transkription und Spectinomycin als Translationshemmer wurde der Einfluss auf die MazEF vermittelte Letalität bereits beschrieben (Sat et al. 2001). In dieser Arbeit wurde die gleiche Konzentration für die Behandlung des Stammes *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 mit Rifampicin gewählt wie von der Arbeitsgruppe von Engelberg-Kulka (25 µg/mL) (Sat et al. 2001). Diese hatten jedoch ihren Wildtypstamm mit einer $\Delta mazEF$ -Mutante und einer $\Delta clpP$ -Mutante verglichen und dabei einen Unterschied in der Überlebensrate der Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp nach der Behandlung mit Rifampicin aufzeigen können. Begründet wurde dieser Zusammenhang darüber, dass die normalerweise kontinuierlich ablaufende Expression des labilen Antitoxins MazE durch das Antibiotikum Rifampicin vermindert wird. Das stabilere Toxin MazF sorgte für den Zelltod des Wildtyps. In einem Western Blot war gezeigt worden, dass sich die MazE-Menge nach der Antibiotikagabe deutlich reduzierte (Sat et al. 2001). In dieser Arbeit konnte ein ähnliches Wachstumsverhalten gezeigt werden (vgl. Kapitel 5.5.2). Der Stamm *E. coli* WT und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 zeigten im induzierten Zustand (ca. 3xMHK Rifampicin) einen deutlich voneinander abweichenden Wachstumsverlauf (vgl. Abbildung 5.5–3). Auch zu einem definierten Zeitpunkt nach acht Stunden nach der Rifampicinbehandlung unterscheidet sich die Überlebensrate der beiden Stämme deutlich voneinander (vgl. Abbildung 5.5–4). Dadurch konnte als Ergänzung zu den Literaturdaten (Sat et al. 2001) deutlich der Einfluss der ATPase ClpA herausgestellt werden, da sich ein abweichendes Wachstumsverhalten zeigte, obwohl die Protease ClpP vollständig intakt war. Allein der Komplex aus der ATPase ClpA und der Protease ClpP ist für den Abbau des Antitoxins MazE verantwortlich bzw. im Umkehrschluss sorgt die in dieser Arbeit untersuchte *clpA*-Mutation für ein verbessertes Überleben der Bakterien nach der Rifampicinbehandlung. Vergleichbar kann auch die Behandlung mit dem Translationshemmer Spectinomycin betrachtet werden. Auch für dieses Antibiotikum war bereits gezeigt worden, dass eine $\Delta mazEF$ -Mutante und eine $\Delta clpP$ -Mutante im Vergleich mit dem isogenen Wildtypstamm unter der Spectinomycinbehandlung ein verbessertes Überleben zeigten und außerdem die Proteinmenge des Antitoxins MazE reduziert war (Sat et al. 2001). Zurückgeführt wurde dieses Ergebnis auf die reduzierte Translation des Antitoxins MazE durch das Antibiotikum Spectinomycin, sodass das stabilere

Diskussion

Toxin MazF überwog. Der Stamm *E. coli* WT und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 wurden ebenfalls mit der Spectinomycinkonzentration (200 µg/mL), wie beschrieben (Sat et al. 2001), behandelt (vgl. Kapitel 5.5.3). Auch der Wachstumsverlauf dieser beiden Stämme war unter der Spectinomycinbehandlung (ca. 30xMHK) unterschiedlich (vgl. Abbildung 5.5–5). Nach einem definierten Zeitpunkt von acht Stunden nach der Zugabe von Spectinomycin konnte eine signifikant unterschiedliche Überlebensrate der beiden Stämme gezeigt werden (vgl. Abbildung 5.5–6). Demnach konnte auch unter der Verwendung des Antibiotikums Spectinomycin der besondere Einfluss der ATPase ClpA auf das MazEF Antitoxin-Toxin System und somit auf das Überleben der Stämme unter Antibiotikaeinfluss gezeigt werden.

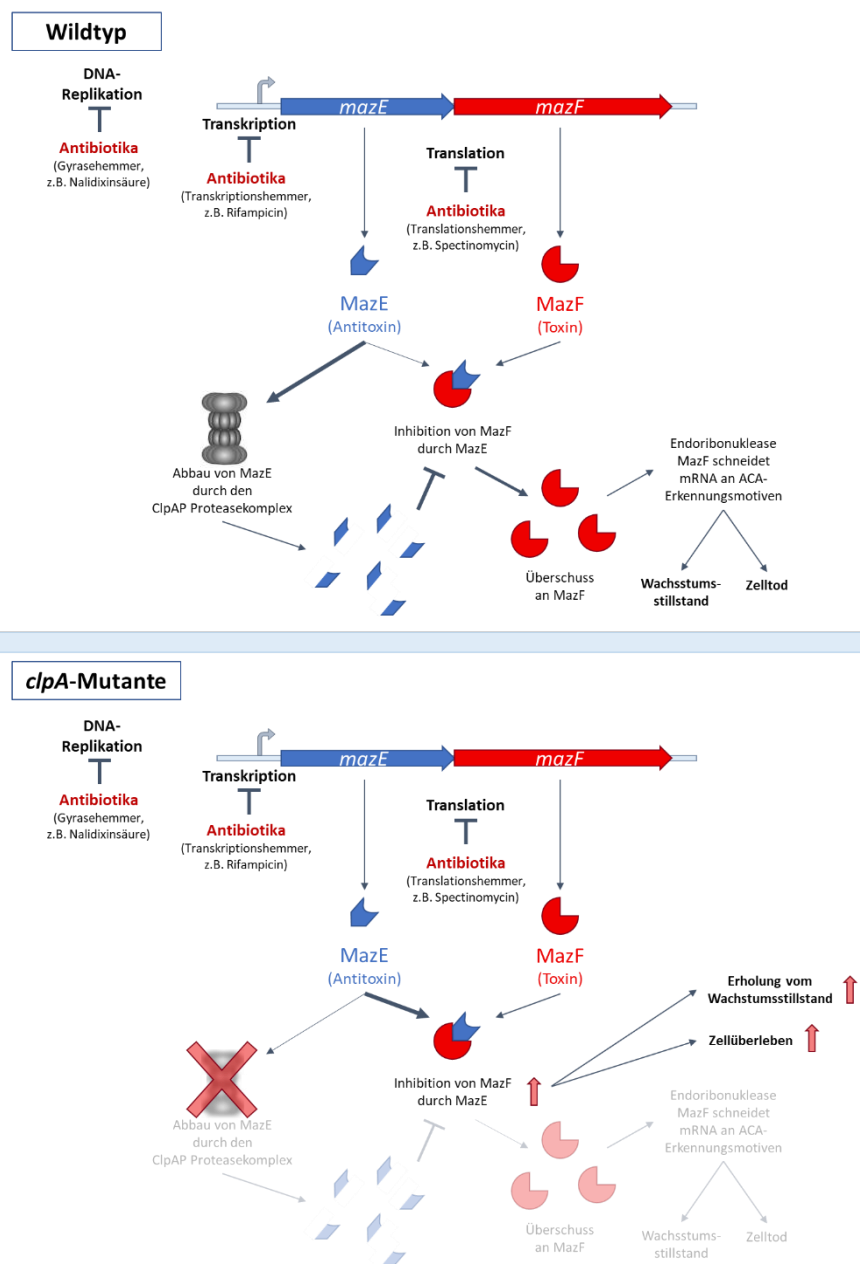


Abbildung 6.4–1: Schematische Darstellung der Wirkung des MazEF Antitoxin-Toxin Systems im Zusammenhang mit dem Proteasekomplex ClpAP und unter Einwirkung verschiedener Antibiotikaklassen (modifiziert und ergänzt nach: Engelberg-Kulka/Hazan/Amitai 2005; Engelberg-Kulka et al. 2004; Illigmann et al. 2021; Lee/Lee 2016)

Unter den für die Bakterienzelle ungünstigen oder stressigen Bedingungen, wie z. B. unter einer Antibiotikabehandlung, ist der Proteasekomplex ClpAP dazu in der Lage das labile Antitoxin MazE (blaues Symbol) abzubauen. Somit kann dieses nicht mehr in ausreichender Menge das Toxin MazF (rotes Symbol) inhibieren. Das stabilere Toxin liegt daher in einem Überschuss vor und kann durch seine Endoribonukleasefunktion für einen Wachstumsstillstand der Bakterienzelle sorgen bzw. sie sogar zum Zelltod führen (obere Darstellung für den Wildtyp). In dem unteren Abschnitt der schematischen Darstellung ist der Spezialfall der *clpA*-Mutante für diesen Zusammenhang abgebildet. Durch den Ausfall der ClpAP Protease aufgrund der *clpA*-Mutation und der damit verbundenen fehlenden Komplexbildung kann auch unter der Antibiotikabehandlung das Antitoxin MazE nicht abgebaut werden. Es ist somit verstärkt in der Lage das Toxin MazF zu inhibieren. Die Bakterienzelle kann sich besser von dem ansonsten auftretenden Wachstumsstillstand erholen und das Zellüberleben kann damit gesteigert werden.

Zusammenfassend konnte unter der Behandlung des Stammes *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 mit den drei verschiedenen Antibiotika der Einfluss der *clpA*-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System herausgestellt werden. Sobald die Mutation vorliegt, steht mehr des labilen Antitoxins MazE zur Verfügung und die Stämme zeigen ein verbessertes Überleben unter der Antibiotikabehandlung. Der generelle Mechanismus des MazEF induzierten Zelltods bzw. die Wirkweise des Toxins MazF wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine Gruppe vertritt dabei die Position, dass durch das Toxin MazF, welches eine Endoribonuklease darstellt, die Proteinsynthese nur zu einem großen Teil inhibiert wird, gewisse Proteine jedoch noch spezifisch synthetisiert werden (Amitai et al. 2009). Ermöglicht werden soll diese Selektivität unter Stressbedingungen durch die Ausbildung von sogenannten Stress-Ribosomen (Vesper et al. 2011), die der Hauptbestandteil einer *stress translation machinery* (STM) sind (Moll/Engelberg-Kulka 2012). Die Endoribonuklease MazF besitzt als Erkennungssequenz ein ACA-Motiv (Zhang et al. 2003). Die 16S-rRNA der 30S-Untereinheit der 70S-Ribosomen besitzt eine solche ACA-Erkennungsstelle. Durch eine Spaltung dort durch MazF werden 43 Nukleotide am 3'-Ende der 16S-rRNA inklusive der Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz (aSD-Sequenz) entfernt und defiziente Ribosomen, die Stress-Ribosomen, entstehen. Des Weiteren werden einige mRNA-Transkripte durch MazF gespalten, die ein ACA-Motiv am bzw. direkt vor dem Translationsstart-Codon aufweisen. Die dadurch verkürzte, sogenannte *leaderless*, mRNA soll speziell von den defizienten Stress-Ribosomen selektiv translatiert werden können (Moll/Engelberg-Kulka 2012; Vesper et al. 2011). Die abgetrennten Bereiche der mRNA-Transkripte *upstream* des Translationsstart-Codons inklusive der Shine-Dalgarno-Sequenz binden an die 30S-Untereinheit der herkömmlichen Ribosomen und blockieren darüber die Translation der gewöhnlichen mRNAs (Vesper et al. 2011). Die *leaderless* mRNA kann wiederum auch von MazF geschnitten werden, wenn diese eine ACA-Erkennungssequenz aufweist. Dabei sollte jedoch unterschieden werden, ob diese Erkennungssequenz *in frame* vorliegt oder außerhalb des Leserahmens. Nur die *in frame* liegenden ACA-Stellen werden von MazF geschnitten und diejenigen *out-of-frame* sind dem Toxin gegenüber resistent. Begründet wird dieser Mechanismus darüber, dass MazF an das ribosomale Protein S1 der Stress-Ribosomen bindet und sich mit diesen zusammen bewegt. Die Translation und das Spalten der ACA-Stellen *in frame* läuft gekoppelt ab (Oron-Gottesman et al. 2016).

Die andere Hypothese zur Wirkweise des Toxins MazF verdeutlicht, dass eine Expression des Toxins zu einer generellen Inhibition der Proteinsynthese führt. Des Weiteren soll MazF die mRNA an jeglichen ACA-Erkennungssequenzen schneiden, auch unabhängig des Leserahmens (Mets et al. 2019). Zusätzlich wurde herausgestellt, dass auch Transkripte des MazF Regulons (Nigam et al. 2019; Sauert et al. 2016) durch die Endoribonuklease geschnitten wurden und diese dem Toxin gegenüber nicht resistent waren, auch wenn es sich um *out-of-frame* Erkennungsstellen handelte. Dementsprechend sei eine selektive Translation nicht als Toxinantwort gegeben, auch werden weder spezielle Ribosomen noch eine *leaderless* mRNA gebildet (Mets et al. 2019). Vielmehr hat das Toxin MazF generell einen Einfluss auf die Biogenese der Ribosomen (Culviner/Laub 2018). Da MazF an bestimmten Stellen in den meisten mRNAs schneiden kann, werden demnach auch die Transkripte von Genen ribosomaler Proteine gespalten. Es wurde gezeigt, dass in dem Gen *rplJ* und *upstream* dieses Gens MazF-Erkennungsstellen liegen und dass die *rplJ*-Expression abhängig von MazF ist (Culviner/Laub 2018). Das Gen *rplJ* codiert für das ribosomale Protein L10 der 50S-Untereinheit der 70S-Ribosomen und liegt im Operon mit dem Gen *rplL*, welches für das ribosomale Protein-Dimer L7/L12 codiert (Bachmann/Low/Taylor 1976; Lindahl et al. 1975). Ein Komplex aus den Proteinen L10 und L12 (Pettersson/Hardy/Liljas 1976) kann *upstream* von *rplJ* binden und für die Repression des Operons sorgen (Johnsen et al. 1982). Die RT-qPCR Analysen in dieser Arbeit zeigen, dass sich die Expression von *rplJ* in bestimmten Stämmen signifikant voneinander unterscheidet (vgl. Kapitel 5.6). So ist die relative Genexpression von *rplJ* bei der Mutante *E. coli* MIII im Vergleich zu *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 signifikant erhöht (vgl. Abbildung 5.6–2). Auch im Vergleich mit der Mutante *E. coli* MIVa zeigt sich für *E. coli* MIII eine erhöhte relative Genexpression für *rplJ* (vgl. Abbildung 5.6–3). Andersherum ausgedrückt bzw. veranschaulicht ist die relative Genexpression von den Mutanten *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa im Vergleich zum Wildtyp vermindert (vgl. Abbildung 5.6–1). Wie der Tabelle 5.6–2 zu entnehmen ist, sind die Unterschiede der relativen Genexpression für *rplJ* generell signifikant. Für das Gen *rplL* ist die Expression nur im Vergleich der Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 signifikant unterschiedlich (vgl. Abbildung 5.6–2). Auch bei *E. coli* MIVa zeigt sich diese Tendenz im Vergleich zu *E. coli* MIII, jedoch konnten die Unterschiede hier nicht so deutlich herausgestellt werden. Genomisch betrachtet liegt der Unterschied der beiden jeweils miteinander verglichenen Mutanten in der *clpA*-Mutation. Aufgrund dieser Mutation liegt mehr des ansonsten labilen Antitoxins MazE vor, da dieses nicht mehr von dem Proteasekomplex ClpAP abgebaut werden kann. Dementsprechend wird das Toxin MazF besser neutralisiert. Dieses kann wiederum weniger ribosomale Transkripte, beispielsweise von *rplJ* schneiden. In der Folge liegt mehr L10, dem Genprodukt von *rplJ*, vor, welches im Komplex mit L12 wiederum die Expression von *rplJ* reprimiert. Da bekannt ist, dass eine Abhängigkeit zwischen der *rplJ*-Expression und der Anwesenheit des Toxins MazF besteht (Culviner/Laub 2018), ist die in dieser Arbeit gezeigte verminderte

te *rplJ*-Expression, die sich jeweils signifikant äußert, sobald die *clpA*-Mutation vorliegt, demnach auf den Einfluss von ClpA auf das MazEF Antitoxin-Toxin System zurückzuführen.

Auffällig ist zudem die unterschiedliche relative Expression der Gene *rpoB* und *rpoC*, die sich bei der Mutante *E. coli* MIVa im Vergleich zu den anderen Mutanten jeweils deutlich erhöht zeigt (vgl. beispielsweise Abbildung 5.6–1). Auch im Vergleich zu der Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 stellt sich der Unterschied besonders hervor. Das Genom dieser beiden Mutanten sollte identisch sein (vgl. Tabelle 8.1–1), jedoch zeigt sich an dieser Stelle ein Anhaltspunkt, dass es sich genomisch um unterschiedliche Stämme handeln müsste. In einer durchgeführten Genomsequenzierung konnten Veränderungen bezüglich dieser beiden Bakteriengenome bestätigt werden (Heisig, A., Groth, P., persönliche Mitteilung) (vgl. Kapitel 10.4). Des Weiteren gilt es zu beachten, dass in dem *rplJ*-Operon *downstream* von *rplL* und *upstream* von *rpoB* ein weiterer Promotorbereich liegt: 5'-TAGTCA-15-TGTAAG-3' (Shimada et al. 2014, Table 3). Der Abstand zwischen den Bindestellen der RNA-Polymerase, der -10-Region und der -35-Region, im Promotorbereich liegt hier bei 15 bp. Dieser Promotorbereich konnte bei *E. coli* WT (GK 571), dem Bakterienstamm, der als Ausgangsstamm der in dieser Arbeit verwendeten fluorochinolonresistenten Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa zugrunde liegt, genauso bestätigt werden. Bei den meisten Genen von *E. coli* liegt dieser Abstand zwischen der -10-Region und der -35-Region bei 17 bp, was zu einer optimalen Transkription unter einem normalen negativen Superspiralisierungsgrad führt (Aoyama et al. 1983). Ein bekanntes Beispiel für eine verminderte Länge des Spacers ist das Gen *recA*. Hierbei sorgt ein verminderter negativer Superspiralisierungsgrad für eine verbesserte Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor von *recA*. Die Genexpression wird unter diesen Bedingungen verstärkt (Wang/Syvanen 1992) (vgl. Kapitel 6.6). Bei der Betrachtung der relativen Genexpression als Ergebnisse der RT-qPCR Analysen für die Gene *rpoB* und *rpoC* (vgl. Abbildung 5.6–1) und der Ergebnisse der Bestimmung des Superspiralisierungsgrades der Bakterienzellen *E. coli* WT, *E. coli* MIII, *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa (vgl. Abbildung 5.8–3) wird ein Zusammenhang deutlich. Im Vergleich zum Wildtyp weist *E. coli* MIII einen leicht verminderten negativen Superspiralisierungsgrad auf. Derjenige von *E. coli* MIVa ist zudem noch etwas niedriger. Unter der Annahme, dass der verkürzte Spacerbereich von 15 bp zwischen der -10-Region und der -35-Region im Promotorbereich (Shimada et al. 2014) die Genexpression unter einem verminderten negativen Superspiralisierungsgrad verstärkt (Wang/Syvanen 1992), spiegeln die Ergebnisse diesen Zusammenhang wider. Die Genexpression von *rpoB* und auch *rpoC* ist bei *E. coli* MIII leicht erhöht im Vergleich zum Wildtyp und bei *E. coli* MIVa ist der Unterschied zu *E. coli* WT signifikant. Die Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 weist einen im Vergleich zu *E. coli* MIII signifikant erhöhten negativen Superspiralisierungsgrad auf (vgl. Abbildung 5.8–3). In diesem Zustand kann die RNA-Polymerase deutlich schlechter an den Promotor von *rpoB* und *rpoC* binden, da dieser mit einem Spacer von 15 bp für die Expression bei vermindertem negativen Superspiralisie-

rungsgrad ausgelegt ist, und dadurch werden diese beiden Gene in dieser Mutante deutlich schlechter transkribiert. Die Ergebnisse der relativen Genexpression für *rpoB* und *rpoC* sind für die drei genannten Mutanten generell durchaus schlüssig, dennoch erklärt sich der Unterschied zwischen den beiden Mutanten *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa, die vermeintlich genomisch identisch sein sollten, nicht. Die Notwendigkeit der Durchführung einer Genomsequenzierung dieser Mutanten wurde ersichtlich. Im Anschluss konnten damit Veränderungen zwischen den beiden Mutanten im Genom bestätigt werden (Heisig, A., Groth, P., persönliche Mitteilung) (vgl. Kapitel 10.4).

Zur weiteren Bestätigung des Einflusses der *clpA*-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System wurde in dieser Arbeit in RT-qPCR Analysen neben dem *rplJ*-Operon zusätzlich ein weiteres Gen untersucht. Das Gen *upp*, welches für die Uracil Phosphoribosyltransferase codiert, wurde ebenfalls bereits im Zusammenhang mit der Endoribonuklease MazF und einem davon abhängigen Expressionsverhalten beschrieben (Culviner/Laub 2018, Figure 1E). Die Uracil Phosphoribosyltransferase katalysiert in einem Rückgewinnungsprozess (*salvage pathway*) die Synthese von UMP (Uridin-5'-monophosphat), welches als Vorläufer der Pyrimidin-Ribonukleotide gilt (Andersen/Smith/Mygind 1992). Auch in dem Gen *upp* liegen Erkennungsstellen für die Endoribonuklease MazF (Culviner/Laub 2018, Figure S1), sodass eine von dem Toxin MazF ausgelöste Spaltung des *upp* Transkriptes indirekt auch Auswirkungen auf die Ribosomen-Biogenese haben kann. In RT-qPCR Analysen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die relative Genexpression für *upp* signifikant unterscheidet, sobald die hier charakterisierte *clpA*-Mutation vorliegt. Im Wildtyp wird *upp* deutlich stärker exprimiert als bei der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12, bei dem ausschließlich die *clpA*-Mutation vorliegt (vgl. Abbildung 5.6–4). Die *clpA*-Mutation bewirkt, aufgrund der ausbleibenden Ausbildung des Proteasekomplexes ClpAP, über den verminderten Abbau des Antitoxins MazE, dass eine geringere Menge des Toxins MazF frei und aktiv vorliegt. Somit ist davon auszugehen, dass in diesen Mutanten weniger *upp* Transkripte gespalten werden. Die Genexpression kann runtergeregelt werden, da eine ausreichende Menge der *upp* Transkripte für die Translation vorliegt. Im Gegenzug ist die Genexpression bei den Wildtypstämmen ohne *clpA*-Mutation im Vergleich zu den Mutanten erhöht aufgrund des höheren Anteils an freiem aktiven Toxin MazF. Die *upp* Expression wurde bereits als negativ reguliert beschrieben (Tu/Turnbough 1997). Die Expression hängt von der Pyrimidin Verfügbarkeit ab. Sobald die Menge von Pyrimidin limitiert ist, kommt es zu einer erhöhten Expression von *upp*. Jedoch wird bei einer hohen Verfügbarkeit die Expression negativ reguliert und dadurch wird *upp* schwächer exprimiert. Die Endoribonuklease MazF scheidet die *upp* Transkripte und dementsprechend kann weniger UMP synthetisiert werden und auch weniger der Pyrimidin-Derivate entstehen. Als Rückkopplung wird die Expression von *upp* erhöht. Dies beschreibt den Ablauf bei einem Wildtypstamm.

Werden hingegen weniger der *upp* Transkripte geschnitten, kann aufgrund des höheren Vorhandenseins des Enzyms Uracil Phosphoribosyltransferase vermehrt der Pyrimidin *Salvage Pathway* von *Escherichia coli* ablaufen (Andersen/Smith/Mygind 1992) und darüber mehr Pyrimidin rückgewonnen werden. Dadurch sinkt die Expression von *upp*. Dieser Fall tritt bei denjenigen Stämmen mit der *clpA*-Mutation auf. Die Abbildung 5.6–4 spiegelt die Expression des Gens *upp* im Zusammenhang mit der *clpA*-Mutation wider. So konnte auch über das Expressionsverhalten des Gens *upp* der Einfluss der *clpA*-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System gezeigt werden.

6.5 Auswirkungen der *clpA*-Mutation im Zusammenhang mit ROS

Die Auswirkungen der *clpA*-Mutation im Zusammenhang mit reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: *reactive oxygen species* (ROS)) wurde bei den Bakterienstämmen anhand von spezifischen Expressionsanalysen näher untersucht (vgl. Kapitel 5.7). Diesen Untersuchungen zugrunde gelegt wurden die Thesen von Sen *et al.*, die auf der Menge an freiem Eisen in der Zelle beruhen. Zum einen sollte diese Menge so gering sein um vor DNA-Läsionen zu schützen, die durch Hydroxyl-Radikale aus der Fenton-Reaktion (Fenton 1894; Haber/Weiss 1934) verursacht werden. Andererseits bedarf es einer gewissen Menge an freiem Eisen, sodass oxidierte Eisen-Schwefel-Cluster wieder regeneriert werden können (Sen/Zhou/Imlay 2020). Der Bakterienzelle steht das Ferritin-ähnliche Protein Dps zur Verfügung, welches freies Eisen neutralisiert und damit das Ausmaß der Fenton-Reaktion vermindert (Zhao *et al.* 2002). Im Gegenzug stellen die Proteasen Clp(S)AP und ClpXP eine Art Puffer-System dar. Sie sind in der Lage Dps abzubauen, sodass genügend freies Eisen für die Regeneration der Eisen-Schwefel-Cluster zur Verfügung steht (Sen/Zhou/Imlay 2020). Aufgrund der *clpA*-Mutation wird in diesen Bakterienstämmen der Proteasekomplex ClpAP jedoch nicht ausgebildet (vgl. Kapitel 6.1). Dementsprechend wurde im Verhältnis weniger des Ferritin-ähnlichen Proteins Dps abgebaut, da hierfür ausschließlich die Protease ClpXP zur Verfügung stand. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Expression der verbliebenen ATPase ClpX dadurch nicht signifikant erhöhte. Dies galt sowohl für die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 in Bezug zu ihrem Ausgangsstamm *E. coli* WT, als auch für die beiden Mutanten *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa im Vergleich zu *E. coli* MIII (vgl. Abbildung 5.7–1). Dementsprechend ist die Regulation beider ATPasen unabhängig voneinander.

In den Bakterienzellen mit der *clpA*-Mutation, bei denen demnach weniger freies Eisen aufgrund des verringerten Dps-Abbaus vorlag, konnte die Verringerung der letalen DNA-Läsionen durch die verringerte Bildung der Hydroxyl-Radikale aus der Fenton-Reaktion als Vorteil gesehen werden. Allerdings konnten geschädigte Eisen-Schwefel-Cluster schlechter regeneriert werden und damit würde die Rate der Reaktivierung der Metalloenzyme sinken. Damit die Bakterienzellen mit der *clpA*-Mutation

diesen Nachteil ausgleichen bzw. diesem entgegenwirken können, ist es denkbar, dass eine Aufregulation einer Katalase bewirkt wird. Dadurch könnte mehr H_2O_2 eliminiert werden, das wiederum vor der verstärkten Oxidation von Eisen-Schwefel-Clustern schützt (Sen/Zhou/Imlay 2020). *Escherichia coli* weist zwei verschiedene Katalasen auf. Das Gen *katE* codiert für eine monofunktionale Katalase bzw. die Hydroperoxidase II, wohingegen das Gen *katG* für die Hydroperoxidase I, einer bifunktionalen Katalase mit zusätzlicher Peroxidasefunktion, codiert (Loewen/Switalla 1986). Die Hauptfunktion unter den Katalasen wird dabei der Hydroperoxidase I zugeschrieben (Loewen 1984). Sie kann durch H_2O_2 induziert werden und weist eine niedrigere Michaelis-Menten-Konstante K_m auf. Die Hydroperoxidase II besitzt hingegen eine hohe K_m für H_2O_2 (Sak/Eisenstark/Touati 1989). Außerdem gibt es bei *Escherichia coli* ein weiteres Enzym zum Abfangen von H_2O_2 , die Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase, welche durch die Gene *ahpC* und *ahpF* codiert wird. Die Untereinheit AhpF katalysiert beim Ausüben der enzymatischen Aktivität der Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase den Transfer eines Protons von $\text{NADH}+\text{H}^+$ zum NAD^+ an der Untereinheit AhpC (Dip et al. 2014). Dabei kann die Reduktase nur so schnell arbeiten, wie durch den Metabolismus NADH generiert wird. Dementsprechend arbeitet sie langsamer als die Katalasen, die keine Reduktionsäquivalente benötigen. Vor allem bei größeren Mengen an H_2O_2 verstärkt sich dieses Ungleichgewicht. Daher wird die Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase für die Elimination kleinerer Mengen von endogenen H_2O_2 eingesetzt. Die Katalasen werden entsprechend bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen zum vorherrschenden Enzym für das Abfangen von H_2O_2 (Seaver/Imlay 2001). Die in dieser Arbeit mittels quantitativer *real-time* PCR (RT-qPCR) durchgeführten Expressionsanalysen (vgl. Kapitel 5.7) zeigen, dass sich die Expression der Gene *katG* und *ahpF* bei den Bakterienstämmen mit *clpA*-Mutation im Vergleich zu den jeweiligen Referenzstämmen ohne diese Mutation nicht signifikant veränderte (vgl. Abbildung 5.7–3 bzw. Tabelle 5.7–1). Somit zeigten sowohl die Hydroperoxidase I als auch der Reduktase-Bestandteil der Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase keine von ClpA abhängige Regulation. Die durch *katE* codierte Katalase hingegen zeigte bei der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zu dem Wildtyp. Eine Signifikanz wurde dabei knapp nicht erreicht ($p = 0,06$). Die Mutante *E. coli* MIVa zeigte in Bezug auf *E. coli* MIII eine signifikant erhöhte Expression für *katE* ($p = 0,04$) (vgl. Abbildung 5.7–2). Erneut auffällig war hier die Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12. Obwohl diese genetisch der Mutante *E. coli* MIVa entsprechen sollte, war die Expression für *katE* deutlich niedriger, sogar unter dem Niveau von *E. coli* MIII (vgl. Abbildung 5.7–2). Die Genomsequenzierung bestätigte die sich festigende Vermutung, dass Unterschiede in den Genomen der beiden Mutanten vorliegen (Heisig, A., Groth, P., persönliche Mitteilung) (vgl. Kapitel 10.4). Auch die Expression von *ahpC* war in dieser Mutante, vergleichbar mit der von *katE*, auffallend in Bezug zu den Erwartungen und im Vergleich zu den Referenzstämmen. Bei der Betrachtung der *ahpC*-Expression allgemein wurde ersichtlich, dass diese sich sowohl für die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 im Vergleich zu *E. coli* WT als auch für die Mutante *E. coli* MIVa in

Bezug zu *E. coli* MIII als erhöht erwies (vgl. Abbildung 5.7–4). Eine Signifikanz war in beiden Varianten nicht gegeben. Diese leichte Erhöhung in *Escherichia coli* Stämmen mit einer defizienten ClpA-Einheit wurde in der stationären Wachstumsphase in der Literatur ähnlich beschrieben. In der stationären Wachstumsphase sinkt die AhpC Proteinmenge bei einem *E. coli* Wildtypstamm deutlich über die Zeit ab. In der verwandten ClpA-defizienten Mutante ist diese Proteinmenge zu Beginn der stationären Phase leicht erhöht und sinkt über die Zeit nicht so stark ab wie beim zugehörigen Wildtypstamm. Bei Mutanten mit einem Defizit in den Genen *clpP* bzw. *clpX* ist der Unterschied wesentlich deutlicher und auch signifikant nachweisbar. Somit zeigt sich eine Abhängigkeit zwischen der Protease ClpXP und der Proteinmenge von AhpC in der stationären Wachstumsphase und nicht mit dem Proteasekomplex ClpAP (Weichart et al. 2003). Generell konnte demnach auch für den Peroxidase-Bestandteil der Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase keine signifikante von ClpA abhängige Regulation gezeigt werden, sodass ausschließlich bei der durch *katE* codierten Katalase ein Zusammenhang mit der ATPase ClpA beschrieben werden konnte. Die Bakterienzellen können durch die Aufregulation der Expression der Katalase bzw. der Hydroperoxidase II durch das verstärkte Abfangen hoher H₂O₂-Mengen dem Nachteil, dass geschädigte Eisen-Schwefel-Cluster schlechter regeneriert werden und damit die Rate der Reaktivierung der Metalloenzyme sinkt, entgegenwirken, indem die Eisen-Schwefel-Cluster erst gar nicht so stark durch Oxidation geschädigt werden.

Des Weiteren wurde die Expression des Gens *dps* näher analysiert. Wie bereits erläutert, stellen die Proteasen Clp(S)AP und ClpXP eine Art Puffer-System dar, indem sie Dps abbauen (Sen/Zhou/Imlay 2020; Stephani/Weichart/Hengge 2003). Der Proteasekomplex ClpAP wird jedoch nicht ausgebildet, sobald die in dieser Arbeit beschriebene *clpA*-Mutation vorliegt (vgl. Kapitel 6.1). Durch den Ausfall der einen Protease kann in diesen Bakterienstämmen weniger Dps abgebaut werden, und dies ausschließlich über die Protease ClpXP. Demnach galt es zu überprüfen, ob dies einen Einfluss auf die Expression des Gens *dps* hat. Generell wird Dps (*DNA-binding protein from starved cells*) bei *Escherichia coli* in der stationären Wachstumsphase induziert (Almirón et al. 1992). Außerdem wird es durch oxidativen Stress verstärkt exprimiert (Lomovskaya/Kidwell/Matin 1994). In den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen unterscheiden sich die Expressionswerte für *dps* sowohl in dem Stamm *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 als auch in den Mutanten *E. coli* MIII, *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa untereinander nicht signifikant (vgl. Abbildung 5.7–5). Diese Expressionsanalysen wurden auch nicht in der stationären Wachstumsphase durchgeführt (vgl. Kapitel 8.2.3.1), somit waren diesbezüglich auch keine Unterschiede zu erwarten. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass die Expression bzw. die Proteinmenge von Dps zum einen von der Wachstumsphase und zum anderen auch von der Funktionalität der Proteasen abhängig ist. 70 Minuten nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase liegt ein signifikanter Anstieg der Dps-Menge im Vergleich zu der logarithmischen Wachstumsphase vor. In einer *clpA*-Mutante verhält

sich die Proteinmenge von Dps vergleichbar mit dem Wildtyp, während in einer *clpP*-Mutante bereits ein signifikant niedriger Anstieg in der Dps-Menge zu verzeichnen ist. In einer Übernachtskultur verdeutlichen sich die Unterschiede. Die Proteinmenge von Dps ist im Wildtyp weiterhin deutlich angestiegen; in der *clpP*-Mutante zeigt sich eine signifikant niedrigere Dps-Menge. Auch in der *clpA*-Mutante ist der Anstieg der Proteinmenge deutlich niedriger im Vergleich zum Wildtyp und ebenfalls signifikant, wenn auch nicht so stark wie bei der *clpP*-Mutante. Aufgrund einer hohen Standardabweichung zeigt sich für die dort ebenfalls untersuchte *clpX*-Mutante kein signifikant niedriger Anstieg in der Dps-Proteinmenge in der Übernachtskultur. Daher wurde darauf geschlossen, dass die Regulation von Dps in der stationären Wachstumsphase in erster Linie von der Protease ClpAP abhängig ist. Diese Protease wird für die vollständige Induktion des Proteins Dps benötigt (Weichart et al. 2003, v. a. Figure 4A). Diese Ergebnisse spiegeln in der Hinsicht auch die Ergebnisse dieser Arbeit wider, indem es in der logarithmischen Wachstumsphase und in der frühen stationären Phase keine Unterschiede in der Dps-Menge zwischen dem Wildtyp und seiner zugehörigen *clpA*-Mutante gibt (vgl. Abbildung 5.7–5). In der späten stationären Phase jedoch, bzw. unter oxidativem Stress, hat die Protease ClpAP bzw. ihr Ausfall Einfluss auf die vorhandene Dps-Menge (Weichart et al. 2003, Figure 4A). Diese signifikant niedrigere Dps-Menge in der *clpA*-Mutante kann nicht auf den veränderten Abbau zurückgeführt werden, da ansonsten ein Anstieg in der Menge zu erwarten wäre, sobald die *clpA*-Mutation für den Ausfall der Protease ClpAP und ein dadurch resultierendes Ausbleiben des Dps-Abbaus sorgt. Die Proteolyse von Dps wird in der logarithmischen Wachstumsphase als hauptverantwortlicher Mechanismus für das Halten eines konstanten Dps Niveaus gesehen, wobei der Protease ClpXP die direkte Beteiligung zugeschrieben wird. In der späten stationären Phase wird die Ursache der niedrigeren Dps-Menge in der *clpA*-Mutante in einer unterschiedlichen Synthese von Dps im Vergleich zum Wildtyp gesehen. Der Proteasekomplex ClpAP ist in dieser Wachstumsphase auf post-transkriptioneller Ebene für die Aufrechterhaltung der Dps-Synthese verantwortlich (Stephani/Weichart/Hengge 2003). Stephani *et al.* führen dabei zwei Hypothesen für die Regulation durch die Protease ClpAP an: Zum einen könnte ein Repressor der Translation als negativer Regulator ein Substrat für den Proteasekomplex ClpAP, und weniger für die Protease ClpXP, darstellen und zum anderen könnte eine RNase vorliegen, welche die mRNA von *dps* degradiert und gleichzeitig selbst über den Proteasekomplex von ClpAP abgebaut wird. Denkbar wäre hierbei ein Zusammenhang mit dem MazEF Antitoxin-Toxin System, welches durch einen Aminosäuremangel induziert werden kann (Aizenman/Engelberg-Kulka/Glaser 1996). Durch die vorliegende *clpA*-Mutation und dem damit verbundenen Ausbleiben der Komplexbildung von ClpAP wird das Antitoxin MazE vermindert abgebaut. Das Toxin MazF wird vermehrt antagonisiert und übt vermindert seine Funktion als Endoribonuklease aus (vgl. Kapitel 6.4). Dementsprechend wäre eine Kombination beider Hypothesen von Stephani *et al.* denkbar (Stephani/Weichart/Hengge 2003): Eine vorliegende RNase, hier die Endoribonuklease

MazF, ist nicht an der Degradation der mRNA von *dps* beteiligt, sondern an derjenigen der mRNA eines Repressors der Translation. Dieser negative Regulator würde in einer *clpA*-Mutante nach der Induktion des MazEF Antitoxin-Toxin Systems vermehrt vorliegen und zu einer verstärkten Repression der Dps-Synthese und damit zu einer verminderten Dps-Proteinmenge führen.

Abschließend wurde die Expression einiger Gene, die für Enzyme des Citratzyklus codieren, analysiert. Genauer betrachtet wurden dabei die Eisen-Schwefel-Cluster abhängigen Enzyme des Citratzyklus. Anhand der Thesen von Sen *et al.*, dass eine gewisse Menge an freiem Eisen vorliegen sollte, welches zur Regeneration oxidierter Eisen-Schwefel-Cluster nötig ist, die Proteasen Clp(S)AP und ClpXP jedoch einen Einfluss auf den Abbau von Dps nehmen (Sen/Zhou/Imlay 2020), sollte überprüft werden, ob sich durch eine *clpA*-Mutation und dem damit verbundenen geringeren Abbau von Dps sowie der Gegenregulation durch die verstärkte Expression von *katE* zum Abfangen von H₂O₂ die Expression der Gene der Eisen-Schwefel-Cluster abhängigen Enzyme des Citratzyklus davon nicht beeinflussen lässt. Dafür wurde die relative Genexpression des Gens *acnB* analysiert. Dieses codiert für die Aconitase B bzw. Dehydratase. Die Reaktion von Citrat zu Isocitrat wird dabei unter normalen Wachstumsbedingungen katalysiert. Bei oxidativem Stress oder unter Eisenmangel entfällt jedoch die katalytische Aktivität. Das katalytisch aktive Homodimer zerfällt in seine Monomere und diese resultierenden Apoproteine können spezifisch mRNA binden. Je nach Bindungsstelle wird dadurch entweder die Transkriptstabilität erhöht oder die Translation gehemmt. Das Monomer fungiert unter diesen Bedingungen als ein post-transkriptionaler Regulator (Tang et al. 2005). Unter normalen Wachstumsbedingungen wird die Expression von *acnB* in der frühen exponentiellen Phase gesteigert, wohingegen sie in der stationären Phase wieder zurückgeht. Hier wird das Gen *acnA*, welches für die Aconitase A bzw. Hydratase codiert, vermehrt exprimiert (Cunningham/Gruer/Guest 1997; Gruer/Bradbury/Guest 1997). Reprimiert wird *acnB* beispielsweise unter anaeroben Bedingungen, vermittelt über ArcA (Cunningham/Gruer/Guest 1997), einem Bestandteil (*response regulator*) des Zweikomponentensystems ArcAB, welches für die Änderungen der Genexpression im Zusammenhang mit Veränderungen des Atmungszustandes der Zelle verantwortlich ist (Lynch/Lin 1996; Park et al. 2013). Über den Transkriptionsfaktor CRP, dem cAMP *receptor protein*, werden viele Gene des Stoffwechsels, auch des Citratzyklus, reguliert (Saier Jr. 1998; Shimada et al. 2011b) und auch *acnB* wird darüber aktiviert (Cunningham/Gruer/Guest 1997; Kim et al. 2018). Die relative Genexpression wurde in dieser Arbeit unter normalen Wachstumsbedingungen bestimmt, bei denen weder ein Eisenmangel noch oxidativer Stress vorherrschte. Somit war, auch in den Stämmen mit der *clpA*-Mutation, keine veränderte Expression zu erwarten. Diese Erwartungen spiegeln sich auch in den Ergebnissen der Expressionsanalysen wider. Die Expression von *acnB* unterscheidet sich in dem Stamm *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 bzw. den Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 nicht signifikant voneinander (vgl. Abbildung 5.7–6). Jedoch

zeigte sich in den beiden Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa jeweils eine erhöhte Expression im Vergleich zu *E. coli* WT und auch untereinander waren die Unterschiede signifikant (vgl. Abbildung 5.7–6). Da der Anstieg in der relativen Genexpression für *acnB* bereits in der Mutante *E. coli* MIII zu verzeichnen war, konnte diese Veränderung nicht auf die *clpA*-Mutation zurückgeführt werden. Denkbar wäre, dass die Mutation 3682::CTG im Gen *rpoC*, welches für die β' -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase codiert, einen Einfluss auf die relative Genexpression von *acnB* nimmt. Diese Mutation beschreibt eine Insertion eines Nukleotidtripletts (CTG) an Position +3682 bp des Gens. Sie tritt erstmalig in der Mutante *E. coli* MIII auf und findet sich auch in der Mutante *E. coli* MIVa wieder. Die β' -Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase geht eine Bindung mit einem Sigmafaktor ein und bindet darüber an den DNA-Strang. Das entstandene promotorselektive Holoenzym ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) kann durch diese Bindung an der σ -Erkennungsstelle im Promotorbereich der Gene für die Initiation der Transkription dieser Gene sorgen (Gross et al. 1998; Luo et al. 1996). Des Weiteren ist bekannt, dass die Bindungsstellen für ArcA im selben Bereich wie die Erkennungsstellen für den Sigma-70-Faktor liegen können. Eine durch ArcA vermittelte Repression der Genexpression kann durch die Besetzung des Promotors ausgelöst werden (Park et al. 2013). Demnach wäre es denkbar, dass durch die Mutation in dem Gen *rpoC* die Bindung mit Sigma beeinflusst wird und es zu einer stärkeren Bindung des Holoenzym ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) an den Promotorbereich kommt. Die Konkurrenz um die Bindungsstelle könnte möglicherweise ArcA verdrängen, sodass das Gen, in diesem Fall *acnB*, nicht weiter reprimiert wird, sondern verstärkt exprimiert. So könnte der Anstieg der relativen Genexpression für das Gen *acnB* in den Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa erklärt werden (vgl. Abbildung 5.7–6).

Außerdem wurde neben *acnB* auch die relative Genexpression eines weiteren Gens der Eisen-Schwefel-Cluster abhängigen Enzyme des Citratzyklus analysiert: Das Gen *sdhC*. Es codiert für ein Membranprotein der aus insgesamt vier Untereinheiten bestehenden Succinat-Dehydrogenase. Im Citratzyklus wird von der Succinat-Dehydrogenase die Reaktion von Succinat zu Fumarat katalysiert. Die vier Untereinheiten des Enzyms werden durch ein Operon aus den vier Genen *sdhC*, *sdhD*, *sdhA* und *sdhB* codiert. Sie werden über einen Promotor *upstream* von *sdhC* reguliert (Park/Tseng/Gunsalus 1995). Das Gen *sdhC* ist dabei das erste Gen der Transkriptionseinheit und wurde daher für die Analysen der relativen Genexpression in dieser Arbeit genutzt. Wohingegen das *downstream* im Operon an letzter Position liegende Gen *sdhB* für eine der zwei katalytischen Untereinheiten der Succinat-Dehydrogenase codiert und als prosthetische Gruppe drei Eisen-Schwefel-Cluster beinhaltet (Darlison/Guest 1984). Die Ergebnisse in den Genexpressionsanalysen zeigten für das Gen *sdhC* ähnliche Verhältnisse zwischen den untersuchten Bakterienstämmen, wie es bereits für das Gen *acnB* gezeigt wurde. Zwischen dem Stamm *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 bzw. den Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 unterschied sich

die relative Genexpression nicht signifikant voneinander. Dagegen war auch hier in den Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa jeweils eine erhöhte Expression für *sdhC* im Vergleich zum Wildtypstamm zu verzeichnen (vgl. Abbildung 5.7–6). Da bereits in der Mutante *E. coli* MIII die relative Genexpression für *sdhC* im Vergleich zu *E. coli* WT erhöht war, konnte, vergleichbar mit dem Gen *acnB*, als Auslöser nicht die *clpA*-Mutation zugrunde gelegt werden. Ähnlich wie *acnB* wird auch *sdhC* über ArcA reguliert. Zusätzlich jedoch auch über den Transkriptionsfaktor FNR (*fumarate and nitrate reductase regulation* Protein), welcher als Regulator für den Wechsel von aerobem zu anaerobem Stoffwechsel gilt und unter der Abwesenheit von Sauerstoff in seinen aktiven Zustand wechselt (Uden/Schirawski 1997). Das *sdh*-Operon wird unter anaeroben Bedingungen durch FNR reprimiert (Park/Tseng/Gunsalus 1995). Über ArcA wird *sdhC* auch hauptsächlich im anaeroben Zustand reprimiert. Doch zu einem geringeren Ausmaß auch unter aeroben Bedingungen (Iuchi/Lin 1988; Park/Tseng/Gunsalus 1995; Shen/Gunsalus 1997). Die DNA-abhängige RNA-Polymerase kann an den Promotorbereich des *sdh*-Operons binden und für die Expression dieser Gene sorgen. Zu einem kleinen Teil kann jedoch ArcA die Expression auch unter aeroben Bedingungen hemmen (Shen/Gunsalus 1997, Fig. 7). Vergleichbar wie bereits für die relative Expression für *acnB* beschrieben, könnte die Mutation in dem Gen *rpoC*, welche ab der Selektionsmutante *E. coli* MIII auftritt, für die signifikanten Unterschiede in der Genexpression für *sdhC* in diesen Mutanten verantwortlich sein. Denkbar wäre eine stärkere Bindung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase, die damit auch das restliche ArcA von seiner Bindungsstelle verdrängt und damit für eine erhöhte Expression von *sdhC* sorgt. Da diese Repression von ArcA unter aeroben Bedingungen nur einen kleinen Anteil ausmacht, könnten auch andere bzw. weitere Aspekte Auswirkungen auf des Expressionsgeschehen von *sdhC* nehmen. Vergleichbar wie in Kapitel 6.4 für die Gene *rpoB* und *rpoC* wurde der Promotorbereich des *sdh*-Operons näher betrachtet. Bereits beschrieben wurde, dass es für das Operon nur einen Promotor ca. 250 bp *upstream* des Translationsstartpunktes von SdhC gibt (Park/Tseng/Gunsalus 1995). Dieser sieht folgendermaßen aus: 5'-TTGTAA-17-TATACT-3' (Shimada et al. 2014, Table 1). Dieser Promotorbereich konnte, für den in dieser Arbeit zugrunde gelegten *E. coli* WT, anhand der Sequenz ebenfalls identisch ermittelt werden. Die Bindestellen der RNA-Polymerase, die -10-Region und die -35-Region, weisen hier einen Abstand von 17 bp auf. Dabei handelt es sich um die gewöhnliche Länge des Spacers, welche bei den meisten Genen von *E. coli* auftritt und für eine optimale Transkription unter einem normalen negativen Superspiralisierungsgrad sorgt (Aoyama et al. 1983). Werden die Ergebnisse der Bestimmung des Superspiralisierungsgrades der Bakterienzellen *E. coli* WT, *E. coli* MIII, *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa (vgl. Abbildung 5.8–3) hinzugezogen, so wird deutlich, dass dieser Superspiralisierungsgrad bei den Mutanten von dem normalen negativen Superspiralisierungsgrad von *E. coli* WT abweicht. Dieser verminderte negative Superspiralisierungsgrad führt dazu, dass die RNA-Polymerase deutlich schlechter an die 10-Region und die -35-Region binden kann

(Wang/Syvanen 1992). Die Expression des *sdh*-Operons beispielsweise würde vermindert sein. Bei der Betrachtung der Ergebnisse der relativen Genexpression für *sdhC* wird dagegen deutlich, dass die beiden Bakterienstämme mit dem verminderten negativen Superspiralisierungsgrad eine erhöhte anstelle einer verminderten Expression zeigen (vgl. Abbildung 5.7–6). Dementsprechend ist zusätzlich ein weiterer Aspekt zu beachten und zwar weist der Promotorbereich des *sdh*-Operons, bzw. genauer der Spacer, außerdem eine Bindungsstelle für H-NS auf (Shimada et al. 2014, Table 1). Bei H-NS handelt es sich um ein hitzestabiles DNA-bindendes Regulatorprotein (*heat-stable nucleoid-structuring* bzw. *histone-like nucleoid-structuring*) (Dorman 2004; Falconi et al. 1988). Es bevorzugt die Bindung an A/T-reiche Sequenzbereiche, welche sequenzbedingt eine Krümmung der DNA hervorrufen (Dame/Wyman/Goosen 2001). Dadurch ist H-NS in der Lage die Transkription der Gene, welche einen gekrümmten Promotorbereich aufweisen, zu hemmen (Zhang et al. 1996). Im Umkehrschluss ist eine Aufhebung der Repression durch H-NS durch Veränderungen in der DNA-Struktur beispielsweise durch Veränderungen in der DNA-Topologie denkbar. Als bekanntes Beispiel, bei dem das Supercoiling der DNA einen Effekt auf die Promotoraktivität und die Bindung von H-NS ausübt, kann das *bgl*-Operon angebracht werden. Das *bgl*-Operon von *Escherichia coli* codiert für Gene, deren Produkte für die Aufnahme und Verwertung von Aryl- β -D-Glykosiden benötigt werden (Schnetz/Rak 1988). Normalerweise wird das *bgl*-Operon durch die Bindung von H-NS reprimiert. Die Repression kann allerdings über einen veränderten Superspiralisierungsgrad beeinflusst werden. Bei negativ superspiralisierter DNA stellt H-NS jedoch einen entscheidenden Faktor für die Repression des *bgl*-Operons dar (Schnetz/Wang 1996). Des Weiteren wurde zusätzlich ein weiterer Faktor für die Repression ermittelt. Durch die Inhibition der ATPase-Aktivität der Gyrase, codiert durch *gyrB*, mit dem Aminocumarin-Antibiotikum Novobiocin (Staudenbauer/Orr 1981) kann in resultierenden *gyr*-Mutanten die Transkription des *bgl*-Operons aktiviert werden. Der Promotorbereich des *bgl*-Operons weist einen Bereich von wiederkehrenden, jedoch gespiegelten Motiven auf, sogenannten *inverted repeats*. Diese beiden Motive sind dazu in der Lage bei einem vorliegenden negativen Superspiralisierungsgrad eine kreuzförmige Sekundärstruktur der DNA zu bilden. Die als *cruciform* bezeichnete DNA-Struktur kann ebenfalls die Repression des *bgl*-Operons mit sich bringen, da die RNA-Polymerase sich nicht entsprechend anlagern kann. Durch einen verminderten negativen Superspiralisierungsgrad, ausgelöst durch die Veränderungen in der Gyrase dieser Stämme, kann die *cruciform* destabilisiert werden und das *bgl*-Operon durch Aufhebung der Repression exprimiert werden (Mukerji/Mahadevan 1997). Dadurch dass in Bakterienzellen mit einem negativen Superspiralisierungsgrad H-NS einen entscheidenden Faktor auf die Repression einiger Gene nehmen kann, ist es denkbar, dass die Expression von *sdhC* in den Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa in dieser Arbeit (vgl. Abbildung 5.7–6) aufgrund ihres verminderten negativen Superspiralisierungsgrades (vgl. Abbildung 5.8–3) erhöht ist, da die Repression über die im Promotorbereich von *sdhC* befindliche H-NS

Bindungsstelle (Shimada et al. 2014, Table 1) aufgehoben bzw. vermindert wird. Außerdem könnte die DNA-Struktur des Promotors des *sdh*-Operons bei abweichendem negativen Superspiralisierungsgrad, vergleichbar mit der *cruciform* des Promotorbereiches des *bgl*-Operons, einen Einfluss auf die Expression nehmen. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass die über H-NS vermittelte Repression des *bgl*-Operons durch LeuO aufgehoben werden kann (Ueguchi et al. 1998). Bei LeuO handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor aus der Familie der LysR-Regulatorproteine (Henikoff et al. 1988). Eine Überexpression des Gens *leuO* führt zu Derepression des *bgl*-Operons. Zuerst wurde angenommen, dass die durch H-NS bewirkte Repression unabhängig von H-NS aufgehoben wird (Madhusudan et al. 2005; Ueguchi et al. 1998). Später wurde jedoch ein Zusammenhang beschrieben. LeuO antagonisiert dabei die durch H-NS vermittelte Repression (Shimada et al. 2011a). Zusätzlich wird das Gen *leuO* jedoch auch durch H-NS reprimiert (Chen et al. 2005). Bezogen auf die Daten der Analyse zur relativen Genexpression des Gens *sdhC* in dieser Arbeit (vgl. Abbildung 5.7–6), könnte die durch H-NS vermittelte Repression des *sdh*-Operons zum einen durch den verminderten negativen Superspiralisierungsgrad (vgl. Abbildung 5.8–3) und der damit einhergehenden verminderten Repression durch H-NS zu einem Anstieg der Genexpression von *sdhC* in den beiden Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa führen. Der Transkriptionsfaktor LeuO könnte dadurch vereinfacht die reprimierten Gene aktivieren, da der Repressor H-NS unter diesen Umständen nur verminderte Wirkung zeigt. Zum anderen wäre eine verstärkte Expression des Gens *leuO* und eine damit einhergehende verstärkte Aktivierung H-NS reprimierter Gene, hier des *sdh*-Operons, durch die gesteigerte Antagonisierung durch LeuO denkbar. Bislang unveröffentlichte Daten aus der Transkriptomanalyse zeigen für die beiden Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa untereinander eine verstärkte Expression von *leuO* für *E. coli* MIVa ($\log_2 \text{FC} = 3,7$) (Heisig, A., Groth, P., persönliche Mitteilung). Möglicherweise wird *leuO* stärker reprimiert, um der Repression, beispielsweise des *sdh*-Operons, durch H-NS entgegenzuwirken oder weil *leuO* selbst weniger durch H-NS aufgrund des veränderten Superspiralisierungsgrades in diesen Stämmen reprimiert wird. Jedenfalls spiegelt die nochmals erhöhte Expression von *leuO* bei *E. coli* MIVa die Ergebnisse der relativen Genexpression von *sdhC* in dieser Arbeit wider. Die generelle Erhöhung der Expression von *sdhC* in den beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abbildung 5.7–6) könnte durch den Zusammenhang mit dem verminderten negativen Superspiralisierungsgrades und der dadurch veränderten Wirkung des Repressors H-NS begründet werden.

Wie oben bereits beschrieben, kann an dieser Stelle bei der Betrachtung des abweichenden Expressionsverhaltens der Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 erneut die Notwendigkeit der Durchführung einer Genomsequenzierung dieser Mutante betont werden und auf das Kapitel 10.4 im Anhang verwiesen werden, bei dem Abweichungen in der Sequenz des Genoms aufgezeigt werden konnten (Heisig, A., Groth, P., persönliche Mitteilung).

Generell konnte durch die Analyse der relativen Genexpression in diesem Kapitel gezeigt werden, dass die *clpA*-Mutation, die in dieser Arbeit näher charakterisiert wurde, im Zusammenhang mit ROS stehen kann. Zusammenfassend wurde das Gen *katE*, welches für eine monofunktionale Katalase bzw. die Hydroperoxidase II codiert, in der für diese Arbeit konstruierten Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 verstärkt exprimiert (vgl. Abbildung 5.7–2 (links)). Die Zellen können durch die Aufregulation dieser Katalase durch das verstärkte Abfangen hoher H₂O₂-Mengen dem Nachteil, der durch die *clpA*-Mutation, dem dadurch bedingten verminderten Dps-Abbau und der damit geringeren Menge an freiem Eisen, welches für die Regeneration der oxidierten Eisen-Schwefel-Cluster zur Verfügung steht, entgegenwirken. Vorteilhaft an weniger freiem Eisen ist die verringerte Rate an DNA-Läsionen, jedoch sinkt gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit, dass oxidierte Eisen-Schwefel-Cluster zur Reaktivierung der Metalloenzyme wieder mit Eisen ergänzt werden (Sen/Zhou/Imlay 2020). Diesem Nachteil konnte die Bakterienzelle jedoch durch die Aufregulation der Katalase entgegenwirken, sodass der Vorteil der Zelle überwog und diese besser unter der Anwesenheit von ROS existieren konnte, da die Eisen-Schwefel-Cluster erst gar nicht so stark durch Oxidation geschädigt werden. Die anderen Proteasen, Katalasen und Eisen-Schwefel-Cluster abhängigen Enzyme des Citratzyklus waren von den Veränderungen im Expressionsverhalten nicht betroffen. Da diese *clpA*-Mutation unter der Behandlung mit Fluorchinolonen in einem Selektionsexperiment selektiert wurde (Heisig/Tschorny 1994), kann des Weiteren der Bezug zwischen der generellen Antibiotikawirkung und der ergänzenden bzw. synergistischen Wirkung unter reaktiven Sauerstoffspezies hergestellt werden. Durch die Mutation hat sich die Bakterienzelle einen Überlebensvorteil sowohl in Gegenwart der Antibiotika (vgl. zusätzlich auch Kapitel 5.5) als auch unter der Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies verschafft. Somit wird deutlich, dass für die vollständige Wirkung der Antibiotika auch ROS eine entscheidende Rolle spielen. Dieser Aspekt wird bereits seit längerer Zeit auch in der Literatur diskutiert und bereits in Übersichtsartikeln zusammengefasst (Lam et al. 2020). Im Jahre 2007 beschrieb Michael A. Kohanski in der Arbeitsgruppe von James J. Collins, dass ROS am mikrobiellen Absterbeprozess nach der Behandlung mit Antibiotika beteiligt sind und zu der antimikrobiellen Wirkung beitragen (Kohanski et al. 2007). Erweitert wurde diese These durch Untersuchungen an Mutanten, die defizient in einer Superoxid-Dismutase ($\Delta sodA$; $\Delta sodB$), einer Katalase ($\Delta katG$; $\Delta katE$) oder Peroxidase ($\Delta ahpC$) sind und bei denen ausgewählte Antibiotika eine geringere Wirkung aufwiesen (Wang/Zhao 2009). Dementgegen wurden auch Veröffentlichungen herausgebracht, um die These von Michael A. Kohanski zu widerlegen. Als eine Herausforderin der These wurden Untersuchungen unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass der ROS-Fänger Thioharnstoff nicht nur unter aeroben, sondern auch unter anaeroben Bedingungen vor der antimikrobiellen Abtötung schützen kann. Außerdem wurde aufgezeigt, dass die Akkumulation von Hydroxyl-Radikalen ($\bullet OH$) nicht zwangsläufig mit der antimikrobiellen Abtötung korreliert (Keren et al. 2013).

Eine weitere bekannte Gegenposition beschreibt, dass nach einer Behandlung mit Antibiotika kein Anstieg der H_2O_2 -Produktion detektiert werden konnte, sodass demnach der Zelltod allein durch die Antibiotika, ohne dass es zur $\bullet\text{OH}$ -Radikalbildung kommt, also ohne der Beteiligung von ROS, bewirkt wird (Liu/Imlay 2013). Generell bestreitet James A. Imlay die schädigende Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies nicht, jedoch bringt er diese nicht in den Zusammenhang mit der Antibiotikawirkung auf die Bakterienzelle. Die reaktiven Sauerstoffspezies können verschiedenste Zellbestandteile angreifen: Nukleinsäuren, Proteine und Lipide (Imlay 2013). Die Bakterien haben sich jedoch entwickelt, um sich vor der schädigenden Wirkung der ROS zu schützen. Sie verfügen über Superoxid-Dismutasen (SODs), um das reaktive Superoxid-Anion (O_2^-) in Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umzuwandeln. Das H_2O_2 wird wiederum durch Katalasen und Peroxidasen umgewandelt, sodass endogen produzierte reaktive Sauerstoffspezies neutralisiert werden (Imlay 2008). Des Weiteren verfügen die Bakterien über die Möglichkeit, verschiedene sogenannte *stress response regulons* zu aktivieren. Hierbei spielen die Transkriptionsfaktoren OxyR und SoxR eine entscheidende Rolle (Imlay 2015). OxyR (*oxidative stress regulator*) aktiviert dabei die Transkription von einigen Genen, die im Zusammenhang mit der Reaktion auf erhöhte Wasserstoffperoxid-Level stehen, beispielsweise *katG*, *ahpCF* und *dps* (Zheng et al. 2001). Der Transkriptionsfaktor SoxR (*superoxide response protein*) erkennt den durch Superoxid-Anionen ausgelösten Stress und aktiviert die Transkription von *soxS*, welches für einen zweiten Faktor, der als Aktivator der Transkription einiger Gene zum Schutz vor O_2^- gilt, codiert. Dadurch werden beispielsweise erhöhte Mengen der Proteine Superoxid-Dismutase, Aconitase A und Fumarase C generiert (Blanchard et al. 2007; Imlay 2015; Tsaneva/Weiss 1990). Zur Widerlegung der Aussage von James A. Imlay, dass nach der Behandlung mit Antibiotika kein Anstieg in der zellulären H_2O_2 -Produktion zu verzeichnen ist (Liu/Imlay 2013), nutzte die Arbeitsgruppe um James J. Collins zum Nachweis eine Vielzahl fluoreszenzbasierter Reporterfarbstoffe, um verschiedene ROS nachweisen zu können. Sie konnten einen Anstieg in der H_2O_2 -Produktion bei den drei unterschiedlichen bakteriziden Antibiotika Ampicillin, Gentamicin und Norfloxacin ermitteln. Weiterhin zeigte die Arbeitsgruppe, dass unter strikten anaeroben Bedingungen diese drei bakteriziden Antibiotika nur eine abgeschwächte Abtötung der Bakterien vermittelten. Außerdem konnte die toxische Wirkung der Antibiotika durch Antioxidantien wie Glutathion oder Ascorbinsäure reduziert werden (Dwyer et al. 2014). Verfestigt wurde die ursprünglich von Michael A. Kohanski in der Arbeitsgruppe von James J. Collins beschriebene These im Jahr 2019 nochmals damit, dass bei *Escherichia coli* auch nach dem vollständigen Entfernen des antimikrobiellen Stressfaktors weiterhin ROS in der Zelle akkumuliert und auch der Zelltod darüber hinaus auftritt (Hong et al. 2019).

6.6 Auswirkungen der *clpA*-Mutation auf den Superspiralisierungsgrad der Bakterienzellen

Generell wird der Superspiralisierungsgrad der DNA der Bakterienzellen engmaschig kontrolliert und reguliert, damit der negative Superspiralisierungsgrad global gesehen konstant bleibt (DiNardo et al. 1982). Dies ist beispielsweise auch bei der Initiation der Transkription wichtig; auch dafür ist ein bestimmter negativer Superspiralisierungsgrad notwendig (Wang 1974). Zwei wichtige Enzyme, die an der Regulation des Superspiralisierungsgrades beteiligt sind, sind die Topoisomerase I, codiert durch *topA*, und die Gyrase, codiert durch *gyrA* und *gyrB* (Zechiedrich et al. 2000). Die Topoisomerase I relaxiert negative Superspiralisierung nach Bindung einzelsträngiger DNA (Massé/Drolet 1999), wohingegen die Gyrase negative Superspiralisierung unter ATP-Verbrauch einführt (Gellert et al. 1976). Damit handelt es sich bei den beiden Enzymen um die Gegenspieler der DNA-Superspiralisierung. Sie werden auch entgegengesetzt reguliert. Das Gen *gyrA* wird vermehrt transkribiert, sobald die DNA relaxiert vorliegt (Menzel/Gellert 1983), wohingegen eine verstärkte negative Superspiralisierung der DNA zu einer erhöhten Expression von *topA* führt (Tse-Dinh 1985). Eine Veränderung des negativen Superspiralisierungsgrades kann die Transkriptionsinitiation jedoch nicht nur negativ beeinflussen, sondern auch zu einer verstärkten Expression einiger Gene führen. Je nach dem Abstand zwischen der -10-Region und der -35-Region, den Bindestellen der RNA-Polymerase, im Promotorbereich der Gene, können die Gene abhängig vom Superspiralisierungsgrad unterschiedlich transkribiert werden (Wang/Syvanen 1992). Normalerweise beträgt dieser Abstand bei den meisten Genen in *E. coli* 17 bp. Dies führt zu einer optimalen Transkription unter einem normalen negativen Superspiralisierungsgrad (Aoyama et al. 1983). Bei vermindertem negativen Superspiralisierungsgrad ist die Expression dieser Gene jedoch reduziert (Pruss/Drlica 1989). Anders verhält sich die Expression des Gens *recA*. Hier beträgt die Länge des Spacers nur 16 bp. Ein verminderter negativer Superspiralisierungsgrad, der einer Relaxierung der DNA entspricht, verbessert die Bindung der RNA-Polymerase an den Promotor von *recA* und führt somit zu einer verstärkten Genexpression (Wang/Syvanen 1992). Generell sind jedoch keine großen Unterschiede im DNA-Superspiralisierungsgrad zu erwarten, da ansonsten die Transkription eingeschränkt wird bzw. nicht mehr ablaufen kann. Das in dieser Arbeit verwendete Reportergensystem ist jedoch in der Lage solche geringen Veränderungen *in-vivo* zu detektieren (Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013).

Werden die ermittelten Qsc-Werte des Stammes *E. coli* WT und der Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 betrachtet, ist ein sehr geringer Unterschied untereinander zu erkennen. Der Qsc-Wert ändert sich von 1,52 auf 1,41 bzw. sinkt prozentual gesehen auf 92,4 % bei der *clpA*-Mutante (vgl. Abbildung 5.8–2). Eine statistische Signifikanz dieser Unterschiede besteht jedoch nicht. Dies entspricht den Erwartungen, da weder in dem Gen *gyrA*, noch in dem Gen *topA* eine Mutation vorhanden ist, welche die Funktion der Genprodukte beeinflussen könnte oder die einen Einfluss auf

den globalen Superspiralisierungsgrad der DNA haben könnte. Es handelt sich hier zum einen um den *E. coli* Wildtypstamm, der vor der Isolation keinen Kontakt mit Fluorchinolonen hatte (Heisig/Tschorny 1994) und einer künstlich mit dem CRISPR/*Cas9*-System erzeugten Mutante, bei der im Vergleich zum Wildtyp nur eine Mutation in dem Gen *clpA* eingeführt wurde (vgl. Kapitel 5.3.1). Dementsprechend sind keine Mutationen in den Targetgenen der Fluorchinolone zu erwarten und auch kein abweichender Superspiralisierungsgrad. Auffällig ist jedoch die große Streuung der Messwerte, gezeigt durch die Fehlerbalken, welche die Standardabweichung wiedergeben, vor allem bei *E. coli* WT (vgl. Abbildung 5.8–2). Der Einsatz des Luciferase Reporter Assays ist weit verbreitet und wird vor allem bei der Untersuchung der Genexpression und der Analyse von Promotoraktivitäten verwendet. Auch für schwache Promotoren kann der Assay angewendet werden (Alam/Cook 1990). Dies beruht vor allem auf seiner hohen Sensitivität (Wood 1990). Bei dem in dieser Arbeit angewendeten Reporterensystem wird ausschließlich die Luciferase des nordamerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* genutzt (Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013). Eine erhöhte Variationsbreite der Ergebnisse ist möglich, die sich aufgrund einer unterschiedlichen Lebensfähigkeit der Bakterienzellen, einer unterschiedlichen Lyse der Zellen oder physikalischer Gegebenheiten, wie der Temperatur, ergeben können (BioTek Instruments Inc. 2016). Ein zusätzlicher Reporter als interne Kontrolle könnte die Daten normieren und abweichende Daten als irrtümlich herausstellen (Fan/Wood 2007). Ein sogenanntes Dual-Luciferase® Reporter Assay System kann daher die Variabilität im Vergleich zu einem herkömmlichen einfachen Luciferase Reporter System minimieren (Sherf et al. 1996). Dazu werden nach der gleichzeitigen Expression zweier verschiedener Reporterenzyme diese in einem System nacheinander gemessen. Das Gen des ersten Reporterenzym, die Luciferase des *Photinus pyralis*, wird an den experimentell zu testenden Promotor gekoppelt. Zusätzlich wird die genetische Information für die Luciferase der *Renilla reniformis*, einer Oktokorallenart, verwendet (Matthews/Hori/Cormier 1977). Diese Luciferase wird konstitutiv exprimiert und dient als Kontrolle des Messsystems. Für die Bestimmung der Promotoraktivität werden die ermittelten Werte normiert, indem ein Quotient aus der *Photinus*-Luciferase-Aktivität und der *Renilla*-Luciferase-Aktivität gebildet wird. Bislang wird dieses Dual-Luciferase® Reporter Assay System hauptsächlich bei Säugerzellen angewendet (Promega Corporation 2015a). Die *Renilla* Luciferase katalysiert dabei eine Reaktion von Coelenterazin und Sauerstoff zu Coelenteramid, Kohlenstoffdioxid und Licht (Promega Corporation 2015a). Das emittierte Licht ist mit einer Wellenlänge von 480 nm bläulich (Matthews/Hori/Cormier 1977). Bei *Escherichia coli* gibt es bei der Expression dieser Luciferase einige Schwierigkeiten. Zum einen ist das Enzym nicht lange stabil und zeigt dementsprechend nur eine sehr kurz anhaltende Lichtemission (Woo/von Arnim 2008). Es konnte aber gezeigt werden, dass eine Mutation der Aminosäure Prolin an Position 220 zu einer verbesserten Lumineszenz führt. Der Austausch zu Glycin zeigt erhöhte RLU-Werte im Vergleich zu der Wildtyp-Variante und eine Mutation zu

Leucin verstärkt die Lumineszenz in *E. coli* Zellen noch deutlicher (Woo/von Arnim 2008). Ein weiterer Nachteil stellt die niedrige Temperatur dar, bei der die Luciferase exprimiert werden kann. Die Arbeitsgruppe lässt die *E. coli* Zellen bei 30 °C anziehen (Woo/von Arnim 2008). Auch andere Arbeitsgruppen haben sich mit der Optimierung der Luciferase aus *Renilla reniformis* beschäftigt. Sie stellten Mutanten vor, die eine höhere Aktivität aufweisen und außerdem auch eine bessere Stabilität besitzen. Die Mutante N264SS287P ist auch bei 5 °C höheren Temperaturen im Vergleich zum Wildtyp noch aktiv und nicht denaturiert (Shigehisa et al. 2017). Dementsprechend könnte eine rekombinante, in ihren Eigenschaften auf *Escherichia coli* optimierte, Luciferase aus *Renilla reniformis* konstruiert werden, die in einem Dual-Luciferase Reportergensystem bläuliche Lumineszenz emittiert. Sie könnte für den Einsatz als Kontroll-Reporterenzym zur Normierung der gemessenen Werte des experimentellen Reporterenzym (Luciferase aus *Photinus pyralis*) etabliert werden und damit eine reduzierte Streuung der Messwerte bewirken.

Jedoch konnte in dieser Arbeit unter der Verwendung eines einfachen Luciferase Reportergen Systems und der damit verbundenen größeren Variationsbreite ein signifikanter Unterschied bei der Bestimmung des Qsc-Wertes der Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 herausgestellt werden (vgl. Kapitel 5.8). Generell wurde das System zuvor mit der Messung definierter Mutanten kalibriert. Dazu wurden Stämme, bei denen die DNA aufgrund einer *topA*- bzw. *gyrA*-Mutation einen bekannten erhöhten bzw. erniedrigten Superspiralisierungsgrad aufwies, im Vergleich zu einer Referenz mit unverändertem Superspiralisierungsgrad genutzt (vgl. Abbildung 5.8–1). Des Weiteren ergab sich ein Vorteil des Messsystems in der Verwendung der beiden Promotoren der Gene *topA* und *gyrA* sowie in der Auswertung als Quotient (vgl. Formel 8.2–2). Durch die Wahl der einheitlichen Messparameter wurde ein vergleichbares Messsystem geschaffen (Abu Mraheil 2004; Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013). In dieser Arbeit sind bei den Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa im gleichen Ablauf nur geringe Unterschiede in dem DNA-Superspiralisierungsgrad zu verzeichnen. Tendenziell spiegeln diese Werte jedoch die Ergebnisse aus vorherigen Arbeiten wider (Arntjen 2011). Da sich diese beiden Mutanten auch nicht durch eine weitere Mutation in den Targetgenen des DNA-Superspiralisierungsgrades *topA* bzw. *gyrA* unterscheiden, wurde auch keine stärkere Abweichung des Qsc-Wertes erwartet (Heisig/Tschorny 1994; Zechiedrich et al. 2000). Diese leichten Unterschiede des Superspiralisierungsgrades könnten zum Teil auch mit auf die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit bzw. Generationszeit der beiden Mutanten zurückzuführen sein (Dorman/Dorman 2016). Die Mutante *E. coli* MIII weist eine Generationszeit von 30 Minuten auf, wohingegen die Mutante *E. coli* MIVa sich nur alle 54 Minuten verdoppelt (Arntjen 2011). Das unterschiedliche Wachstumsverhalten dieser beiden Mutanten wird auch in den Diagrammen deutlich, die in dieser Arbeit aus den oCelloScope™-Daten generiert wurden (vgl. Abbildung 5.4–7). Die Gyrase ist ein energieabhängiges Enzym und benötigt ATP für ihre Reaktion (Gellert et al. 1976). Dementsprechend ist das

Verhältnis aus ATP zu ADP entscheidend für die Ausübung ihrer Funktion. Schnellwachsende Bakterienzellen weisen ein höheres Verhältnis von ATP zu ADP auf (Dorman/Dorman 2016; van Workum et al. 1996). Unter normalen Bedingungen, ohne vorliegende Mutationen in dem Gen *gyrA*, arbeitet die Gyrase besser in schnellwachsenden Bakterienzellen. Daraus ergibt sich, dass die DNA in diesen Zellen einen höheren negativen Superspiralisierungsgrad aufweist (Conter/Menchon/Gutierrez 1997; Dorman/Dorman 2016). Unter Beachtung dieser Erkenntnisse fällt der Qsc-Wert der CRISPR-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 besonders auf. Bei dieser Mutante wurde die *clpA*-Mutation aus *E. coli* MIVa mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems in das Genom von *E. coli* MIII integriert (vgl. Kapitel 5.3.3). Dementsprechend wurden die Targetgene des DNA-Superspiralisierungsgrades *topA* bzw. *gyrA* im Vergleich zu *E. coli* MIII nicht zusätzlich verändert. Wie oben bereits diskutiert, sorgte die alleinige *clpA*-Mutation im Wildtypstamm für keine signifikante Änderung des DNA-Superspiralisierungsgrades. Bei der Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 ergibt sich jedoch ein signifikanter Anstieg ($p = 0,016$) auf einen Qsc-Wert von 1,74, wohingegen bei *E. coli* MIII ein Qsc-Wert von 1,47 gemessen wurde (vgl. Abbildung 5.8–3). Des Weiteren zeigt die Abbildung 5.4–7, dass zwischen den beiden Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 kein Unterschied im Wachstumsverhalten zu erkennen ist. Dies schließt wiederum in diesem Fall einen Einfluss auf den DNA-Superspiralisierungsgrad aus. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in dieser CRISPR-Mutante noch weitere Mutationen, eventuell zur Kompensation, aufgetreten sein könnten. Auch die zum Teil bislang nicht abschließend geklärten Besonderheiten im Expressionsverhalten dieser Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 deuten auf zusätzliche Mutationen hin (vgl. Kapitel 5.6 und 5.7 bzw. Kapitel 6.4 und 6.5). Zur Bestätigung dieser Vermutungen wurde, wie bereits in den vorherigen Diskussionskapiteln erwähnt, eine Genomsequenzierung der Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 von der beauftragten Firma GENEWIZ® Germany GmbH durchgeführt. Die Ergebnisse dazu sind im Anhang unter Kapitel 10.4 aufgeführt und im folgenden Kapitel 7, dem Ausblick, für ein weiteres Vorgehen näher diskutiert.

7 Ausblick

In den vorherigen Diskussionskapiteln (vgl. v a. Kapitel 6.4 bis 6.6) wurde ersichtlich, dass vor allem bei der CRISPR-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12, und teilweise auch bei *E. coli* MIVa, sich ein von den Erwartungen abweichendes Verhalten zeigte. Dies betraf sowohl das unterschiedliche Expressionsverhalten einiger Gene dieser Mutanten als auch den auffallenden Superspiralisierungsgrad der DNA von *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12. Es kam daher die Vermutung auf, dass diese Abweichungen durch zusätzliche, bislang für diese Stämme unbekannt, Mutationen bedingt sein könnten. Wie bereits erwähnt, bestätigte die Genomsequenzierung, dass sowohl in der Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 im Vergleich zu *E. coli* MIII bzw. *E. coli* WT als auch bei *E. coli* MIVa zusätzliche Abweichungen in der Sequenz zu verzeichnen waren (vgl. Kapitel 10.4) (Heisig, A., Groth, P., persönliche Mitteilung). Beide Mutanten wiesen dabei zwei weitere, unterschiedliche Mutationen auf. In der Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 zeigte sich zum einen eine Punktmutation in dem 1260 bp großen Gen *ylbE*. An Position 1040 bp ereignete sich in der codierenden Sequenz ein Austausch eines Guaninnukleotids zu einem Adeninnukleotid (vgl. Abbildung 10.4–2). Auf Aminosäureebene bedeutet dies eine Änderung von Arginin zu Histidin. Beide Aminosäuren präferieren bei der Ausbildung der Proteinstruktur die α -Helix, jedoch Histidin etwas abgeschwächer als Arginin (Berg et al. 2018, S. 61, Tab. 2.3; Creighton 1992, S. 256). Die Auswirkungen dieser Punktmutation sind zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht weiter für das aus 419 Aminosäuren bestehende Protein mit bislang unbekannter Funktion abzuschätzen. Bisher wurde nur eine erhöhte Expression von *ylbE* im Zuge einer *Escherichia coli* Infektion bei Hühnern beschrieben (Tuntufye et al. 2012). Zum anderen wurde eine Mutation *upstream* des 171 bp großen Gens *yqiD* gefunden. Hier fand sich ein Austausch eines Cytosinnukleotids zu einem Thyminnukleotid 174 bp *upstream* von *yqiD* (vgl. Abbildung 10.4–3). Das kleine 56 Aminosäuren große Protein YqiD hat bislang noch keine bekannte Funktion (VanOrsdel et al. 2018). Jedoch wäre denkbar, dass die Expression von *yqiD* durch die Punktmutation im potenziellen regulatorischen Bereich beeinflusst werden könnte. Da beide zusätzlichen Mutationen in der Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 im Zusammenhang mit Proteinen bislang unbekannter Funktion stehen, ist eine Einordnung in den Zusammenhang beispielsweise mit dem veränderten Superspiralisierungsgrad zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich. Es bedarf zunächst weiterer Erkenntnisse zu den Proteinfunktionen.

Auch in der Selektionsmutante *E. coli* MIVa wurden zwei weitere Mutationen ermittelt. Einerseits gab es einen Austausch eines Cytosinnukleotids zu einem Adeninnukleotid. Diese Punktmutation trat 26 bp *upstream* des 771 bp langen Gens *yafV* auf (vgl. Abbildung 10.4–4). In älteren Sequenzierungsdaten (Heisig, A., persönliche Mitteilung) des Stammes *E. coli* MIVa-300 (GK 734) aus dem Arbeitskreis (Schulte 2001) wurde diese Mutation auch bereits detektiert, jedoch nicht eingehend analysiert.

Das 256 Aminosäuren umfassende Protein YafV fungiert als ω -Amidase und könnte ein Stoffwechselreparaturenzym darstellen (Peracchi et al. 2017). Die Regulation erfolgt über den Transkriptionsfaktor Nac (*nitrogen assimilation control*) (Aquino et al. 2017; Muse/Bender 1998; Rosario/Frisch/Bender 2010). Denkbar wäre, dass die Punktmutation die Regulation von *yafV* beeinflussen könnte. Jedoch liegen sowohl die Bindestellen der RNA-Polymerase (-10- bzw. -35-Region; 5'-ATAACA-17-GATATT-3') (Shimada et al. 2014, Table 1) als auch die Nac-Bindungssequenz 5'-ATC-N₉-TAT-3' *upstream* des Nukleotidaustausches (Rosario/Frisch/Bender 2010). Als zweite Mutation wurde bei *E. coli* MIVa andererseits eine Deletion von einem Adeninnukleotid festgestellt (vgl. Abbildung 10.4–5). Diese Mutation liegt im intergenischen Bereich zweier Gene. Sie liegt sowohl 120 bp *upstream* des 999 bp langen Gens *ccpA*, welches auch noch den Namen *ycjW* trägt, als auch 29 bp *upstream* des 1398 bp langen Gens *ycjX*. Die Deletion wurde zusätzlich in einer durchgeführten Sanger-Sequenzierung bestätigt. Es handelt sich um eine Abfolge von acht anstelle von neun Adeninnukleotiden in Folge (vgl. Abbildung 10.4–6 bis Abbildung 10.4–9). Das aus 332 Aminosäuren bestehende Protein YcjW bildet einen Transkriptionsrepressor (Luhachack et al. 2019). Möglich wäre eine durch die Mutation veränderte Regulation dieses Repressors. Das mit 465 Aminosäuren etwas größere Protein YcjX hat eine bislang noch unbekannt Funktion, jedoch kann es unter Stress aktiviert werden (Tsai et al. 2019). Im Promotorbereich von *ycjX* gibt es eine PgrR-Bindestelle. Diese PgrR-Box wird durch eine palindromische Sequenz 5'-ATCATT-*AAATGAT*-3' beschrieben (Shimada/Yamazaki/Ishihama 2013). Generell handelt es sich bei PgrR um einen Transkriptionsfaktor (*peptide glycan recycling regulator*) (Shimada/Yamazaki/Ishihama 2013), der unter anderem auch die Expression von *ycjX* inhibiert (Choi et al. 2016). Durch die Deletion *upstream* von *ycjX*, wäre es denkbar, dass diese Bindestelle für den Repressor PgrR verändert sein könnte und die Expression von *ycjX* dadurch beeinflusst werden könnte. Eine erste RT-qPCR Untersuchung mit jeweils einer biologischen Probe der drei Mutanten *E. coli* MIII, *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa unter normalen Wachstumsbedingungen zeigte bereits für *ycjX* größere Unterschiede in der Genexpression. Für die Gene *yafV* und *ccpA* lagen die gemessenen Werte unter diesen Bedingungen bei den drei Mutanten nah beieinander. Dagegen wurde *ycjX* in der Mutante *E. coli* MIVa deutlich stärker exprimiert. Die Rohdaten zeigten einen Ct-Wert von 23,9, wohingegen dieser bei *E. coli* MIII bei 27,1 und bei *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 bei 26,2 lag. Demzufolge wäre es für nachfolgende Experimente zum einen interessant zu ermitteln, ob diese zusätzliche Mutation im Bakteriengenom von *E. coli* MIVa tatsächlich mit der veränderten Expression von *ycjX* im Zusammenhang steht und eine Aktivierung von YcjX bewirken könnte. Zum anderen sollte analysiert werden, ob diese Mutation auch im Zusammenhang mit dem verlangsamten Wachstum unter ansonsten normalen Wachstumsbedingungen stehen könnte (vgl. Abbildung 5.4–7). Dafür könnte eine weitere CRISPR-Mutante generiert werden, bei der ausschließlich diese Mutation in das Genom von *E. coli* WT integriert werden könnte. Für die *clpA*-

Mutation in der Mutante *E. coli* MIVa wurde die Verantwortlichkeit für das unterschiedliche Wachstumsverhalten zwischen den Mutanten *E. coli* MIII und *E. coli* MIVa im Zuge dieser Arbeit bereits ausgeschlossen (vgl. Kapitel 6.2). Auch die Mutation *upstream* von *yafV* könnte prinzipiell für das abweichende Wachstumsverhalten verantwortlich sein, jedoch liegt diese Mutation auch in dem Stamm *E. coli* MIVa-300 (GK 734) vor (Heisig, A., persönliche Mitteilung), welcher eine deutlich kürzere Generationszeit aufweist (Schulte 2001, Tabelle 3-5) und eine zusätzliche Mutation im regulatorischen Bereich des Gens *fimC* trägt (Heisig, A., persönliche Mitteilung). Daher würden die Veränderungen in dem Wachstumsverhalten eher als Ursache der Mutation *upstream* von *ycjX* sprechen, was es zunächst jedoch zu untersuchen und ermitteln gilt. Generell sollte dabei das Protein YcjX bzw. seine Funktion näher untersucht werden, vor allem im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang mit der Antibiotikawirkung. Schließlich ist diese Mutation *upstream* von *ycjX* unter Selektionsdruck durch Antibiotika hervorgegangen. Möglicherweise könnte hiermit ein neues Target für neuartige Wirkstoffe zur Behandlung hochresistenter Bakterienstämme gefunden werden.

8 Experimenteller Teil (Material und Methoden)

8.1 Material

8.1.1 Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien gehören alle der Spezies *Escherichia coli* an. In der nachfolgenden Tabelle 8.1–1 sind sämtliche Bakterienstämme bzw. Mutanten mit ihren genetischen Besonderheiten aufgelistet, mit denen gearbeitet wurde. Bei der GK-Nr. (Glycerinkultur-Nummer) handelt es sich um eine arbeitskreisinterne Laborbezeichnung.

Tabelle 8.1–1: Verwendete Bakterienstämme bzw. Mutanten

Stammbezeichnung	GK-Nr.	Genetische Besonderheiten	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> WT	571	Wildtyp, klinisches Stuhlisolat	(Heisig/Tschorny 1994)
<i>E. coli</i> MIII	574	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E	(Heisig/Tschorny 1994)
<i>E. coli</i> MIVa	575	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12	(Heisig/Tschorny 1994)
<i>E. coli</i> WT ClpA-Ala569Argfs*12	4542	ClpA Ala569Argfs*12	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIII ClpA-Ala569Argfs*12	4686	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa <i>clpA</i> (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, <i>clpA</i> 1696delA, <i>clpA</i> 1701_1702insA	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa <i>clpA</i> (1695_1697delAAT, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #21	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, <i>clpA</i> 1695_1697delAAT, <i>clpA</i> 1701_1702insA	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa <i>clpA</i> (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #58	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, <i>clpA</i> 1696delA, <i>clpA</i> 1701_1702insA	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa <i>clpA</i> (1695_1705delAATCGAGAAAG) CRISPR-Mutante #146	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, <i>clpA</i> 1695_1705delAATCGAGAAAG	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa <i>clpA</i> (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #178	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, <i>clpA</i> 1696delA, <i>clpA</i> 1701_1702insA	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa <i>clpA</i> (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14 pCas9-CR4	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, <i>clpA</i> 1696delA, <i>clpA</i> 1701_1702insA, pCas9-CR4	Diese Arbeit

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

<i>E. coli</i> DH5 α	409	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), λ ⁻	Gibco, Thermo Scientific TM (Grant et al. 1990)
<i>E. coli</i> DH5 α pCas9-CR4	4225	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), λ ⁻ , pCas9-CR4	Addgene, #62655 (Reisch/Prather 2015)
<i>E. coli</i> DH5 α pKDsgRNA-ack	4226	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), λ ⁻ , pKDsgRNA-ack	Addgene, #62654 (Reisch/Prather 2015)
<i>E. coli</i> DH5 α pDKsgRNA-p15	4227	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), λ ⁻ , pKDsgRNA-p15	Addgene, #62656 (Reisch/Prather 2015)
<i>E. coli</i> WT pCas9-CR4	4531	pCas9-CR4	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT pCas9-CR4 pKDsgRNA-HPclpA	-	pCas9-CR4, pKDsgRNA-HPclpA	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIII pCas9-CR4	-	<i>GyrA</i> S83L, <i>GyrA</i> D87G, <i>ParC</i> S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, <i>RpoC</i> ::A1227, <i>YccJ</i> A6E, pCas9-CR4	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIII pCas9-CR4 pKDsgRNA-HPclpA	-	<i>GyrA</i> S83L, <i>GyrA</i> D87G, <i>ParC</i> S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, <i>RpoC</i> ::A1227, <i>YccJ</i> A6E, pCas9-CR4, pKDsgRNA-HPclpA	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa pCas9-CR4	-	<i>GyrA</i> S83L, <i>GyrA</i> D87G, <i>ParC</i> S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, <i>RpoC</i> ::A1227, <i>YccJ</i> A6E, <i>ClpA</i> Ala569Argfs*12, pCas9-CR4	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa pCas9-CR4 pKDsgRNA-HPclpA-MIVa	-	<i>GyrA</i> S83L, <i>GyrA</i> D87G, <i>ParC</i> S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, <i>RpoC</i> ::A1227, <i>YccJ</i> A6E, <i>ClpA</i> Ala569Argfs*12, pCas9-CR4, pKDsgRNA-HPclpA-MIVa	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa <i>clpA</i> (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14 pCas9-CR4 pKDsgRNA-HPclpA-MIVa-Mut14	-	<i>GyrA</i> S83L, <i>GyrA</i> D87G, <i>ParC</i> S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, <i>RpoC</i> ::A1227, <i>YccJ</i> A6E, <i>clpA</i> 1696delA, <i>clpA</i> 1701_1702insA, pCas9-CR4, pKDsgRNA-HPclpA-MIVa-Mut14	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109	623	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , λ ⁻ , Δ (<i>lac-proAB</i>), [F ['] , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Δ M15]	Promega Corporation (Yanisch-Perron/Vieira/Messing 1985)
<i>E. coli</i> JM83 pACYC184	315	<i>rpsL</i> , <i>ara</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, pACYC184	Labstock des AK Heisig (Chang/Cohen 1978)

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

<i>E. coli</i> JM109 pHPAS10-01.1	4516	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, λ, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qΔM15],</i> pHPAS10-01.1	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 pHPAS10-01.2	4517	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, λ, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qΔM15],</i> pHPAS10-01.2	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 pHPAS10-01.3	4518	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, λ, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qΔM15],</i> pHPAS10-01.3	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 pHPAS10-01.4	-	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, λ, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qΔM15],</i> pHPAS10-01.4	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa pHPAS10-01.1	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12, pHPAS10-01.1	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa pHPAS10-01.3	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12, pHPAS10-01.3	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa pHPAS10-01.4	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12, pHPAS10-01.4	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MC4100	4259	[<i>araD139</i>] _{B/r} , Δ(<i>argF-lac</i>)169, λ, <i>e14</i> , <i>flhD5301</i> , Δ(<i>fruK-yeiR</i>)725(<i>fruA25</i>), <i>relA1</i> , <i>rpsL150</i> (<i>strR</i>), <i>rbsR22</i> , Δ(<i>fimB-fimE</i>)632(::IS1), <i>deoC1</i>	Coli Genetic Stock Center CGSC#: 6152 (Casadaban 1976)
<i>E. coli</i> MC4100 pRepA(1-70)GFP	4265	[<i>araD139</i>] _{B/r} , Δ(<i>argF-lac</i>)169, λ, <i>e14</i> , <i>flhD5301</i> , Δ(<i>fruK-yeiR</i>)725(<i>fruA25</i>), <i>relA1</i> , <i>rpsL150</i> (<i>strR</i>), <i>rbsR22</i> , Δ(<i>fimB-fimE</i>)632(::IS1), <i>deoC1</i> , pRepA(1-70)GFP	(Hoskins/Kim/Wickner 2000)
<i>E. coli</i> MC4100 pGFPuv	4266	[<i>araD139</i>] _{B/r} , Δ(<i>argF-lac</i>)169, λ, <i>e14</i> , <i>flhD5301</i> , Δ(<i>fruK-yeiR</i>)725(<i>fruA25</i>), <i>relA1</i> , <i>rpsL150</i> (<i>strR</i>), <i>rbsR22</i> , Δ(<i>fimB-fimE</i>)632(::IS1), <i>deoC1</i> , pGFPuv	(Hoskins/Kim/Wickner 2000)
<i>E. coli</i> WT pRepA(1-70)GFP	-	pRepA(1-70)GFP	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIII pRepA(1-70)GFP	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, pRepA(1-70)GFP	Diese Arbeit

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

<i>E. coli</i> MIVa pRepA(1-70)GFP	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12, pRepA(1-70)GFP	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT ClpA-Ala569Argfs*12 pRepA(1-70)GFP	-	ClpA Ala569Argfs*12, pRepA(1-70)GFP	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIII ClpA-Ala569Argfs*12 pRepA(1-70)GFP	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12, pRepA(1-70)GFP	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa <i>clpA</i> (1695_1697delAAT, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #21 pRepA(1-70)GFP	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, <i>clpA</i> 1695_1697delAAT, <i>clpA</i> 1701_1702insA, pRepA(1-70)GFP	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa pRepA(1-70)GFP pHPAS10-01.1	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12, pRepA(1-70)GFP, pHPAS10-01.1	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa pRepA(1-70)GFP pHPAS10-01.3	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12, pRepA(1-70)GFP, pHPAS10-01.3	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIVa pRepA(1-70)GFP pHPAS10-01.4	-	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12, pRepA(1-70)GFP, pHPAS10-01.4	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JTT1	711	Referenzstamm mit normalem Superspiralisierungsgrad; <i>gal-25</i> , λ ⁻ , <i>pyrF287</i> , <i>fnr-1</i> , <i>rpsL195</i> (strR), <i>iclR7</i> (Const), <i>trpR72</i> (Am)	Coli Genetic Stock Center CGSC#: 6334 (Sternglanz et al. 1981)
<i>E. coli</i> JTT1 pPHB90	4697	Referenzstamm mit normalem Superspiralisierungsgrad, <i>gal-25</i> , λ ⁻ , <i>pyrF287</i> , <i>fnr-1</i> , <i>rpsL195</i> (strR), <i>iclR7</i> (Const), <i>trpR72</i> (Am), pPHB90	(Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013)
<i>E. coli</i> JTT1 pPHB91	4698	Referenzstamm mit normalem Superspiralisierungsgrad, <i>gal-25</i> , λ ⁻ , <i>pyrF287</i> , <i>fnr-1</i> , <i>rpsL195</i> (strR), <i>iclR7</i> (Const), <i>trpR72</i> (Am), pPHB91	(Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013)
<i>E. coli</i> RS2	713	Referenzstamm mit erhöhtem negativen Superspiralisierungsgrad <i>topA10</i> , <i>gal-25</i> , λ ⁻ , <i>pyrF287</i> , <i>fnr-1</i> , <i>rpsL195</i> (strR), <i>iclR7</i> (Const), <i>trpR72</i> (Am)	Coli Genetic Stock Center CGSC#: 7079 (Sternglanz et al. 1981)
<i>E. coli</i> RS2 pPHB90	4699	Referenzstamm mit erhöhtem negativen Superspiralisierungsgrad, <i>topA10</i> , <i>gal-25</i> , λ ⁻ , <i>pyrF287</i> , <i>fnr-1</i> , <i>rpsL195</i> (strR), <i>iclR7</i> (Const), <i>trpR72</i> (Am), pPHB90	(Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013)

<i>E. coli</i> RS2 pPHB91	4700	Referenzstamm mit erhöhtem negativen Superspiralisierungsgrad, <i>topA10</i> , <i>gal-25</i> , λ , <i>pyrF287</i> , <i>fnr-1</i> , <i>rpsL195</i> (strR), <i>iclR7</i> (Const), <i>trpR72</i> (Am), pPHB91	(Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013)
<i>E. coli</i> WT pPHB90	3303	Wildtyp, pPHB90	(Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013; Arntjen 2011)
<i>E. coli</i> WT pPHB91	3304	Wildtyp, pPHB91	(Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013; Arntjen 2011)
<i>E. coli</i> WT-3-1	796	GyrA S83L, GyrA D87G	(Bagel 1998)
<i>E. coli</i> WT-3-1 pPHB90	4689	GyrA S83L, GyrA D87G, pPHB90	(Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013; Arntjen 2011)
<i>E. coli</i> WT-3-1 pPHB91	4690	GyrA S83L, GyrA D87G, pPHB91	(Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013; Arntjen 2011)
<i>E. coli</i> MIII pPHB90	3765	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, pPHB90	(Arntjen 2011)
<i>E. coli</i> MIII pPHB91	3766	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, pPHB91	(Arntjen 2011)
<i>E. coli</i> MIVa pPHB90	3771	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12, pPHB90	(Arntjen 2011)
<i>E. coli</i> MIVa pPHB91	3772	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12, pPHB91	(Arntjen 2011)
<i>E. coli</i> WT ClpA-Ala569Argfs*12 pPHB90	4691	ClpA Ala569Argfs*12, pPHB90	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> WT ClpA-Ala569Argfs*12 pPHB91	4692	ClpA Ala569Argfs*12, pPHB91	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIII ClpA-Ala569Argfs*12 pPHB90	4701	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12, pPHB90	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> MIII ClpA-Ala569Argfs*12 pPHB91	4702	GyrA S83L, GyrA D87G, ParC S80I, <i>marR</i> Δ 74bp, RpoC ::A1227, YccJ A6E, ClpA Ala569Argfs*12, pPHB91	Diese Arbeit

Legende:

araD139: Mutation der L-Ribulose-5-Phosphat-4-Epimerase, Blockade des Arabinosemetabolismus; **deoC1:** Mutation der Deoxyribose-Phosphat Aldolase, Thymidin inhibiert das Wachstum der Mutanten; **deoR:** Repressor des Desoxyribose-Operons; **e14⁻:** Abwesenheit der Prophage e14; **endA1:** Endonuklease I; **F⁻:** kein F-Plasmid mehr vorhanden; **flhD5301:** Mutation des Flagellen Transkriptionsfaktors; **fnr-1:** Fumarat kann nicht als terminaler Elektronenakzeptor in der anaeroben Atmung genutzt werden (Lambden/Guest 1976); **gal-25:** kein(e) Verwertung/Verstoffwechseln von Galactosidase; **glnV44 = supE44:** tRNA-Gln(CUG); **gyrA96:** Gyrasemutation, führt zu Nalidixinsäureresistenz; **hsdR17(r_K, m_K⁺):** Mutation inhibiert die

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

Endonuklease des Restriktions-Modifikations-System, die Methylase bleibt aktiv; *iclR7(Const)*: Repressor des Glyoxylatweges ist konstitutiv (Shin et al. 1997); λ^- : kein Phage λ mehr vorhanden; *nupG*: Nukleosidtransporter, konstitutive Expression von Genen der Desoxyribosynthese, gestattet Aufnahme großer Plasmide; *pyrF287*: sorgt für Uracil Auxotrophie (Horzempa et al. 2010); *rbsR22*: Mutation des Ribose Repressors; *recA1*: Mutation führt zu Defiziten in der DNA-Reparatur, Bakterien sind UV-sensitiv; *relA1*: Mutation sorgt für eine veränderte Zusammensetzung der Lipidschicht, höhere Empfindlichkeit gegenüber Ultraschall und osmotischem Druck (Shokri/Veide/Larsson 2006); *rpsL*, *rpsL150(strR)*, *rpsL195(strR)*: Mutation in dem ribosomalen Protein S12, Streptomycinresistenz; *thi-1*: sorgt für Thiamin Auxotrophie; *topA10*: Deletion in der Topoisomerase, vermittelt erhöhten negativen DNA-Superspiralisierungsgrad; *trpR72(Am)*: Mutation des Tryptophan-Aporepressors verhindert die Bindung an den Operator des *trp*-Operons (Bass/Sorrells/Youderian 1988); $\Phi 80dlacZ\Delta M15$: Deletion im *lacZ* Gen ermöglicht die Blau-Weiß-Selektion; $\Delta(fimB-fimE)632(::IS1)$: Veränderung der Fimbrientranskription, $\Delta(fruK-yeiR)725 (fruA25)$: Deletion nur des Promotor von *fruA*; $\Delta(lac-proAB)$: Deletion des *lac*-Operons und zweier Gene für die Prolinbiosynthese, Prolin supplementieren; $\Delta(lacZYA-argF)U169$, $\Delta(argF-lac)169$: Deletion vermittelt eine hohe Wasserstoffperoxidresistenz (Volkert et al. 1994); **[F', traD36, proAB, lac^aZ Δ M15]**: F'-Plasmid mit eliminiertem Transferfaktor, einer erhöhten Produktion des *lac*-Repressors und einer Deletion im *lacZ* Gen zur Ermöglichung der Blau-Weiß-Selektion. (Promega Corporation 2010)

8.1.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in der nachfolgenden Tabelle 8.1–2 aufgelistet. Selbst konstruierte Plasmide sind nach der Nomenklatur mit folgendem Schema benannt worden: **pHPASxx-y.z** (**p** = Plasmid, **HP** = Hamburg, Pharmazeutische Biologie, **AS** = konstruiert von Alina Schwarz, **xx** = Ausgangsvektor nach arbeitskreisinternem Zahlenschema, **y** = individuelles Projekt, **z** = Derivat). Bei den pKDsgRNA-Plasmiden handelt es sich jeweils um Abkömmlinge des Plasmids pKDsgRNA-ack. Hier wurde die Nomenklatur beibehalten und anstelle des „ack“ ein „HP“ für Hamburg, Pharmazeutische Biologie ergänzt und das Plasmid mit dem jeweiligen adressierten Zielgen mit eventuell dem zu adressierenden Bakterienstamm benannt.

Tabelle 8.1–2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Größe [bp]	Genetische Besonderheiten	Herkunft/Referenz	Einsatz
pACYC184	4245	Cm ^R , Tet ^R	(Chang/Cohen 1978)	A
pCas9-CR4	6770	CAT, <i>tetR</i> , <i>cas9</i>	Addgene #62655 (Reisch/Prather 2015)	B
pHPAS10-01.1	3906	Tet ^R	Diese Arbeit	A
pHPAS10-01.2	7077	Tet ^R , <i>clpS</i> , <i>clpA</i>	Diese Arbeit	A
pHPAS10-01.3	6656	Tet ^R , <i>clpA</i>	Diese Arbeit	A
pHPAS10-01.4	6726	Tet ^R , <i>clpA</i>	Diese Arbeit	A
pKDsgRNA-ack	6959	<i>aadA</i> , <i>araC</i> , <i>gam</i> , <i>beta</i> , <i>exo</i> , sgRNA, 20 Nukleotide aus <i>ack</i>	Addgene # 62654 (Reisch/Prather 2015)	B
pKDsgRNA-HPclpA	6959	<i>aadA</i> , <i>araC</i> , <i>gam</i> , <i>beta</i> , <i>exo</i> , sgRNA, 20 Nukleotide aus <i>clpA</i> (WT)	Diese Arbeit	B
pKDsgRNA-HPclpA-MIVa	6959	<i>aadA</i> , <i>araC</i> , <i>gam</i> , <i>beta</i> , <i>exo</i> , sgRNA, 20 Nukleotide aus <i>clpA</i> (MIVa)	Diese Arbeit	B
pKDsgRNA-HPclpA-MIVa-Mut14	6959	<i>aadA</i> , <i>araC</i> , <i>gam</i> , <i>beta</i> , <i>exo</i> , sgRNA, 20 Nukleotide aus <i>clpA</i> (MIVa CRISPR-Mutante #14)	Diese Arbeit	B

pKDsgRNA-p15	6962	<i>aadA, araC, gam, beta, exo</i> , sgRNA, 20 Nukleotide aus p15A <i>origin of replication</i>	Addgene # 62656 (Reisch/Prather 2015)	B
pPHB90	6531	Tet ^R , <i>ptopA-luc</i>	(Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013)	C
pPHB91	6269	Tet ^R , <i>pgyrA-luc</i>	(Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013)	C
pRepA(1-70)GFP	5458	<i>araC, bla</i> , RepA(1-70), GFP	(Hoskins/Kim/Wickner 2000)	D
A: Komplementation B: Genomische Mutagenese mit dem CRISPR/ <i>Cas9</i> -System C: Superspiralisierungsgrad-Bestimmung über den Qsc-Wert D: <i>In-vivo</i> Funktionstest von ClpA				

8.1.3 Oligonukleotide

In Tabelle 8.1–3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide mit ihrer Sequenz aufgelistet. Zudem ist die eingefügte Restriktionsschnittstelle oder auch eine Modifikation des Oligonukleotids aufgeführt, sofern diese vorhanden sind. Bezogen wurden die Oligonukleotide von (1) Invitrogen™, die zu Thermo Fisher Scientific gehören, oder von (2) Sigma-Aldrich®, die zur Merck KGaA gehören, vgl. Indexzahlen hinter der Oligonukleotidbezeichnung in Tabelle 8.1–3. Sofern in der letzten Spalte keine Referenz angegeben ist, wurden die Oligonukleotide in dieser Arbeit selbst konzipiert.

Tabelle 8.1–3: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Länge [nt]	Sequenz (5' → 3')	Schnittstelle/Modifikation	Aufreinigung	Einsatz/Referenz
acnB_3_2124_RT_HPLC ²	17	GCGTCGTCGGGTCATT		HPLC	E
acnB_5_2066_RT_HPLC ²	21	ATCGATCTGGCGGATATCAAA		HPLC	E
ahpC_3_434_RT_HPLC ²	16	GCGTCACGGCCAATGC		HPLC	E
ahpC_5_378_RT_HPLC ²	18	CCCGCAGGGTATCATCCA		HPLC	E
ahpF_3_1276_RT_HPLC ²	17	CCGTGGTTTGCGCATTC		HPLC	E
ahpF_5_1221_RT_HPLC ²	21	GGACAAACTACGCAGCCTGAA		HPLC	E
ccpA_3_155_EcoWT ²	21	GCCAGCTTGTGGTTGATAC		desalted	F
ccpA_5_-386_EcoWT ²	20	GGAATGCCAAAGTCACGCTG		desalted	F
clpA_1702delA_noSCAR ¹	81	EZCCATCACCTGCAAGAGGAT-GTTGAACACGTCCGGGTGCGC-TTCTCGATTTCTGCCAGCAGC-AGCACCGCATGTGGAZEC	Phosphothioat	desalted	B
clpA_1702insA_noSCAR ¹	82	EZCCATCACCTGCAAGAGGAT-GTTGAACACGTCCGGGTGCGC-TTTTCTCGATTTCTGCCAGCAGCAGCACCGCATGTGGAZEC	Phosphothioat	desalted	B
clpA_3_-352_EcoWT ¹	24	TGTCAGTTATCATCTTCGGT-TACG	5'-PO ₄	desalted	C
clpA_3_1713_EcoWT_ARMS_weak ¹	20	CGGGTGCCTTTCTCGATCT		desalted	A

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

clpA_3_1721_EcoMIVa_ARMS ¹	21	GAACACGTCCGGGTGCGCTGC		desalted	A
clpA_3_1722_EcoWT_ARMS ¹	21	GAACACGTCCGGGTGCGCTGT		desalted	A
clpA_3_2306_EcoWT ¹	22	GGACTTAACCAACCTACCAGAC		desalted	F
clpA_3_2500_BamHI_EcoWT ¹	36	GCTACGTGGATCCTCAAATA- CTACACGTTTAGCCCG	<i>BamHI</i>	desalted	C
clpA_5_-248_BamHI_EcoWT ¹	33	GACTGCTGGATCCGATGGAG- TTTGTATTGACG	<i>BamHI</i>	desalted	C
clpA_5_-674_BamHI_EcoWT ¹	36	GAGAGTCGGATCCTTCGCAA- ATCTTATAACAAGTAAG	<i>BamHI</i>	desalted	C
clpA_5_1_EcoWT ¹	24	ATGCTCAATCAAGAAGT- GAACTC		desalted	C
clpA_5_1462_EcoWT ¹	22	GTCGGTTCGTTCTGTTGCCG		desalted	A, F
clpX_3_728_RT_HPLC ²	19	CCGGAGCCGGTTTCTACAC		HPLC	E
clpX_5_669_RT_HPLC ²	15	TGGCGGTGCGTTTGC		HPLC	E
dnaQ_3_562_RT_HPLC ²	21	TGCGCTGAATTGTTGTTTCAC		HPLC	E
dnaQ_5_501_RT_HPLC ²	19	GATGGCTTTTGCGATGGAA		HPLC	E
dps_3_420_RT_HPLC ²	17	TTTCGCTTCGCCAATCG		HPLC	E
dps_5_358_RT_HPLC ²	19	GAGCTGGCTGACCGTTACG		HPLC	E
katE_3_1491_RT_HPLC ²	20	GCGCTCGGAACTTTATTTTC		HPLC	E
katE_5_1436_RT_HPLC ²	19	GCGGCGGTTTTGAATCATA		HPLC	E
katG_3_2041_RT_HPLC ²	18	GGTCACGGCCTTCAACA		HPLC	E
katG_5_1980_RT_HPLC ²	23	GGATATGCGTTACGAGTGGA- AAG		HPLC	E
pKDsgRNA_3_5335_PO4 ¹	22	GTGCTCAGTATCTCTACTG	5'-PO ₄	desalted	B
pKDsgRNA_3_5481 ¹	21	CAGATCCTCTTGAGATGAG		desalted	B/ AK Heisig (Deike Rönfeldt)
pKDsgRNA_3_5546_PSQ_Biotin ¹	20	AAAACAGCCAAGCTGGAGAC	5'-Biotin	desalted	D
pKDsgRNA_5_4952 ¹	20	GTAATGGCACTACAGGCGC		desalted	B/ AK Heisig (Deike Rönfeldt)
pKDsgRNA_5_5255 ¹	22	TTCGCTAAGGATGATTTCTGGA		desalted	D
pKDsgRNA_5_5316_PSQ_Seq ¹	20	GTGATAGAGATACTGAGCAC		desalted	D
pKDsgRNA_clpA_MIVa_5_5336 ¹	43	ACGAAATCGAGAAGCGCACC- GTTTTAGAGCTAGAAATAGCA- AG		desalted	B
pKDsgRNA_clpA_Mut14_5_5336 ¹	43	ACGAATCGAGAAAGCGCACC- GTTTTAGAGCTAGAAATAGCA- AG		desalted	B
PtetR_pKDsgRNA_3_5335 ¹	23	GTGCTCAGTATCTCTACT- GA	5'-PO ₄	desalted	B/ (Reisch/ Prather 2017)
rplJ_3_59_RT_HPLC ²	20	TTGGCTACTTCGCTGACTTC		HPLC	E/ (Culviner /Laub 2018)
rplJ_3_357_RT_HPLC ²	20	CGGGATCAGCTCACCTCAA		HPLC	E

rplJ_5_-19_RT_HPLC ²	21	ACATCCAGGAGCAAAGCTAAT		HPLC	E/ (Culviner /Laub 2018)
rplJ_5_298_RT_HPLC ²	20	GCGAAAGCGAATGCAAAATT		HPLC	E
rplL_3_307_RT_HPLC ²	20	CGTCTTTGCTCACGCCTTCT		HPLC	E
rplL_5_247_RT_HPLC ²	25	GAAGCTAAAGACCTGGTTGA- ATCTG		HPLC	E
rpoB_3_1757_RT_HPLC ²	22	GGGAGTTGATCAGACCGATG- TT		HPLC	E
rpoB_5_1699_RT_HPLC ²	19	CGGTGCGTATGTCCAATC		HPLC	E
rpoC_3_2696_RT_HPLC ²	20	CCGTAGCAGTGCGCACATAC		HPLC	E
rpoC_5_2620_RT_HPLC ²	21	AACTCTGTCGACGCGGTTAAA		HPLC	E
sdhC_3_225_RT_HPLC ²	22	GACGAAGAAGCTGCCATAAT C		HPLC	E
sdhC_5_167_RT_HPLC ²	20	GCCTCTTCCCCTGAAGGT		HPLC	E
SOE_3_pKDsgRNA_clpA ¹	42	GGTGCCTTTCTCGATTTCGGT GCTCAGTATCTCTACTG		desalted	B
SOE_5_clpA_pKDsgRNA ¹	43	CGAAATCGAGAAAGCGCACCG TTTTAGAGCTAGAAATAGCAA G		desalted	B
upp_3_152_RT_HPLC ²	18	TCGTAAGTCAGCAGGCTA		HPLC	E/ (Culviner /Laub 2018)
upp_5_28_RT_HPLC ²	20	ATGAAGATCGTGGAAAGTCAA		HPLC	E/ (Culviner /Laub 2018)

A: ARMS

B: Genomische Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System

C: Komplementation

D: Pyrosequencing®

E: RT-qPCR

F: Sanger-Sequenzierung

Phosphothioat-Oligonukleotide:

Legende Phosphothioat-Code bei Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.):

E ≙ G-Phosphothioat

F ≙ A-Phosphothioat

O ≙ C-Phosphothioat

Z ≙ T-Phosphothioat

(Thermo Fisher Scientific o. J.)

8.1.4 Größenmarker für DNA

Die in Tabelle 8.1–4 nachfolgend aufgeführten Größenmarker wurden bei der Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 8.2.2.4) als Vergleichsstandard für DNA-Fragmentgrößen und zur Konzentrationsabschätzung (vgl. Kapitel 8.2.2.5.1) verwendet. Die Abbildung 8.1–1 zeigt die jeweiligen Bandenmuster der Größenmarker und die zugehörige entsprechende Masse [ng] pro Fragmentgröße.

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

Tabelle 8.1–4: Verwendete Größenmarker in der Gelelektrophorese

Bezeichnung des Markers	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (# SM1334)	Thermo Scientific™
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (# SM0323)	Thermo Scientific™
Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (# N0550S)	New England BioLabs® GmbH (NEB)

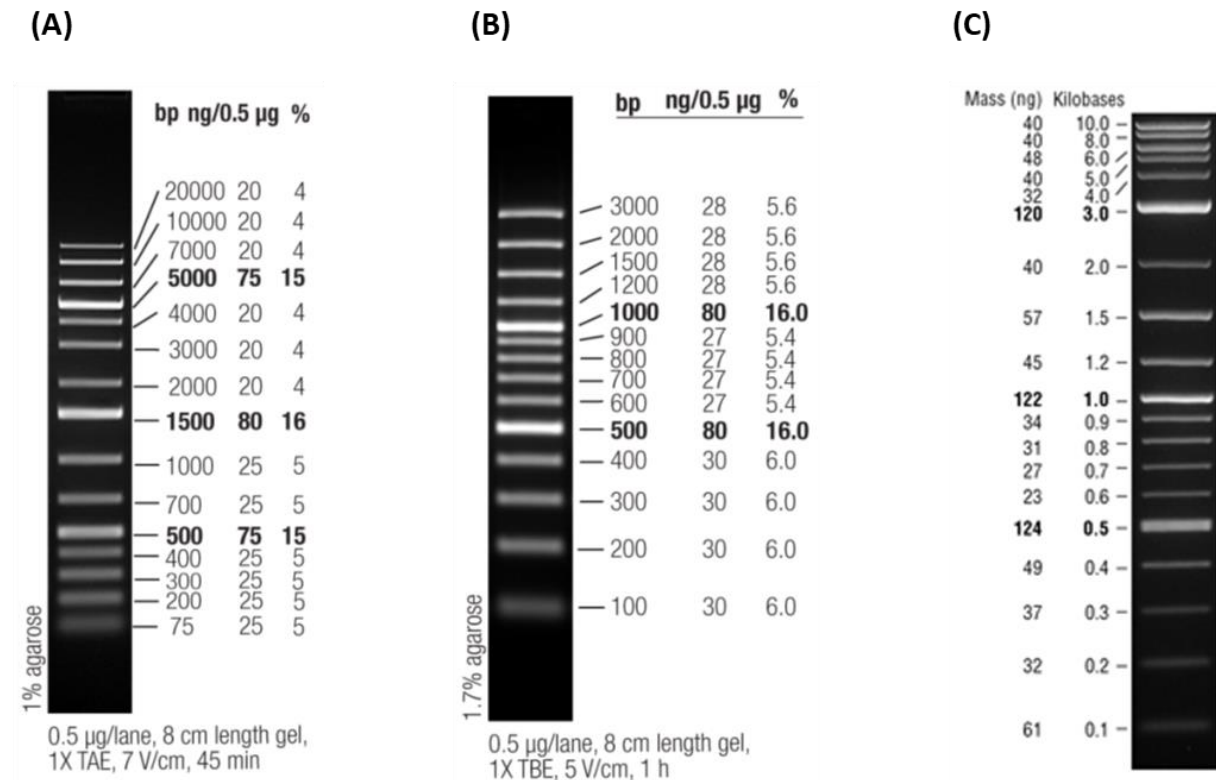


Abbildung 8.1–1: Bandenmuster der verwendeten Größenmarker

(A): GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc. 2019); **(B):** GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc. 2018); **(C):** Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs Inc. o. J.-b)

8.1.5 Enzyme

In Tabelle 8.1–5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme alphabetisch sortiert aufgeführt. Zudem ist jeweils der zugehörige Puffer, der mit dem jeweiligen Enzym genutzt wurde, genannt, sowie der Hersteller, bei dem das Enzym bezogen wurde.

Tabelle 8.1–5: Verwendete Enzyme mit zugehörigem Puffer

Enzym	Zugehöriger Puffer	Hersteller
<i>DNase I</i> , <i>RNase</i> -frei, 1 U/µL (# EN0521)	10x <i>DNase I</i> Reaction Buffer mit MgCl ₂	Thermo Scientific™
<i>DpnI</i> , FastDigest (# FD1703)	10x FastDigest Buffer bzw. 10x FastDigest Green Buffer	Thermo Scientific™

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

<i>DraI</i> , FastDigest (# FD0224)	10x FastDigest Buffer bzw. 10x FastDigest Green Buffer	Thermo Scientific™ (Fermentas Life Sciences)
DreamTaq™ DNA Polymerase (5 U/μL) (# EP0703)	10x DreamTaq Buffer (einschließlich 20 mM MgCl ₂)	Thermo Scientific™
Exonuklease I (20 U/μL) (# EN0581)	10x Reaction Buffer for Exonuclease I (Aktiv in allen Thermo Scientific™ Restriktionsenzym- oder PCR- Puffern)	Thermo Scientific™
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/μL) (# EF0651)	10x FastAP Buffer (Aktiv in allen Thermo Scientific™ Restriktionsenzym- oder PCR- Puffern)	Thermo Scientific™
<i>HindIII</i> (# R0104S)	10x NEBuffer™ 2.1 (# B7202S)	New England BioLabs® GmbH (NEB)
<i>HindIII</i> , FastDigest (# FD0504)	10x FastDigest Buffer bzw. 10x FastDigest Green Buffer	Thermo Scientific™
<i>KasI</i> (# R0544S)	CutSmart® Buffer (# B7204)	New England BioLabs® GmbH (NEB)
Lysozym, ≈20000 U/mg, 3x krist, lyophilisiert		Carl Roth GmbH + Co. KG
Phusion™ High-Fidelity DNA- Polymerase (2 U/μL) (# F530S)	5x Phusion HF Buffer, 5x Phusion GC Buffer (jeweils einschließlich 7,5 mM MgCl ₂)	Thermo Scientific™
<i>RNase A</i> , 100 mg/mL (7000 U/mL)	Resuspensionspuffer (Buffer P1) (# 19051)	QIAQEN GmbH
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (2000 U/mL) (# M0491S)	5x Q5® Reaction Buffer Pack (# B9027S)	New England BioLabs® GmbH (NEB)
T4 DNA Ligase (400000 U/mL) (# M0202S)	10x T4 DNA Ligase Reaction Buffer (einschließlich 10 mM ATP) (# B0202S)	New England BioLabs® GmbH (NEB)
T4 DNA Ligase (5 U/μL) (# EL0011)	10x T4 DNA Ligase Buffer (einschließlich 5 mM ATP) (# B69)	Thermo Scientific™

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

8.1.6 Kits

In dieser Arbeit wurden einige Experimente mit kommerziell erwerbbaaren Kits durchgeföhrt. Diese sind in Tabelle 8.1–6 mit ihrer Verwendung aufgelistet. Die Durchföh rung fand nach den Hersteller-Protokollen statt; bei Abweichungen davon, ist dies in den Methoden (Kapitel 8.2) beschrieben.

Tabelle 8.1–6: Verwendete Kits

Kit (Katalog-Nr.)	Verwendung	Hersteller
DNeasy® Blood & Tissue Kit (# 69504)	Isolierung genomischer DNA	QIAQEN GmbH
GeneJET Gel Extraction Kit (# K0692)	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Thermo Scientific™
GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit	Sanger-Sequenzierung	Beckman Coulter Inc.
Luciferase Assay System (# E1500)	Bestimmung des Superspiralisierungsgrades über den Qsc-Wert	Promega Corporation
LunaScript® RT SuperMix Kit (NEB # E3010)	cDNA-Synthese für quantitative <i>real-time</i> PCR	New England BioLabs® GmbH (NEB)
Luna® Universal qPCR Master Mix (NEB # M3003)	Quantitative <i>real-time</i> PCR	New England BioLabs® GmbH (NEB)
Monarch® Plasmid Miniprep Kit (NEB # T1010)	Isolierung von Plasmid-DNA	New England BioLabs® GmbH (NEB)
Monarch® RNA Cleanup Kit (NEB # T2030 (10 µg))	Aufreinigung von RNA	New England BioLabs® GmbH (NEB)
Monarch® Total RNA Miniprep Kit (NEB # T2010)	Isolierung von RNA	New England BioLabs® GmbH (NEB)
PyroMark Gold Q96 Reagents (5x96) (# 972804)	Pyrosequencing®	QIAQEN GmbH
RNAprotect® Bacteria Reagent (# 76506)	Isolierung von RNA, Stabilisierung	QIAQEN GmbH

8.1.7 Chemikalien

In Tabelle 8.1–1 sind sämtliche Chemikalien mit dem zugehörigen Hersteller, bei dem diese bezogen wurden, in alphabetischer Reihenfolge aufgeföhrt.

Tabelle 8.1–7: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose NEE0, Ultra-Qualität (# 2267.4), <i>DNase</i> -free, <i>RNase</i> -free	Carl Roth GmbH + Co. KG
Agarose, universal peqGOLD®, molecular biology grade, <i>DNase</i> -free, <i>RNase</i> -free	VWR (PEQLAB Biotechnologie GmbH)
Albumin Fraktion V (BSA), ≥ 98 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl), zur Analyse EMSURE®, ACS	Merck KGaA
Anhydrotetracyclin Hydrochlorid (aTC), ≥ 98 % (HPLC) (#CDX-A0197-M500)	Biomol GmbH, Chemodex AG
Annealing Buffer, PyroMark Annealing Buffer (# 979009)	QIAQEN GmbH

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

L-(+)-Arabinose, ≥ 99,0 % (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Binding Buffer, PyroMark Binding Buffer (# 979006)	QIAQEN GmbH
Bromphenolblau, Electrophoresis Purity Reagent	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	Merck KGaA
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), dNTP-Set, 100 mM-Lösungen, 4x25 µmol (# R0181)	Thermo Scientific™
Diethylpyrocarbonat (DEPC), ≥ 97 %	Carl Roth GmbH + Co. KG
di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄), wasserfrei, reinst	Merck KGaA
Dimethylsulfoxid (DMSO), zur Analyse EMSURE®, ACS	Merck KGaA
di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O), ≥ 98 %, p. a., ACS	Carl Roth GmbH + Co. KG
Essigsäure (Eisessig), 99,8-100,5 %	VWR Chemicals
Ethanol absolut, ≥ 99,8 %	VWR Chemicals
Ethidiumbromidlösung (EtBr), 1 % (10 mg/mL) in H ₂ O	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA), ≥ 99 %, p. a.	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ficoll® 400, für die Molekularbiologie und Biochemie	Carl Roth GmbH + Co. KG
Gibco® Distilled Water <i>DNase-/RNase-free</i> , 500 mL	Life Technologies™ (heute: Thermo Fisher Scientific, Inc.)
D-(+)-Glucose Monohydrat	Merck KGaA
Glycerin, Rotipuran® ≥ 99,5 %, p. a., wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG
Glycogen, molecular biology grade, 20 mg/mL	Thermo Scientific™
Hefeextrakt granuliert	Merck KGaA
Invitrogen™ UltraPure™ Distilled Water <i>DNase-/RNase-free</i> , 500 mL	Invitrogen AG, Life Technologies™ (heute: Thermo Fisher Scientific, Inc.)
Kaliumacetat (KAc), ≥ 99 %, ACS, Prolabo®	VWR Chemicals
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄), p. a.	Merck KGaA
Lysozym, ≈ 20000 U/mg, 3x krist, lyophilisiert	Carl Roth GmbH + Co. KG
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ ·6H ₂ O), p. a.	Merck KGaA
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ ·7H ₂ O), ≥ 99 %, p. a.	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumacetat-Lösung, 3M pH 5,2	Thermo Scientific™
Natriumacetat, p. a., wasserfrei	Merck KGaA
Natriumacetat Trihydrat, p. a.	Merck KGaA
Natriumchlorid (NaCl), ≥ 99 %, Ph. Eur.	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumhydroxid (NaOH), 99 % für analytische Zwecke Pellets	Grüssing GmbH
Natriumlaurylsulfat (SDS), Dodecylsulfat-Na-Salz in Pelletform	SERVA Electrophoresis GmbH
Natronlauge, 10 mol/L, EMPROVE® EXPERT	Merck KGaA
ortho-Phosphorsäure (H ₃ PO ₄), 85 %, zur Analyse EMSURE®, ACS	Merck KGaA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, im Verhältnis 25:24:1, Roti®, pH 7,5-8,0	Carl Roth GmbH + Co. KG
Polysucrose 400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RNA Gel Loading Dye (2x) (# R0641)	Thermo Scientific™
RNase AWAY™	Fisher Scientific GmbH
Streptavidin-Sepharose-Beads, Cytiva Streptavidin Sepharose™ Hochleistungsmedien	Fisher Scientific GmbH

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

TE-Puffer (20x), RNasefree, Component B aus RiboGreen® RNA Quantitation Kit (#R-11490) (200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7,5)	Molecular Probes, Inc. (heute: Thermo Fisher Scientific, Inc.)
TRIS, Pufferan® ≥ 99,3 %, Buffer Grade (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid), BIOPUR	Merck KGaA
Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Carl Roth GmbH + Co. KG
Water for Molecular Biology, RT-PCR Tested (# H2OMB0106) 6x125 mL	Merck Millipore
Xylencyanol	Merck KGaA

8.1.8 Antibiotika

In der nachfolgenden Tabelle 8.1–8 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika mit ihrem zugehörigen Lösungsmittel aufgeführt. Außerdem ist der Hersteller des jeweiligen Antibiotikums mit aufgeführt. Einige Antibiotika wurden als Selektionsdruck autoklaviertem LB-Agar zugesetzt (vgl. Kapitel 8.1.10), die dafür eingesetzte Endkonzentration ist der Tabelle 8.1–8 zu entnehmen.

Tabelle 8.1–8: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Endkonzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Hersteller
Amikacin-Disulfat (74,9 %)	H ₂ O	30	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ampicillin-Natriumsalz (94,3 %)	H ₂ O	50 / 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Chloramphenicol (98 %)	Ethanol absolut	35 / 50 / 100	Acros Organics BVBA, Thermo Fisher Scientific, Inc.
Ciprofloxacin-Hydrochlorid Monohydrat (85,9 %)	H ₂ O		Bayer AG
Gentamicin-Sulfat (59 %)	H ₂ O	25 / 50	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kanamycin-Sulfat aus <i>Streptomyces kanamyceticus</i> (83,3 %)	H ₂ O	25 / 50	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Nalidixinsäure-Natriumsalz (90,9 %)	H ₂ O mit wenig NaOH		Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Rifampicin (98,1 %)	100 % DMSO		Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Spectinomycin-Dihydrochlorid Pentahydrat (60 %)	H ₂ O	50 / 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tetracyclin (90,1 %)	50 % Ethanol	10	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

8.1.9 Puffer und Lösungen

Neben den Puffern, die speziell zu den kommerziell erworbenen Enzymen gehören und mit diesen zusammen erstanden wurden (vgl. Kapitel 8.1.5, Tabelle 8.1–5), bzw. fertige Lösungen, die bei den Chemikalien in Tabelle 8.1–7 mit gelistet sind, oder Bestandteile der Kits sind (vgl. Kapitel 8.1.6), wurden in dieser Arbeit weitere Puffer und Lösungen benötigt, die selbst hergestellt wurden und in Tabelle 8.1–9 aufgeführt sind.

Tabelle 8.1–9: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	Anwendung
Isotonische Kochsalzlösung	9 g NaCl auf 1 L dH ₂ O	Verdünnungsreihen für KBE-Bestimmung (vgl. Kapitel 8.2.1.2)
GTE-Puffer	50 mM Glucose, 25mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 8,0 (Green/Sambrook 2012, S. 1812, Band 3)	Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (vgl. Kapitel 8.2.2.1.2)
Ladepuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylenxyanol, 15 % Polysucrose 400 (Green/Sambrook 2012, S. 1816, Band 3; Voytas 2000, S. 2.5A.5)	Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten bzw. Plasmiden (vgl. Kapitel 8.2.2.4)
Lyse-Puffer	200 mM NaOH, 1 % SDS (Green/Sambrook 2012, S. 1813, Band 3)	Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (vgl. Kapitel 8.2.2.1.2)
Lysispuffer	1,25 mg/mL Lysozym, 2,5 mg/mL BSA, 1x CCLR (Bestandteil des Luciferase Assay System von Promega Corporation; 25 mM Trisphosphat (pH 7,8), 2 mM DTT, 2 mM 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'- tetraacetic acid, 10 % Glycerol, 1 % Triton® X-100) (Promega Corporation 2015b)	Bestimmung des Superspiralisierungsgrades über den Qsc-Wert (vgl. Kapitel 8.2.1.6)
M9-Salze (10x)	85,56 mM NaCl, 418,87 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O, 186,95 mM NH ₄ Cl, 220,44 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4 mit NaOH	Stammlösung zur Herstellung von M9Glu-Minimalmedium (vgl. Kapitel 8.1.10)
Natriumacetat-Lösung (3 M)	3 M Natriumacetat; pH 5,2 mit Eisessig	Ethanol-Präzipitation (vgl. Kapitel 8.2.2.3.2)
Neutralisationspuffer	3 M Kaliumacetat (KAc), 11,5 % Eisessig (Green/Sambrook 2012, S. 1813, Band 3)	Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (vgl. Kapitel 8.2.2.1.2)
Stabilisierungspuffer	1 M K ₂ HPO ₄ , 20 mM EDTA; pH 7,8 mit H ₃ PO ₄	Bestimmung des Superspiralisierungsgrades über den Qsc-Wert (vgl. Kapitel 8.2.1.6)
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris, 50 mM EDTA; mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen	Laufpuffer Gelelektrophorese verdünnt auf 0,5x (vgl. Kapitel 8.2.2.4)
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA; pH 8,0 (Green/Sambrook 2012, S. 1826, Band 3)	Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (vgl. Kapitel 8.2.2.1.2); Eluieren genomischer DNA für das Next-Generation Sequencing (vgl. Kapitel 8.2.2.9.3)

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

Washing Buffer	10 mM Tris; pH 7,6 mit Essigsäure	Pyrosequencing® (vgl. Kapitel 8.2.2.9.2)
----------------	-----------------------------------	---------------------------------------------

8.1.10 Nährmedien und -agar

In dieser Arbeit wurden für die Kultivierung der *Escherichia coli* Bakterien verschiedene flüssige und feste (+ Agar-Agar Zusatz) Nährmedien verwendet, welche der Tabelle 8.1–10 zu entnehmen sind. Die Medien wurden nach dem Lösen mit dH₂O aus der Millipore RiOs™ 5 Anlage direkt bei 121 °C, ca. 1 bar Überdruck (\cong Dampfdruck von 2,1 bar = 2100 hPa = 210 kPa) für 15 Minuten autoklaviert. Zur Herstellung antibiotikahaltiger Agarplatten wurde LB-Agar nach dem Autoklavieren auf ca. 50 °C unter Rühren abgekühlt und anschließend mit steril filtrierter Antibiotikallösung entsprechend der jeweiligen Endkonzentration (vgl. Kapitel 8.1.8, Tabelle 8.1–8) versetzt.

Tabelle 8.1–10: Verwendete Nährmedien und -agar

Medium / Agar	Zusammensetzung	Hersteller
LB (Luria/Miller) Agar (LB-Agar)	Nach Herstellerangaben	Carl Roth GmbH + Co. KG
LB (Luria/Miller) Medium (LB-Medium)	Nach Herstellerangaben	Carl Roth GmbH + Co. KG
M9Glu-Minimalmedium	10 % M9-Salze (10x), 1 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,1 mM CaCl ₂ , 0,2 % Glucose	Eigenherstellung
Müller-Hinton-Bouillon (MH-Medium)	Nach Herstellerangaben	Carl Roth GmbH + Co. KG
SOB-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 8,56 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ (Green/Sambrook 2012, S. 1823, Band 3)	Eigenherstellung
SOC-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 8,56 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glucose (Green/Sambrook 2012, S. 1823, Band 3)	Eigenherstellung
Standard-Nährmedium I (NI-Medium)	Nach Herstellerangaben	Carl Roth GmbH + Co. KG

8.1.11 Geräte und sonstige Materialien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Geräte und sonstige Materialien, wie Verbrauchsmaterialien, die neben der normalen Laborgrundausrüstung genutzt wurden, sind in Tabelle 8.1–11 mit ihrer genauen Bezeichnung aufgeführt.

Tabelle 8.1–11: Verwendete Geräte und sonstige Materialien

Gerät / Material	Bezeichnung	Hersteller
Autoklaven	Systec 3870 ELV	Systec GmbH & Co. KG
	Systec Mediaprep® Typ 2540	Systec GmbH & Co. KG
	Systec VX-95	Systec GmbH & Co. KG

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

Brutschränke	Heraeus Function Line B12	Heraeus Holding GmbH
	Heraeus Function Line B20	Heraeus Holding GmbH
Codierplättchen für Kryo-Röhrchen	Codierplättchen, für CryoPure Röhren, weiß	Sarstedt AG & Co. KG
Einmalspritzen	HSW HENKE-JECT® 5 mL (6 mL) Luer	Henke-Sass, Wolf GmbH
	HSW HENKE-JECT® 10 mL (12 mL) Luer	Henke-Sass, Wolf GmbH
	HSW HENKE-JECT® 20 mL (24 mL) Luer	Henke-Sass, Wolf GmbH
Elektrophoresekammern mit zugehörigen Kämmen	ComPhor Midi (100 mL Gele)	Bioplastics BV
	ComPhor Mini (50 mL Gele)	Bioplastics BV
	PerfectBlue™ Mini S, horizontales Minigelsystem	VWR (PEQLAB Biotechnologie GmbH)
	PerfectBlue™ Mini L „Revolution“, horizontales Minigelsystem mit Pufferrezirkulationssystem	VWR (PEQLAB Biotechnologie GmbH)
Elektrophoresenetzgeräte (Spannungsgeber)	CONSORT E122	Consort BVBA
	CONSORT E143	Consort BVBA
	PEQLAB EV231 Electrophoresis Power Supply	VWR (PEQLAB Biotechnologie GmbH)
	Whatman Biometra® PS 304 Electrophoresis Power Supply	Analytik Jena GmbH (Biometra GmbH, Whatman GmbH)
Elektroporationsgerät	Pulse Controller II und Gene Pulser® II	Bio-Rad Laboratories GmbH
Elektroporationsküvetten	Kurze Elektrode, 1 mm Spaltbreite	VWR (PEQLAB Biotechnologie GmbH)
Eppendorf-Gefäße	PCR-Einzelgefäß mit flachem Deckel, Multiply®-Pro, 0,2 mL, Biosphere® plus	Sarstedt AG & Co. KG
	PCR-Einzelgefäß mit flachem Deckel, Multiply®-Pro, 0,5 mL, Biosphere® plus	
	SafeSeal Reagiergefäß, 1,5 mL, mit anhängendem Deckel mit Haltenocken, Biosphere® plus	
	SafeSeal Reagiergefäß, 1,5 mL, mit anhängendem Deckel mit Haltenocken, PCR Performance Tested	
	SafeSeal Reagiergefäß, 2 mL, mit anhängendem Deckel mit Haltenocken, PCR Performance Tested	
	SafeSeal Reagiergefäß, 5 mL, mit anhängendem Deckel, PCR Performance Tested	
Falcon®-Röhrchen	Schraubröhren 15 mL und 50 mL (Spitzboden & Spitzboden mit Stehrand)	Sarstedt AG & Co. KG
Flaschenaufsatzdispenser	Dispensette® Organic Digital, Easy Calibration, 1-10 mL	BRAND GmbH + Co. KG
Gelbanden-Ausstanzer	X-TRACTA Tips, 6,5 x 1 mm	Biozym Scientific GmbH
Geldokumentationssysteme	BioDocAnalyze mit Transilluminator Ti5 und CCD-Kamera XC-ST50	Analytik Jena GmbH (Biometra GmbH)
	Bio-Vision 1500 mit CCD-Kamera und CN-1500 Darkroom	Vilber Lourmat Deutschland GmbH

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

	UVP GelSolo (Imager und Darkroom)	Analytik Jena GmbH
Glasperlen	Glasperlen für Glycerinkulturen (Kryokonservierung), farbecht, opak, bunt, 2,5 mm	Bastelbedarf, z. B. KNORR prandell Creative GmbH
Glasstäbe	Glasstäbe zum Ausstreichen, sterilisiert	Glasbläserei Universität Hamburg
Heißluft-Sterilisator	Heraeus Instruments Wärmeschrank T 6030	Heraeus Holding GmbH
Klebefolie für Mikrotiterplatte RT-qPCR	Verschlussfolie für RT-qPCR Folie, <i>DNase-/RNase</i> -frei, Polyolefin (PO), transparent, geeignet für die qPCR, selbstklebend (# 95.1994)	Sarstedt AG & Co. KG
Kolbenhubpipetten	Gilson® PIPETMAN® Classic P2, 0,2-2 µL Pipette	Gilson, Inc.
	Gilson® PIPETMAN® Classic P20, 2-20 µL Pipette	Gilson, Inc.
	Gilson® PIPETMAN® Classic P100, 10-100 µL Pipette	Gilson, Inc.
	Gilson® PIPETMAN® Classic P200, 20-200 µL Pipette	Gilson, Inc.
	Gilson® PIPETMAN® Classic P1000, 100-1000 µL Pipette	Gilson, Inc.
Kryo-Röhrchen	CryoPure Röhre 2,0 mL mit QuickSeal Schraubverschluss	Sarstedt AG & Co. KG
Küvetten	Einmal-Küvetten 1,5 mL halbmikro	VWR, Brand GmbH & Co. KG
Luminometer	Mithras LB 940	Berthold Technologies GmbH & Co. KG
Magnetrührer	Heidolph MR 3001 (mit Heizplatte)	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG
	IKA® RCT basic (mit Heizplatte)	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Mikrotiterplatten für MHK	Zellkulturplatte Rundboden U-Form, steril mit Deckel	Sarstedt AG & Co. KG
Mikrotiterplatte für Mithras-Messung (Lumineszenz)	Zellkulturplatte MicroWell™, Flachboden, steril mit Deckel, Nunclon™ Delta Oberflächenbehandlung, weiß (# 136101)	Thermo Scientific™
Mikrotiterplatten für oCelloScope™	Zellkulturplatte MicroWell™, Flachboden, steril mit Deckel, Nunclon™ Delta Oberflächenbehandlung (Nunc 167008)	VWR, Thermo Scientific™
Mikrotiterplatte für RT-qPCR	MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, 0.1 mL	Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific, Inc.
Mikrovolumen-Spektralphotometer	NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Inc.
	NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Mikrowelle	Bomann® CB 1253	Bomann GmbH
oCelloScope™	oCelloScope35BD	BioSense Solutions ApS
Petrischalen	Transparent mit Entlüftungsnocken	Sarstedt AG & Co. KG

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

pH-Meter	inoLab® pH 7110 mit SenTix® 81 Präzisions- elektrode inkl. Temperaturfühler	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (WTW))
	inoLab® pH Level 1 mit SenTix® 81 Präzisions- elektrode inkl. Temperaturfühler	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (WTW))
Photometer	Agilent Cary 100 UV-Vis Spectrophotometer	Agilent Technologies, Inc.
	Varian Cary® 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer	Agilent Technologies, Inc. (Varian, Inc.)
Pipettenspitzen	10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen, gesteckt	Biosphere® plus (20 µL, 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettenspitzen mit Filter	Filterspitze Biosphere® plus (10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt AG & Co. KG
Pipettierhelfer	neoPipetta D-6019	neoLab Migge GmbH
Pyrosequencer	PSQ 96MA	Biotage, jetzt: QIAQEN GmbH
<i>real-time</i> PCR-Gerät	Applied Biosystems® ViiA™ 7 Real-Time PCR System	Life Technologies Corporation
Reinstwasseranlagen	Millipore RiOs™ 5	Merck KGaA
	Milli-Q® Reference A+ System	Merck Millipore
Schüttelinkubatoren	C25 Incubator Shaker Classic Series	Eppendorf SE (New Brunswick Scientific Co., Inc.)
	CERTOMAT® IS	Sartorius AG (Sartorius Stedim Biotech GmbH)
	CERTOMAT® R mit Inkubationshaube CERTOMAT® H	Sartorius AG (B. Braun Biotech International GmbH)
	VWR Incubating Orbital Shaker, Model 3500I	VWR, Avantor
Sequenzier	GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System DNA-Sequenzier	Beckman Coulter, Inc.
Sicherheitswerkbänke	HERAguard HPH 12	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Heraeus Holding GmbH, Kendro Laboratory Products GmbH)
	HERAsafe HS 12, Klasse 2, Typ H	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Heraeus Holding GmbH, Kendro Laboratory Products GmbH)
	HERAsafe HSP 12, Klasse 2, Typ H	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Heraeus Holding GmbH, Kendro Laboratory Products GmbH)
	HERAsafe HSP 18, Klasse 2, Typ H	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Heraeus Holding GmbH, Kendro Laboratory Products GmbH)

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

Skalpell	Cutfix®, steriles Einmalskalpell	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG
Sterile Impfösen	Einmal-Impfösen, flexibel, 10 µL	VWR, Avantor
Sterilfilter	Spritzenvorsatzfilter Minisart® 0,20 µm	VWR, Sartorius AG
Thermocycler	Biometra® T3	Analytik Jena GmbH (Biometra GmbH)
	Biometra® T Personal	Analytik Jena GmbH (Biometra GmbH)
	Biometra® T Gradient	Analytik Jena GmbH (Biometra GmbH)
	Biometra® T Professional	Analytik Jena GmbH (Biometra GmbH)
	Primus 25 advanced®	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Thermomixer	Mixing Block MB-102 (40 x 1,5 mL)	Hangzhou Bioer Technology Co., Ltd. (BIOER)
Ultratiefkühlshränke (-80 °C)	HERAfreeze HFU 486 Basic	Thermo Fisher Scientific, Inc. (Heraeus Holding GmbH, Kendro Laboratory Products GmbH)
	High Efficiency Freezer, Ultra-Low Temperature, U410 HEF™	Eppendorf SE (New Brunswick Scientific Co., Inc.)
	Profiline Taurus PLTA 0986	National Lab GmbH
Verschlussfolie	Parafilm® „M“ PM-996	Bemis Company, Inc.
Videodokumentationsanlage	ProViDoc® mit CabUVIS Analysenlampe mit Dunkelhaube und Kamera	DESAGA Technology, Sarstedt-Group
Vortexer	REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.
Waagen	Analysenwaage Sartorius A200S	Sartorius AG
	Analysenwaage VWR® Science Education LA 124i	VWR, Avantor
	Präzisionswaage Navigator™ bis 2100 g	OHAUS® Europe GmbH
	Präzisionswaage PLJ 2100-2M	KERN & SOHN GmbH
Wasserbäder	Julabo MWB	JULABO GmbH
	Julabo SW23 (Schüttelwasserbad)	JULABO GmbH
Zentrifugen (Rotoren)	Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH
	Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH
	Biofuge Stratos (#3046)	Heraeus Holding GmbH
	Centrifuge 5804 R (Rotor F-45-30-11 und Rotor A-4-44)	Eppendorf SE
	Heraeus Pico 21	Heraeus Holding GmbH
	MC 6 Centrifuge (Tischzentrifuge)	Sarstedt AG & Co. KG
	Microfuge 16	Beckman Coulter GmbH
	Minifuge T	Heraeus Holding GmbH
	PerfectSpin P (Plattenzentrifuge)	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Pico 17 Centrifuge	Heraeus Holding GmbH	

	ScanSpeed 1524M	LaboGene™ / LMS Consult GmbH & Co. KG
	Spectrafuge Mini C1301-T-230V (Tischzentrifuge)	Labnet International, Inc.
	Sprout® Mini Centrifuge (Tischzentrifuge)	Heathrow Scientific®
	Tischzentrifuge Labnet C1301-B-230V	Labnet International, Inc.

8.1.12 Software

In dieser Arbeit wurden für die Planung und Auswertung einiger Experimente neben gängiger Office-Software weitere Programme benötigt. Diese sind mit der jeweiligen Anwendung in Tabelle 8.1–12 aufgelistet.

Tabelle 8.1–12: Verwendete Software

Software	Anwendung	Hersteller
BioDocAnalyze – Imaging and Image Analysis Software, Version 2.67.7.0 (June 2015)	Dokumentation von Agarosegelen im Anschluss an die Agarose-Gelelektrophorese mit dem Geldokumentationssystem BioDocAnalyze	Analytik Jena GmbH (Biometra GmbH)
Cary WinUV Advanced Reads Application, Version 4.20(468) (Juni 2011)	Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) mit dem Photometer Agilent Cary 100 UV-Vis Spectrophotometer	Agilent Technologies, Inc.
Cary Win UV Simple Reads Application, Version 02.00(25)	Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) mit dem Photometer Varian Cary® 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer	Agilent Technologies, Inc. (Varian, Inc.)
ChemDraw Cloud, Version 21.0.3-release-44+1e92fd1c1	Zeichnen organischer Strukturformeln	PerkinElmer, Inc.
CLC Genomics Workbench 8.0.2	Datenanalyse von NGS-Sequenzierungen	QIAGEN N.V.
EndNote™ 20, RRZ-Software Universität Hamburg 3092075139	Literaturverwaltung	Clarivate™
GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System, CEQ Sequence Analysis, Version 10.0.30	Sanger-Sequenzierung mit dem GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System DNA-Sequenzier	Beckman Coulter, Inc.
HNU Basic Zitierstil für EndNote™, HNU-Basic_Harvard_Version_1-0_ens (installiert am 03.03.2021)	Zitierstil in dieser Arbeit	Timo Guter, stellvertretende Leitung der Hochschulbibliothek Neu-Ulm (Hochschule Neu-Ulm (HNU) o. J.)

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

Integrative Genomics Viewer (IGV), Version 2.9.2 vom 16.02.2021	Visualisierung von Genomdaten	Broad Institute of MIT and Harvard, UC San Diego (Robinson et al. 2011; Thorvaldsdóttir/Robinson/Mesirov 2012)
MikroWin 2000	Software zum Mithras LB 940 zur Eingabe der Messparameter und Ausgabe der RLU-Werte	Berthold Technologies GmbH & Co. KG
NanoDrop™ ND1000, Version 3.8.1	Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mit dem NanoDrop™	Thermo Fisher Scientific, Inc.
NanoDrop™ 2000/2000c, Version 1.6.198	Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mit dem NanoDrop™	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Primer Express® Software for Real-Time PCR, Version 3.0	Primer-Design für quantitative <i>real-time</i> PCR (RT-qPCR)	Applied Biosystems™
ProViDoc® – alte Software: ProViDoc® Software zur Video-Dokumentation, Version 5.6	Aufnahme der Agarplatten des <i>in-vivo</i> Funktionstests von ClpA	DESAGA GmbH, SARSTEDT-Gruppe
ProViDoc® – neue Software: argusX2®	Aufnahme der Agarplatten des <i>in-vivo</i> Funktionstests von ClpA	biostep® GmbH (DESAGA Technology, Sarstedt-Group)
PSQ Assay Design	Primer-Design für Pyrosequencing®	Biotage, jetzt: QIAGEN GmbH
PSQ PyroMark Q96 Software, Version 2.5.8.15 und 2.5.10.7	Pyrosequencing® mit dem PSQ 96MA	QIAGEN GmbH
SnapGene, Version 6.2.1	Alternativprogramm zu Vector NTI Advance™ 11.5.0 Analyse und Auswertung von Sequenzdaten	Dotmatics, Insightful Science, LLC
UniExplorer 8.1.0.7424 (RL2) und 11.0.1.8353 (RL2)	Software zum oCelloScope™ zur Eingabe der Messparameter und zur Auswertung (Ausgabe BCA-Werte)	BioSense Solutions ApS
Vector NTI Advance™ 11.5.0 (inkl. AlignX und ContigExpress)	Analyse und Auswertung von Sequenzdaten, Design und Überprüfung von Oligonukleotiden, Restriktionsanalysen, Analyse und Dokumentation von Plasmiden	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc.
ViiA™ 7 Software for the Applied Biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR System, Software Base Version 1.1	Software zum <i>real-time</i> PCR-Gerät ViiA™ 7 zur Eingabe der Messparameter und Ausgabe der Ct-Werte	Life Technologies Corporation
VisionCapt, Version 15.08	Dokumentation von Agarosegelen im Anschluss an die Agarose-Gelelektrophorese mit dem Geldokumentationssystem Bio-Vision 1500	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
VisionWorks® Acquisition and Analysis Software, Version 9.0.19172.10747	Dokumentation von Agarosegelen im Anschluss an die Agarose-Gelelektrophorese mit dem Geldokumentationssystem UVP GelSolo	Analytik Jena GmbH

8.2 Methoden

8.2.1 Arbeiten mit Bakterien

8.2.1.1 Lagerung und Kultivierung der Bakterienstämme

8.2.1.1.1 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden die Bakterienstämme auf LB-Agarplatten, welche, sobald es aufgrund von Plasmid tragenden Zellen nötig war, mit Antibiotika zur Selektion versetzt wurden, vereinzelt. Diese Einzelkolonien wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und als Ausgang für alle weiteren anschließenden Experimente verwendet. Außerdem wurde zur Erstellung einer Dauerkultur der Stamm in einem Kryo-Röhrchen konserviert (vgl. Kapitel 8.2.1.1.3). Aus dieser Kultur konnte der Bakterienstamm jederzeit reaktiviert werden, indem er ebenfalls auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C bzw. 37 °C bebrütet wurde. Falls der Stamm ein Selektionsantibiotikum benötigt, wurde am Folgetag darauf überimpft.

Nach einem Zeitraum von circa 4 Wochen wurden die im Kühlschrank gelagerten Stämme auf eine frische Agarplatte passagiert. Spätestens nach der zweiten Passage wurden die Bakterienstämme für die weiteren Versuche erneut frisch aus der Dauerkultur ausgeimpft.

8.2.1.1.2 Anzucht und Zellernte

Die Anzucht der Bakterien erfolgte entweder über Nacht, als sogenannte Übernachtskultur (ÜNK), oder über Tag als Tageskultur. In einem Reagenzglas mit Deckel, welches zuvor mit 3 mL LB-Medium gefüllt und autoklaviert wurde, wurde eine Einzelkolonie mit einem sterilen Glasstab eingerührt. Falls notwendig, wurde dem Medium noch ein Antibiotikum zur Selektion zugesetzt. Je nach Stamm wurde die ÜNK bei 30 °C bzw. 37 °C unter Schütteln mit 130 rpm für 16h inkubiert. Für einige Methoden, wie zum Beispiel der Isolierung von Plasmid-DNA (vgl. Kapitel 8.2.2.1.2 & 8.2.2.1.3), wurde die Übernachtskultur nach der Inkubation direkt verwendet. Für eine Tageskultur diente die ÜNK als Vorkultur. Dazu wurde die Übernachtskultur am Folgetag in einem Erlenmeyerkolben mit frischem Medium, je nach Bedarf eventuell mit Antibiotikazusatz, 1:100 verdünnt und erneut bei 30 °C bzw. 37 °C unter Schütteln bei 130 rpm inkubiert. Bei Erreichen der gewünschten Wachstumsphase, gemessen an der optischen Dichte bei 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$), erfolgte die Zellernte. Dazu wurden die Zellen beispielsweise bei 5500 rpm (bzw. 5000 rpm unter Verwendung des Rotors A-4-44 der Centrifuge 5804 R der Firma Eppendorf SE) bei 4 °C für fünf Minuten abzentrifugiert.

8.2.1.1.3 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung dient der langfristigen und sicheren Aufbewahrung der Bakterienstämme als Reinkulturen. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C und garantiert die genetische Stabilität. Auch das Überleben nach einer langen Zeitperiode über Jahre wird gewährleistet. Diese Gefrierkulturen, oder auch Glycerinkulturen genannt, wurden in speziellen 2 mL Schraubdeckelgefäßen (Kryo-Röhrchen) angelegt. Zuvor wurde eine Mischung (Gesamtvolumen 900 µL) aus 639 µL Standard-Nährmedium I (NI-Medium) und 261 µL Glycerin ≥ 99,5 % in jedes Kryo-Röhrchen, welches mit circa 10 bis 15 Glasperlen bestückt wurde, vorgelegt. Nach dem Autoklavieren waren die Röhrchen soweit vorbereitet, dass sie mit 100 µL einer ÜNK des zu konservierenden Bakterienstammes angeimpft werden konnten. Nach kurzem Durchmischen wurden die Kryo-Röhrchen für eine Dreiviertelstunde bei Raumtemperatur unter der Sicherheitswerkbank inkubiert, sodass die Bakterien sich akklimatisieren und an die Glasperlen anlagern konnten. Anschließend wurde das Mediengemisch vollständig abpipettiert und das Kryo-Röhrchen bei -80 °C, unter Dokumentation der genauen Position, bis zur erneuten Verwendung eingefroren. Zum Reaktivieren eines gewünschten Bakterienstammes aus der Glycerinkultur, wurde mit einer sterilen Impföse unter der Sicherheitswerkbank eine Glasperle aus dem Kryo-Röhrchen entnommen und auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Nach der Inkubation über Nacht bei 30 °C bzw. 37 °C, je nach Stamm, bzw. falls notwendig nach einem Überimpfen einer Einzelkolonie auf eine antibiotikahaltige Agarplatte zu Selektionszwecken, konnten die entstandenen Bakterienkolonien für nachfolgende Experimente genutzt werden.

8.2.1.2 Bestimmung der Lebendkeimzahl (KBE-Bestimmung)

Die Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) dient der Bestimmung der Lebendkeimzahl und trennt somit die toten Zellen einer Bakteriensuspension, die beispielsweise bei der Messung der optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$ Messung) mit erfasst werden, ab. Zur Bestimmung wurde eine Bakterien-suspension, je nach erwarteter Zellzahl, stufenweise je 1:10 in physiologischer/isotonischer Natriumchloridlösung verdünnt. Von den letzten drei Verdünnungsstufen, z. B. 10^{-7} bis 10^{-9} , wurden je 50 µL auf einem einzelnen Drittel einer LB-Agarplatte (bei Bedarf inklusive Selektionsantibiotikum) pipettiert und gleichmäßig verteilt. Nach der Inkubation über Nacht wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die niedrigste Verdünnungsstufe, die gerade gut auszählbar (15-150 Kolonien) war, dies reduziert weitere Verdünnungsfehler, wurde zur Berechnung verwendet. Die Lebendkeimzahl wird als KBE pro Milliliter (KBE/mL) bestimmt und mit folgender Formel 8.2–1 berechnet:

$$KBE/mL = \frac{\text{Koloniezahl}}{\text{Verdünnungsstufe} \times \text{aufgetragenes Volumen [mL]}}$$

Formel 8.2–1: Bestimmung der Lebendkeimzahl (KBE/mL)

8.2.1.3 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist definiert als die niedrigste Konzentration einer antibakteriell wirksamen Substanz, die unter festgelegten Bedingungen gerade noch ein sichtbares Bakterienwachstum verhindert oder die zu einer starken Abnahme des Wachstums im Vergleich zu der nächstniedrigeren Konzentration führt. Die Ermittlung dieser MHK richtet sich nach den allgemeinen Vorgaben und Standards des CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) und wurde nach dem Verfahren der Mikrodilution durchgeführt (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2018).

Zur Bestimmung der MHK (Angabe in $\mu\text{g}/\text{mL}$) mittels Mikrodilutionsverfahren wurden Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Anordnung 8x12), welche einen runden Boden aufzeigten, verwendet. Zuerst wurde mit dem zu testenden Antibiotikum aus einer höher konzentrierten Stammlösung eine geometrische Verdünnungsreihe in Müller-Hinton-Medium mit einem Verdünnungsfaktor von zwei erstellt. Zu beachten galt, dass diese Konzentrationen doppelt so hoch vorbereitet wurden, da durch den anschließenden Zusatz der Bakteriensuspension eine 1:1 Verdünnung erfolgte und die zu testenden Endkonzentrationen erreicht wurden. Von jeder Verdünnungsstufe wurden jeweils 50 μL entsprechend in die Vertiefungen der Reihen 1-11 vorgelegt. Die Reihe 12 diente als Wachstumskontrolle des zu testenden Bakterienstammes, sodass dort 50 μL des reinen Müller-Hinton-Mediums ohne Antibiotikum verwendet wurden. Die so vorbereiteten Mikrotiterplatten konnten anschließend mit einer Bakteriensuspension inokuliert werden. Dazu wurden Kolonien des zu testenden Stammes einer frischen Agarplatte oder einige Mikroliter einer ÜNK des Stammes in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, bis eine Trübung entstand, die dem Standard McFarland 0,5 entsprach. Die so eingestellte Bakteriensuspension enthielt ca. 10^8 KBE/mL. Anschließend wurde diese Bakteriensuspension in zwei Schritten insgesamt 1:100 in Müller-Hinton-Medium verdünnt und diente so als Inokulum mit 10^6 KBE/mL. Zur zusätzlichen Kontrolle, dass die Suspension auf die richtige Zellzahl eingestellt wurde, erfolgte im Anschluss eine KBE-Bestimmung (vgl. Kapitel 8.2.1.2) des Inokulums. Je 50 μL der auf 10^6 KBE/mL verdünnten Bakteriensuspension wurden in die Reihen A-H pipettiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit dem zugehörigen Deckel verschlossen und für 16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach der Inkubationszeit die visuelle Auswertung, bei der die Wachstumsstärke in jeder Vertiefung im Verhältnis zur Wachstumskontrolle vergleichend festgehalten wurde.

Modifikationen dieses Standardprotokolls:

Falls sich nach dieser oben beschriebenen klassischen Konzentrationsabstufung die MHK-Werte zwischen zwei zu testenden und zu vergleichenden Stämmen nur gering unterschieden, wurde um diesen Konzentrationsbereich des Antibiotikums herum eine feinere Abstufung vorgenommen und von dem Verdünnungsfaktor von zwei abgewichen.

8.2.1.4 Wachstumsversuche mit dem oCelloScope™

Zur näheren Charakterisierung der Bakterienstämme wurde im Rahmen dieser Arbeit neben der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration auch das Wachstumsverhalten betrachtet. Dazu wurde das oCelloScope™ von der Firma BioSense Solutions ApS genutzt (BioSense Solutions ApS o. J.). Es handelt sich dabei um ein Instrument, welches mit einer automatisch positionierbaren Kamera über einzelne Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (6-96 Kavitäten sind möglich einzustellen) fährt und dabei stark vergrößerte Aufnahmen der Bakterien einer Zellsuspension in einem auswählbaren Zeitintervall erstellt und diese mithilfe der integrierten Software auswertet. Das oCelloScope™ wird für eine Messung in einen Brutschrank gestellt, sodass das Wachstumsverhalten je nach gewünschter Inkubationstemperatur aufgezeichnet werden kann. Für diese Messungen werden jedoch spezielle Mikrotiterplatten benötigt. Dabei ist darauf zu achten, dass eine derartige verwendet wird, die zum einen flache Böden in den einzelnen Vertiefungen aufweist, im Unterschied zu den Mikrotiterplatten mit runden Böden für die MHK-Bestimmung, und zum anderen von den Ausmaßen im oCelloScope™ gespeichert ist, damit die Kamera die genaue Position mittig über den einzelnen Vertiefungen ansteuern kann und nicht das sich nicht ändernde Wachstumsverhalten des Kavitätenrandes dokumentiert.

Standardmäßig wurden für diese Messungen zuerst Übernachtskulturen der zu vermessenen Bakterienstämme angelegt. Am Folgetag wurden diese in drei Schritten jeweils 1:10 insgesamt auf ca. 10^6 Zellen verdünnt, sofern davon ausgegangen werden konnte, dass die ÜNK eine Zelldichte von ca. 10^9 KBE/mL aufwies. Falls einige Stämme über Nacht nicht so kräftig angewachsen waren, wurde zuerst in physiologischer Kochsalzlösung mit dem Standard McFarland von 0,5 eine Zellzahldichte von ca. 10^8 KBE/mL eingestellt und diese Zellsuspension anschließend in zwei weiteren Schritten in LB-Medium auf ca. 10^6 KBE/mL als Ausgangsinokulum verdünnt. Zur Kontrolle wurde zusätzlich jeweils eine KBE-Bestimmung des Inokulums durchgeführt. Je 100 μ L dieser Zellsuspension von 10^6 Zellen wurden in jeweils zwei bis drei Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, um auszuschließen, dass aufgrund von kleinen Luftbläschen in einer Kavität die Auswertung nicht möglich bzw. nur fehlerhaft ist. Dabei ist zu beachten, dass die jeweils äußeren Vertiefungen einer Mikrotiterplatte nur mit reinem Medium befüllt werden, um Messungenauigkeiten aufgrund von Verdunstungseffekten trotz farblosem, aber nicht zu 100 % abdichtenden Deckel, damit die Zellen nicht unter Sauerstoffabschluss heranwachsen, ausschließen zu können. Falls ein zu vermessender Bakterienstamm ein Plasmid trug, wurde dem LB-Medium des letzten Verdünnungsschrittes zusätzlich das zur Selektion entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Zudem wurden generell von jedem Bakterienstamm drei biologische Proben vermessen, die jeweils aus drei unabhängigen Übernachtskulturen entstanden. Im Anschluss an die Messung gibt die Software des oCelloScope™ in einer Tabelle für jeden Messzeitpunkt und jede Vertiefung der Mikrotiterplatte einen Wert für das Wachstum aus. Dieser wird anhand der

Kontraständerung, bei der der helle Bereich für reines Medium und der dunkler werdende Bereich für wachsende Bakterienzellen stehen, berechnet. Der ausgegebene Wert des gerätespezifischen Algorithmus BCA (*background corrected absorption*) kann dann, aufgetragen gegen die Zeit, in Wachstumskurven veranschaulicht werden. Außerdem können bis zu zehn verschiedene Fotos pro Messzeitpunkt aus unterschiedlichen Ebenen betrachtet werden, sodass das Wachstumsverhalten der Bakterienstämme auch optisch verfolgt bzw. nachträglich beobachtet werden kann (BioSense Solutions ApS o. J.).

8.2.1.5 *In-vivo* Funktionstest von ClpA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *in-vivo* Funktionstest für die ATPase ClpA etabliert. Dazu wurde freundlicherweise das Plasmid pRepA(1-70)GFP von Joel R. Hoskins aus der Arbeitsgruppe von Sue Wickner des National Institutes of Health (NCI), Laboratory of Molecular Biology, Maryland, USA, zur Verfügung gestellt (Hoskins/Kim/Wickner 2000). Dieses Plasmid trägt das Gen *bla*, welches für eine Serin- β -Lactamase codiert und damit eine Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika bewirkt. Somit kann das Antibiotikum Ampicillin zur Selektion genutzt werden. Zudem hat die Arbeitsgruppe von Sue Wickner ein Fusionsprotein kloniert. Die Gensequenz der Aminosäuren 1-70 des Proteins RepA wurden an die des grün fluoreszierenden Proteins GFP (*green fluorescent protein*) gekoppelt. Durch einen L-Arabinose induzierbaren Promotor P_{araB} und in Kombination mit dem L-Arabinose regulierenden Protein AraC wird die Expression des Fusionsgens reguliert (vgl. Abbildung 8.2–1). Es konnte gezeigt werden, dass die 70 Aminosäuren von RepA als Erkennungssequenz ausschließlich für ClpA dienen und dass das Fusionsprotein spezifisch von der Protease ClpAP und nicht von der Protease ClpXP degradiert wird (Hoskins/Kim/Wickner 2000).

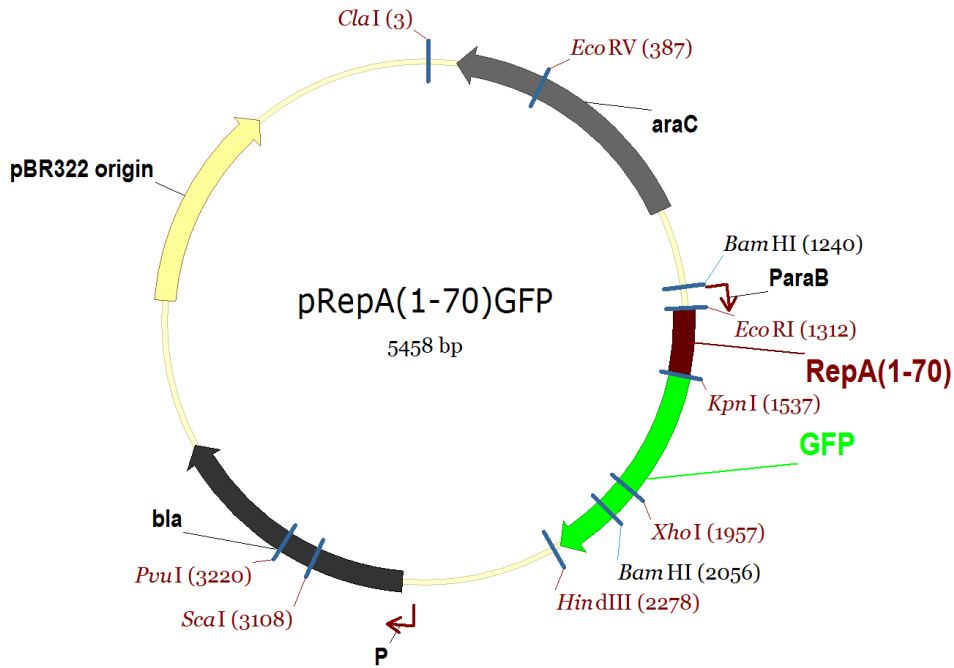


Abbildung 8.2–1: Plasmidkarte von *pRepA(1-70)GFP* für den *in-vivo* Funktionstest von *ClpA*

Das 5458 bp große Plasmid *pRepA(1-70)GFP* ist ein *pBR322*-Derivat und besitzt daher denselben origin of replication (*pMB1*) (als hellgelber Blockpfeil dargestellt). Es trägt das Gen *bla* (schwarzer Blockpfeil), welches für eine Serin β -Lactamase codiert und das Gen *araC* (dunkelgrauer Blockpfeil), welches für das L-Arabinose regulierenden Protein AraC codiert. In Kombination mit dem L-Arabinose induzierbaren Promotor P_{araB} wird die Expression des Fusionsgens aus den N-terminalen 70 Aminosäuren des Replikationsinitiatorprotein RepA (dunkelroter vorderer Bereich des Blockpfeils) mit GFP (green fluorescent protein) (hellgrüner hinterer Bereich des Blockpfeils) reguliert. Ein Promotor (P) ist jeweils als kleiner dunkelroter Pfeil symbolisiert. Die Restriktionsendonukleasen (*ClaI*, *EcoRV*, *EcoRI*, *KpnI*, *XhoI*, *HindIII*, *ScaI*, *PvuI*) sind in dunkelrot dargestellt, sobald sie nur eine Erkennungssequenz im Plasmid aufweisen und in schwarz, wenn mindestens zwei Erkennungssequenzen vorliegen, wie bei *BamHI*. Die Zahlen in den Klammern beschreiben die Position der Erkennungssequenz im Plasmid.

Für den *in-vivo* Funktionstest von *ClpA* in dieser Arbeit wurden die zu testenden Bakterienstämme mit dem Plasmid *pRepA(1-70)GFP* transformiert (vgl. Kapitel 8.2.2.8.1) und auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten selektiert. Zur Durchführung des Funktionstests, der auf die Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, optimiert wurde, wurden diese Stämme anschließend auf LB-Agarplatten, die 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin zur Selektion enthielten und 2 % L-Arabinose zur Induktion des Promotors des Fusionsgens, ausgestrichen. Die Bakterienstämme wurden für 48 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Auswertung des *in-vivo* Funktionstests von *ClpA* wurden die Bakterienstämme auf den Agarplatten zur Anregung der Fluoreszenz von GFP unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm in der ProViDoc® Apparatur fotografiert. Sobald *ClpA* intakt war, erfolgte ein Abbau des GFP-Fusionsproteins durch die Protease *ClpAP* und die Bakterienkolonien fluoreszierten in diesen Bakterienstämmen nicht. Aber wenn eine Mutation im Gen *clpA* zu einem Funktionsdefekt führte, fluoreszierten die Kolonien dieser Bakterienstämme grün (vgl. Abbildung 8.2–2). Als Referenz dienten die Mutanten *E. coli* MIII (GK 574) mit funktionsfähigem *ClpA* und dementsprechend einem GFP-Abbau (= keine grüne Fluoreszenz) und *E. coli* MIVa (GK 575), bei dem eine Mutation im Gen *clpA* zum Funk-

tionsausfall führt, sodass GFP nicht abgebaut werden kann und die Kolonien dieser Mutante grün fluoreszieren.



Abbildung 8.2–2: Vergleich der Fluoreszenzintensität der Mutanten *E. coli* MIII pRepA(1-70)GFP (links) mit *clpA* in Wildtypform und *E. coli* MIVa pRepA(1-70)GFP (rechts) mit einer Mutation in *clpA*, die zum Funktionsausfall führt. Aufnahme vom 26.04.2019 in der ProViDoc® unter UV-Licht (366 nm), nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C auf 2 % L-Arabinose.

8.2.1.6 Bestimmung des Superspiralisierungsgrades über den Qsc-Wert

Zur weiteren Charakterisierung der einzelnen Bakterienstämme und ihren verwandten CRISPR-Mutanten wurde der Superspiralisierungsgrad der DNA bestimmt. Als Maß galt der *Quotient of supercoiling* (Qsc) (Bagel et al. 1999). Dabei wird die spezifische Aktivität der Promotoren der Gene *topA* und *gyrA* ins Verhältnis gesetzt (vgl. Formel 8.2–2). *topA* codiert für die DNA Topoisomerase I und *gyrA* für die A-Untereinheit der Gyrase. Es handelt sich um die Gegenspieler der DNA-Superspiralisierung. Die Veränderungen des Superspiralisierungsgrades bzw. des Quotienten wurden anhand eines Reportersystems, welches von Mobarak Abu Mraheil etabliert worden war, ermittelt (Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013).

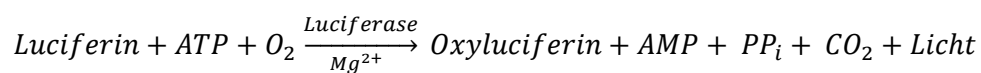
$$Q_{sc} = \frac{\text{spezifische Aktivität von } p_{topA}}{\text{spezifische Aktivität von } p_{gyrA}}$$

Formel 8.2–2: Bestimmung des Superspiralisierungsgrades über den Qsc (Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013)

Das Reportersystem verwendet das Gen *luc* aus dem Plasmid pGEM®-*luc* von Promega (Promega Corporation 2017). Das Gen *luc* codiert dabei für die Luciferase des nordamerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (Ow et al. 1986). Die beiden verwendeten Plasmide sind von Mobarak Abu Mraheil jeweils so konstruiert worden, dass die Promotoren der Gene *topA* (pPHB90) und *gyrA* (pPHB91)

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

upstream des *luc*-Gens den Luciferase eigenen Promotor ersetzt (Abu Mraheil/Heisig/Heisig 2013). Als Vektor diente das Plasmid pBR322. Die zu untersuchenden Stämme wurden für die Untersuchung jeweils mit den beiden Plasmiden pPHB90 bzw. pPHB91 transformiert (vgl. Kapitel 8.2.2.8). Nach Zugabe des Luciferase Assay Reagent (LAR) (Promega Corporation 2015b), welches aus Luciferin, Magnesiumkationen und ATP zusammengesetzt ist, konnte die Luciferase ihr Substrat Luciferin u. a. zu Oxyluciferin und Licht umwandeln (vgl. Formel 8.2–3). Das emittierte Licht (560 nm) ist dabei direkt proportional zu der jeweiligen Promotoraktivität.



Formel 8.2–3: Luciferase vermittelte Biolumineszenz-Reaktion (Promega Corporation 2015b)

Die Biolumineszenz konnte mithilfe des Mithras LB 940 von der Firma Berthold Technologies GmbH & Co. KG gemessen werden. Die Angabe erfolgte in *relative light units* (RLU). Nach erfolgter Normierung auf die $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$, konnte aus den beiden spezifischen Promotoraktivitäten jedes Untersuchungsstammes der Quotient Q_{sc} nach Formel 8.2–2 errechnet werden.

Methodisch wurde die Anwendung des Luciferase Assay System der Firma Promega Corporation auf die Nutzung des Mithras LB 940 und unter Verwendung in dieser Arbeit genutzter *E. coli* Stämme optimiert. Etabliert wurde diese Methode mit den bereits bekannten *E. coli* Referenzstämmen JTT1 und RS2 bzw. WT und WT-3-1. Die Mutante RS2 zeigt durch eine Mutation in *topA* eine verstärkte negative Superspiralisierung auf, wohingegen die Mutante WT-3-1 durch eine Doppelmutation in *gyrA* eine verminderte negative Superspiralisierung im Vergleich zu dem isogenen Stamm WT aufweist (Abu Mraheil 2004; Arntjen 2011). Für die Bestimmung des Superspiralisierungsgrades wurden die jeweiligen Untersuchungsstämme mit den Plasmiden pPHB90 bzw. pPHB91 in jeweils drei voneinander unabhängigen biologischen Proben betrachtet. Einzelne Übernachtskulturen wurden am Folgetag 1:100 verdünnt und in einer Tageskultur in LB-Medium mit Tetracyclin als Selektionsantibiotikum bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0,4$ bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Bei Erreichen der optischen Dichte wurden jeweils 45 µL der Probe entnommen und mit 5 µL Stabilisierungspuffer (vgl. Tabelle 8.1–9) versetzt. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gelagert. Zusätzlich wurde eine KBE-Bestimmung (vgl. Kapitel 8.2.1.2) durchgeführt. Für die anschließende Lyse wurde ein Lysispuffer frisch hergestellt (vgl. Tabelle 8.1–9). Dieser beinhaltet neben Lysozym und BSA das Cell Culture Lysis Reagent (CCLR), welches auch ein Bestandteil des Luciferase Assay System der Firma Promega Corporation darstellt. Die eingefrorenen Proben wurden im Anschluss bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 150 µL des frisch hergestellten Lysispuffers versetzt. Es erfolgte eine zehninütige Inkubation bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit wurde das Mithras LB 940 vorbereitet. Der In-

jektor wurde mit LAR (Luciferase Assay Reagent) beladen und die Parameter eingestellt, sodass das Mithras LB 940 pro Vertiefung der Mikrotiterplatte langsam 50 μL LAR injiziert, für zwei Sekunden lineare Schüttelbewegungen ausführt und anschließend unverzüglich für zehn Sekunden die Lumineszenz misst. Jeweils 10 μL der lysierten Proben wurden für die Messung in eine weiße für lumino-metrische Messungen ausgewiesene Mikrotiterplatte, welche dunkel gelagert wurde, pipettiert. Die MikroWin 2000 Software des Mithras LB 940 gibt die Ergebnisse in *relative light units* (RLU) aus. Die RLU-Werte der zuvor ungefüllten Mikrotiterplatte wurden von den Ergebnissen subtrahiert, um eine Hintergrundaktivität auszuschließen. Der dadurch korrigierte RLU-Wert wurde durch die jeweilige $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ zum Zeitpunkt der Ernte dividiert. Es ergab sich die spezifische Promotoraktivität für jeden Untersuchungsstamm jeweils für die Gene *topA* und *gyrA*. Zur Bestimmung des Qsc-Wertes wurde der Quotient aus der spezifischen Luciferaseaktivität der Bakterienstämme mit dem Plasmid pPHB90 (\triangleq *ptopA-luc*) und derjenigen mit dem Plasmid pPHB91 (\triangleq *pgyrA-luc*) gebildet (vgl. Formel 8.2–2).

8.2.2 Arbeiten mit DNA

8.2.2.1 Isolierung von DNA

Für alle Arbeiten mit DNA wurde diese zuerst aus dem Bakterium isoliert. Dazu konnte darin unterschieden werden, ob die chromosomale DNA des Bakteriums oder nur die Plasmid-DNA gewonnen werden sollte. Die einzelnen Methoden sind im Folgenden näher beschrieben. Bei der Isolierung der Plasmid-DNA im Maßstab der Minipräparation wurden zwei verschiedene Methoden angewendet, je nach benötigter Qualität und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA.

8.2.2.1.1 Isolierung von chromosomaler DNA (Koch-Methode)

Zur Isolierung der chromosomalen DNA der *E. coli* Bakterien wurde in dieser Arbeit die schnelle, qualitativ einfache, Methode herangezogen. Dazu wurden je nach Größe drei (bis fünf) Bakterienkolo-nien einer frisch bebrüteten Agarplatte mit einem sterilen Glasstab aufgenommen und in 100 μL Reinstwasser in einem kleinen (0,2 mL) Eppendorf-Gefäß resuspendiert. Im Thermocycler wurde die Suspension für 15 Minuten bei 99 °C inkubiert („aufgekocht“, daher der Name „Koch-Methode“). In diesem Schritt wurden die Bakterien durch die hohe Temperatur beschädigt und die DNA trat aus den Zellen in die Flüssigkeit über. Nach kurzem Abkühlen wurden die Zelltrümmer durch fünfminü-tige Zentrifugation bei 13000 rpm und Raumtemperatur von der DNA getrennt. Der wässrige Über-stand, welcher die DNA enthielt, wurde in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20 °C gelagert, bis die isolierte DNA für anschließende Untersuchungen verwendet wurde.

8.2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (Minipräparation)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien wurde die schnelle und nicht sehr stark aufreinigende Methode der alkalischen Lyse angewendet, wenn die erhaltene DNA nur zu Überprüfungszwecken genutzt wurde und ansonsten nicht in anschließenden Experimenten weiter eingesetzt wurde. Die Methode wurde im Jahre 1979 erstmalig von Birnboim und Doly beschrieben und beruht auf dem Prinzip, dass chromosomale DNA und Plasmid-DNA nach alkalischer Denaturierung in einer Neutralisierungsreaktion ein unterschiedliches Renaturierungsverhalten aufweisen. Die Plasmid-DNA bleibt in Lösung, wohingegen die chromosomale DNA ausgefällt wird und dadurch abgetrennt werden kann (Birnboim/Doly 1979).

Für die Plasmidisolierung wurden zunächst 3 mL einer Übernachtskultur, die mit dem für das jeweilige Plasmid entsprechenden Selektionsantibiotikum angesetzt wurde, durch Zentrifugation bei 15000 rpm pelletiert. Dabei galt darauf zu achten, dass das Medium vollständig entfernt wurde, ggf. wurde ein Waschschrift mit TE-Puffer (vgl. Tabelle 8.1–9) ergänzt. Anschließend wurde das Pellet in 100 µL kaltem (4 °C) GTE-Puffer (vgl. Tabelle 8.1–9) durch Vortexen vollständig resuspendiert. 200 µL frisch hergestellter Lyse-Puffer (vgl. Tabelle 8.1–9) wurden dazu pipettiert und nach fünfmaligem vorsichtigem Invertieren des Eppendorf-Gefäßes wurde die Probe auf Eis gestellt. Hier erfolgte durch die stark alkalische Lösung und das Detergenz SDS eine Lyse der Zellwand und die Denaturierung von sowohl chromosomaler DNA als auch Plasmid-DNA durch Brechen der Wasserstoffbrücken. 150 µL Neutralisationspuffer (vgl. Tabelle 8.1–9) wurden rasch hinzugegeben und nach zehnmal kräftigem Ausschlagen des Gefäßes, wurde die Probe für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Der enthaltene leicht saure Kaliumacetatpuffer neutralisiert den pH-Wert. Unter diesen Bedingungen renaturiert die Plasmid-DNA vollständig. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für fünf Minuten bei 15000 rpm, um u. a. die chromosomalen DNA-Bestandteile, Zelltrümmer und Proteine abzutrennen. Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und v. a. bei Wildtyp-Stämmen war eine angefügte (mehrschrittige) Phenol/Chloroform-Extraktion (vgl. Kapitel 8.2.2.3.1) wichtig, um noch vorhandene Zellbestandteile wie Proteine und hier v. a. Nukleasen zu entfernen. Zuletzt folgte die Ethanol-Präzipitation (vgl. Kapitel 8.2.2.3.2) zur Aufkonzentrierung der Plasmid-DNA. Aufgenommen wurde die Plasmid-DNA in 30 µL mit dH₂O 1:10 verdünntem EB-Puffer (Komponente des Monarch® Plasmid Miniprep Kits von NEB), welchem 200 µg/mL *RNase A* zur Elimination restlicher RNA zugesetzt waren. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Plasmid-DNA zur Kontrolle der Isolation in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt werden (vgl. Kapitel 8.2.2.4) und anschließend, falls benötigt, bei -20 °C gelagert werden.

8.2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Monarch® Plasmid-Kit (Minipräparation)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Bakterien auch im Maßstab der Minipräparation jedoch mit hohem Reinheitsgrad, welcher in anschließenden Experimenten wie z. B. der Sanger-Sequenzierung (vgl. Kapitel 8.2.2.9.1) vorteilhaft war, wurde das Monarch® Plasmid Miniprep Kit von der New England BioLabs® GmbH (NEB) eingesetzt. Diese Isolierungsmethode beruht auch auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, wurde jedoch von NEB für *E. coli* optimiert und liefert dank der Verwendung von den Silica-Matrix-Säulchen, an denen die Plasmid-DNA gebunden wird, stark konzentrierte, hochreine Isolierungsergebnisse. Die einzelnen Schritte der Isolierung erfolgten im Allgemeinen nach den Angaben in der Bedienungsanleitung des Herstellers und sind im Folgenden aufgeführt (New England Biolabs Inc. 2020c).

In der Regel wurden 1,5-3 mL einer Übernachtskultur, die für maximal 16 h bei 37 °C (Ausnahme temperatursensitive Stämme bei 30 °C) und 130 rpm in 3 mL LB-Medium mit Zugabe des entsprechenden Selektionsantibiotikums inkubiert waren, durch 30 Sekunden Zentrifugation bei 13000 rpm und bei Raumtemperatur in einem Eppendorf-Gefäß pelletiert. Diese Zellpellets wurden in 200 µL pinkfarbigem Puffer B1 (Plasmid Resuspension Buffer) durch kräftiges Vortexen resuspendiert. Dabei war es besonders wichtig alle Zellklümpchen zu lösen, um eine gute Ausbeute zu erzielen. Anschließend erfolgte die Lyse mit Zugabe von 200 µL des petrolfarbenen Puffers B2 (Plasmid Lysis Buffer). Die Probe wurde vorsichtig, damit die chromosomale DNA nicht durch Scheren ausgelöst eine spätere Kontamination darstellt, sechsmal invertiert und rasch (nach max. 1 min, damit die Plasmid-DNA nicht irreversibel denaturiert) wurden 400 µL kalter (4 °C) gelber Puffer B3 (Plasmid Neutralization Buffer) hinzugegeben. Vorsichtig wurde das Eppendorf-Gefäß so lange invertiert, bis die Probe neutralisiert war. Dies war deutlich durch den vollständigen Farbwechsel von pink zu gelb und das sich bildende weiße Präzipitat zu erkennen. Es erfolgte eine zweiminütige Inkubation bei Raumtemperatur, wobei die im Puffer B3 enthaltene *RNase A* die RNA in der Probe entfernt, angeschlossen von einem Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm für fünf Minuten. Der reine Überstand wurde im Anschluss auf die im Kit enthaltenen Säulchen pipettiert, ohne dass auch nur kleine Mengen des Präzipitats mit überführt werden. Nach Zentrifugation wurde die auf der Säulchenmembran gebundene Plasmid-DNA zuerst mit 200 µL Plasmid Wash Buffer 1 gewaschen, um restliche RNA, Proteine und Endotoxine zu entfernen. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur und einer Zentrifugation für eine Minute bei 13000 rpm, wurden 400 µL Plasmid Wash Buffer 2 auf die Säule pipettiert und erneut für eine Minute zentrifugiert. Nun wurde das Säulchen in ein neues Eppendorf-Gefäß gesetzt, ohne dabei mit der Säulenspitze den Waschdurchfluss zu berühren. Der im Kit enthaltene Elution Buffer (EB-Puffer) wurde 1:10 mit dH₂O verdünnt und 30 µL des verdünnten EB-Puffers wurden direkt mittig auf die Säulchenmembran pipettiert. Nach einer Inkubation von einer Minute wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugation für eine Minute bei 13000 rpm von der Membran eluiert

und konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden (vgl. New England Biolabs Inc. 2020c).

Modifikationen dieses Standardprotokolls:

Sollte eine größere Menge an Ausgangsmaterial verwendet werden, wurde in zwei Eppendorf-Gefäßen parallel gearbeitet, damit die Menge an zugesetztem Lyse-Puffer für die große Zellzahl ausreichend für eine effiziente Lyse war, und erst nach der Neutralisation wurden die sich durch Zentrifugation ergebenden Überstände auf einer Säule vereint.

Falls die Plasmid-DNA im Anschluss beispielsweise direkt für eine Ligation (vgl. Kapitel 8.2.2.6.2) genutzt werden sollte, konnte zur Elution im letzten Schritt des Protokolls auch reines dH₂O verwendet werden, damit die Salze des EB-Puffers nicht die Enzymreaktion der T4 DNA Ligase beeinträchtigen. Die Haltbarkeit der isolierten Plasmid-DNA verkürzte sich dadurch allerdings.

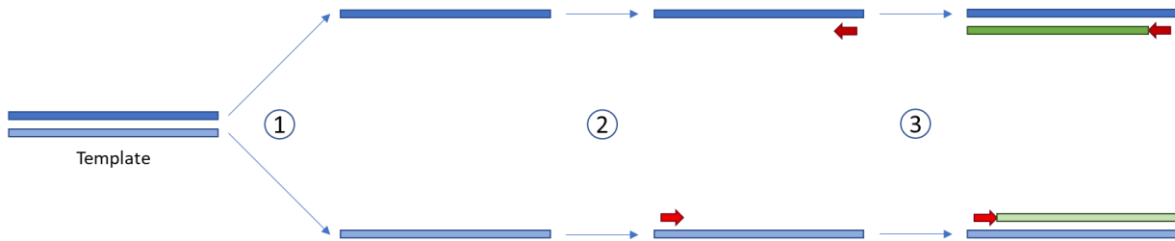
8.2.2.2 Amplifikation von DNA

8.2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

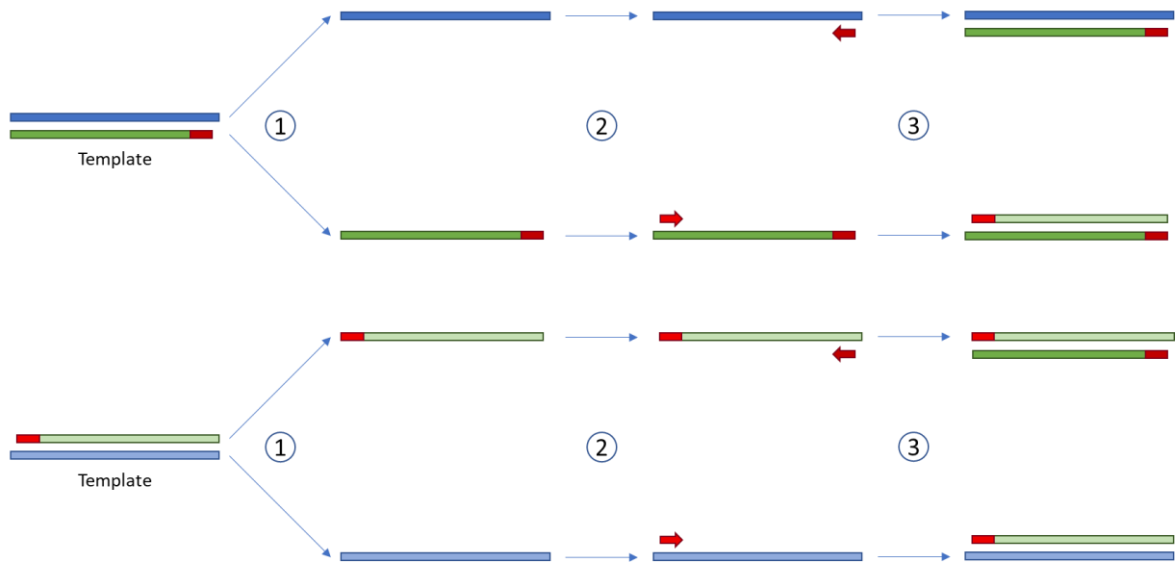
Zur gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro* wurde unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase eine molekularbiologische Methode von Saiki *et al.* optimiert und gehört seitdem zu einer sehr häufig genutzten Standardmethode: Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (Saiki et al. 1988). Ausgehend von geringen Mengen an DNA als Vorlage, dem so genannten Template, werden die gewünschten DNA-Bereiche in hoher Kopienzahl *in vitro* vervielfältigt. In dieser Arbeit fanden die hitzestabilen DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien (1) DreamTaq™ DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus*, (2) die aus der Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* weiterentwickelte Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase und (3) die rekombinante Q5® High-Fidelity DNA Polymerase Anwendung. Das Template besteht aus einem DNA-Doppelstrang und diese beiden Stränge werden in einer initialen Denaturierungsphase durch Brechen der Wasserstoffbrücken voneinander getrennt. Zu den beiden bekannten Randbereichen des gewünschten Amplifikats werden jeweils ein spezifisch bindendes Oligonukleotid, welches Primer genannt wird, entwickelt, so dass der eine Primer komplementär zum 5'-Ende des kodierenden Stranges (5'-Primer) und der zweite sogenannte 3'-Primer komplementär zum 5'-Ende des nicht kodierenden Stranges bindet und somit der 5' → 3' Sequenz des nicht kodierenden Stranges entspricht. Die freien 3'-OH Enden der Primer dienen so als Startpunkte für die DNA-Polymerasen. Die Polymerase-Kettenreaktion verläuft in drei verschiedenen, sich wiederholenden Schritten, die jeweils bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen. Ein Durchlauf dieser drei Schritte wird als Zyklus bezeich-

net und standardmäßig wurde in dieser Arbeit die PCR mit 30 Zyklen durchgeführt. Im Folgenden werden die drei Schritte genauer beschrieben und in Abbildung 8.2–3 veranschaulicht.

1. Zyklus:



2. Zyklus:



- ① Denaturierung ② Annealing ③ Elongation ➔ Primer

Abbildung 8.2–3: Schematischer Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion (nach: Thermo Fisher Scientific Inc. o. J.). Nach dem zweiten Zyklus der PCR sind 2^2 (= 4) Kopien entstanden. Nach insgesamt 30 Zyklen werden 2^{30} (= 10^9) Kopien generiert.

Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die Wasserstoffbrücken der doppelsträngigen DNA gebrochen, sodass zwei DNA-Einzelstränge vorliegen. Im allerersten Zyklus einer PCR wird diese Phase verlängert, damit die kompakte Struktur des Templates komplett aufgelöst werden kann. Dieser Schritt wird auch initiale Denaturierung genannt und dauert bis zu drei Minuten (siehe Tabelle 8.2–2, Tabelle 8.2–4 und Tabelle 8.2–6).

Im zweiten Schritt, dem Annealing, wird durch Herabsenken der Temperatur auf einen Bereich von 50-72 °C ermöglicht, dass sich die zwei Oligonukleotide spezifisch an die einzelsträngige DNA anlagern können. Dieser Schritt ist stark von der Temperatur abhängig. Je nach Sequenz (G/C-Gehalt) und Länge der Primer, besitzen diese eine individuelle Schmelztemperatur (T_M) (vgl. Formel 8.2-4). Dieser wird je nach Polymerase eine Annealing-Temperatur zugeordnet (vgl. Tabelle 8.2-2, Tabelle 8.2-4 und Tabelle 8.2-6). Wird eine höhere Temperatur gewählt, binden die Primer spezifischer an den korrekten Sequenzbereich, jedoch kann eine zu hoch eingestellte Temperatur generell die Hybridisierung der Primer verhindern, sodass kein Amplifikat synthetisiert wird. Zu beachten gilt außerdem, dass die beiden Primer eine ähnliche Schmelztemperatur besitzen, damit im PCR-Programm die eine eingestellte Annealing-Temperatur zur Hybridisierung beider Primer an die jeweilige Sequenz führt. Wird mit der näherungsweise, aus der Schmelztemperatur der Primer berechneten Annealing-Temperatur kein Fragment in der PCR amplifiziert, kann die Temperatur mithilfe eines Temperaturgradientens optimiert werden.

Als dritter Schritt, der Elongation, folgt die Synthesephase der PCR. Dabei werden durch die DNA-Polymerase die freien 3'-OH-Enden der Primer aus dem zweiten Schritt verlängert. Bei einem Temperaturoptimum der Polymerase von 72 °C synthetisiert sie in 5' → 3' Richtung in Anwesenheit freier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) einen komplementären Strang. Diese neu synthetisierte Kopie des Ausgangsstranges dient in den folgenden Zyklen ebenso als Template. Eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Bereiches wird so ermöglicht. Die Dauer der Synthesephase ist von zwei Faktoren abhängig: Zum einen von der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes und zum anderen von der eingesetzten Polymerase. Während die DreamTaq™ DNA Polymerase in einer Minute etwa 1000 Basen (= 1 kb) synthetisieren kann, besitzen die Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase und die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase eine deutlich höhere Syntheseleistung und benötigen für die gleiche Anzahl an Basen lediglich 15 bis 30 bzw. 20 bis 30 Sekunden. Ein weiterer Vorteil der beiden letztgenannten Polymerasen besteht in der als *proof reading* bezeichneten Korrekturfunktion, bedingt durch die 3' → 5' Exonukleaseaktivität. Diese beiden Polymerasen wurden daher bei der Amplifikation von Fragmenten verwendet, die zur Klonierung genutzt werden sollten. Im Anschluss an die meist 30 durchgeführten PCR-Zyklen erfolgte eine so genannte finale Elongation, damit sämtliche Amplifikate von den Polymerasen vollständig zu Ende synthetisiert werden konnten. Je nach Polymerase wurde dabei eine Zeitdauer von zwei bis zehn Minuten gewählt. Zur Überprüfung einer sauberen Amplifikation ohne Nebenprodukte wurden 5 µL jedes Ansatzes in einer Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 8.2.2.4) aufgetrennt. Auch die grundsätzlich mitgeführte Negativkontrolle, welche sämtliche Komponenten des PCR-Ansatzes enthält, außer des Templates, welches durch Wasser ersetzt wird, wurde nach Ablauf desselben Temperaturprogrammes elektrophoretisch

aufgetrennt. Nur wenn in diesem Ansatz kein Amplifikat entstanden war, konnte das gewünschte vervielfältigte DNA-Fragment für anschließende Experimente verwendet werden.

Im Folgenden sind die Standard-PCR-Ansätze der drei verwendeten Polymerasen mit ihren zugehörigen PCR-Temperatur-Programmen aufgeführt.

Tabelle 8.2–1: Standard PCR-Ansatz mit der DreamTaq™ DNA Polymerase

Komponente	Volumen (in µL)
10x DreamTaq Buffer	2,5
5'-Primer (10 µM)	0,5
3'-Primer (10 µM)	0,5
dNTP-Mix (je 2 mM)	0,625
DreamTaq™ DNA Polymerase (5 U/µL)	0,125
Template-DNA (DNA aus der Koch-Methode bzw. verdünnte Plasmid-DNA)	0,5
H ₂ O	ad 25 µL

Tabelle 8.2–2: Standard PCR-Programm mit der DreamTaq™ DNA Polymerase

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1 x
Denaturierung	95 °C	30 sec	30 x
Annealing	T _M – 5 °C	40 sec	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1 x

Die Annealing-Temperatur in einem PCR-Programm mit der DreamTaq™ DNA Polymerase berechnet sich aus der Schmelztemperatur (T_M) der einzelnen Primer abzüglich 5 °C. Bei Standardprimern bis zu einer Länge von 25 Nukleotiden, kann die Schmelztemperatur näherungsweise über die folgende Formel 8.2–4 berechnet werden (Thermo Fisher Scientific Inc. 2016a).

$$T_M = (\text{Anzahl der Primerbasen } A + T) \times 2^\circ\text{C} + (\text{Anzahl der Primerbasen } C + G) \times 4^\circ\text{C}$$

Formel 8.2–4: Berechnung der Schmelztemperatur T_M eines Standardprimers

Tabelle 8.2–3: Standard PCR-Ansatz mit der Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase

Komponente	Volumen (in µL)
5x Phusion HF Buffer*	10
5'-Primer (10 µM)	1
3'-Primer (10 µM)	1
dNTP-Mix (je 2 mM)	5

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase (2 U/μL)	0,5
Template-DNA (DNA aus der Koch-Methode bzw. verdünnte Plasmid-DNA)	1
H ₂ O	ad 50 μL

* Bei sehr GC-reichen Amplifikaten wurde der zugehörige 5x Phusion GC Buffer verwendet.

Tabelle 8.2–4: Standard PCR-Programm mit der Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	1 x
Denaturierung	98 °C	10 sec	30 x
Annealing	T _M + 3 °C	20 sec	
Elongation	72 °C	15-30 sec/kb	
Finale Elongation	72 °C	5-10 min	1 x

Die Annealing-Temperatur in einem PCR-Programm mit der Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase berechnet sich aus der Schmelztemperatur (T_M) (vgl. Formel 8.2–4) der einzelnen Primer plus 3 °C. Bei kleineren Primern kann die Annealing-Temperatur auch gleich der T_M gesetzt werden (Thermo Fisher Scientific Inc. 2016b).

Tabelle 8.2–5: Standard PCR-Ansatz mit der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase

Komponente	Volumen (in μL)
5x Q5® Reaction Buffer	5
5'-Primer (10 μM)	1,25
3'-Primer (10 μM)	1,25
dNTP-Mix (je 2 mM)	2,5
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μL)	0,25
Template-DNA (verdünnte Plasmid-DNA)	1 (0,4 ng)
H ₂ O	ad 25 μL

Tabelle 8.2–6: Standard PCR-Programm mit der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	2 min	1 x
Denaturierung	98 °C	10 sec	30 x
Annealing	T _M + 3 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	20-30 sec/kb	
Finale Elongation	72 °C	2 min	1 x

Die Annealing-Temperatur in einem PCR-Programm mit der Q5® High-Fidelity DNA Polymerase berechnet sich aus der Schmelztemperatur (T_M) (vgl. Formel 8.2–4) der einzelnen Primer plus 3 °C (New

England Biolabs Inc. o. J.-a). Zur Unterstützung der gewählten Annealing-Temperatur kann der NEB T_M Calculator verwendet werden (New England BioLabs Inc. 2020f).

8.2.2.2.2 Fusions-PCR: SOEing

Eine spezielle Form der PCR, bei der zwei Gensequenzbereiche miteinander fusioniert werden können, wendet die von Horton *et al.* beschriebene SOEing-Technik (*splicing by overlap extension*) an (Horton *et al.* 1989). Hierfür werden zunächst die beiden DNA-Fragmente, die fusioniert werden sollen, einzeln in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Zu beachten gilt hierbei, dass für die beiden Fragmente jeweils ein Standardprimer und ein sogenannter SOEing-Primer benötigt werden. Der SOEing-Primer zeichnet sich dadurch aus, dass dieser in der Sequenz eine Kombination beider Fragmente darstellt. Bei dem ersten Fragment ist der 3'-Primer der SOEing-Primer und besteht aus etwa 20 Nukleotiden des 3'-Endes des vorderen Fragmentes des späteren Fusionsproduktes und einem nicht bindenden Überhang von etwa 20 Nukleotiden, die komplementär zum 5'-Ende des zweiten Fragmentes sind. Bei dem zweiten Fragment ist der 5'-Primer der SOEing-Primer mit dem zu Fragment eins komplementären Überhang. Der 3'-Primer stellt einen konventionellen Standardprimer dar. Beide Fragmente wurden mit der PhusionTM High-Fidelity DNA-Polymerase und dem zugehörigen Standardansatz laut Tabelle 8.2–3 und Tabelle 8.2–4 synthetisiert. Im Anschluss wurden die beiden PCR-Produkte mit dem GeneJET Gel Extraction Kit von Thermo ScientificTM aus einem Agarosegel extrahiert und aufgereinigt (vgl. Kapitel 8.2.2.3.3) und die Konzentration der beiden Gelextrakte wurde in einem weiteren Agarosegel abgeschätzt (vgl. Kapitel 8.2.2.5.1). Die Fusion des vorderen Fragmentes mit dem hinteren fand durch Überlappung der 3'-Enden beider Fragmente und Elongation der freien 3'-Enden in einer ersten PCR aus 7 Zyklen statt, bei der keine weiteren Primer hinzugegeben werden und die beiden Fragmente das Template darstellen. Vor allem bei unterschiedlicher Fragmentlänge galt zu beachten, dass beide Fragmente in einem äquimolaren Verhältnis eingesetzt werden. Mit dem NEBioCalculator[®] (Version 1.13.1) von New England BioLabs[®] GmbH (NEB) (New England Biolabs Inc. 2021) kann ein molares Verhältnis von 1:1 bestimmt werden. Anschließend wurde in einer konventionellen PCR nach Zugabe der beiden Außenprimer, bei denen es sich um je einen Standardprimer aus der Reaktion der Einzelfragmente handelt, das Fusionsprodukt amplifiziert. Es folgte eine weitere Gelelektrophorese, bei der das SOEing-Produkt extrahiert und aufgereinigt wurde. Zur Vorbereitung für eine folgende Ligation (vgl. Kapitel 8.2.2.6.2) wurde in einem weiteren Agarosegel die Konzentration des Gelextraktes abgeschätzt. Zuvor bedarf es gegebenenfalls einer Behandlung mit Restriktionsendonukleasen.

Zur Veranschaulichung sämtlicher gewählter Primer und des entstehenden Fusionsproduktes, ist in Abbildung 8.2–4 eine schematische Übersicht dargestellt.

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

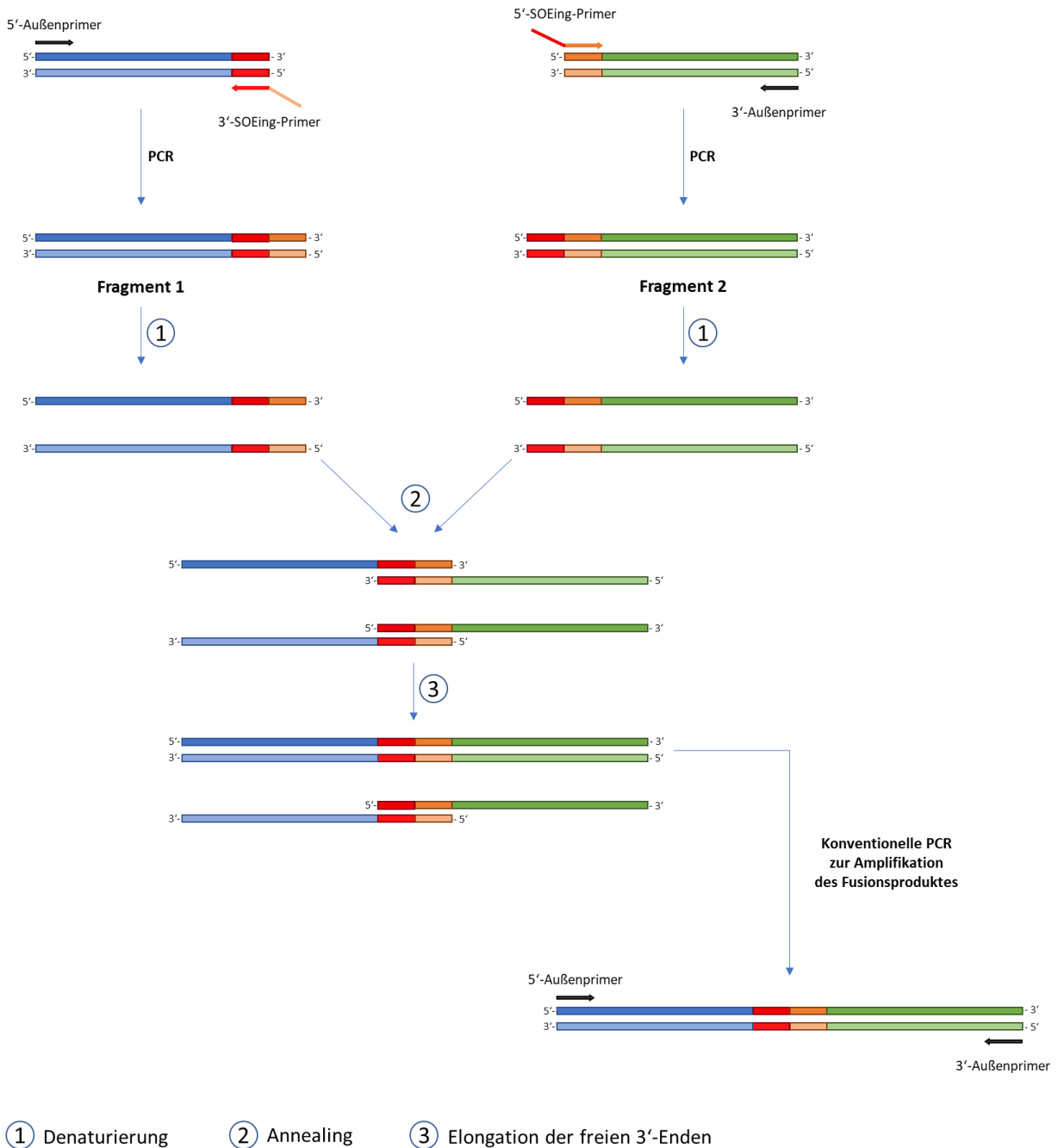


Abbildung 8.2–4: Schematischer Ablauf einer Fusions-PCR mithilfe der SOEing-Technik (nach: Hilgarth/Lanigan 2020, Figure 1; Horton et al. 1989, Figure 1).

Zuerst werden mit einer PCR die Fragmente 1 und 2 amplifiziert. Anschließend erfolgt eine Überlappungsreaktion der beiden Fragmente und eine Elongation der freien 3'-Enden. Zum Schluss wird das entstandene Fusionsprodukt in einer konventionellen Polymerase-Kettenreaktion durch Zugabe der beiden Außenprimer exponentiell vervielfältigt.

8.2.2.2.3 Inverse PCR: Round-the-horn Klonierung

Eine besondere Form der PCR, bei der als Template von Plasmid-DNA ausgegangen wird, ist die *Round-the-horn* Klonierung, eine Art inverse PCR. Diese Methode fand zum einen Anwendung in der Konstruktion bzw. Veränderung der pKDsgRNA-Plasmide (Austausch der N₂₀-Sequenz) für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/Cas9-System und zum anderen auch bei der Konstruktion eines

Plasmids zur Komplementation der *clpA*-Mutation (vgl. Kapitel 5.2 und 5.3). Im Jahre 1988 wurde die inverse PCR bereits beschrieben, um unbekannte Sequenzbereiche, die einen bekannten Sequenzabschnitt umspannen, zu analysieren (Ochman/Gerber/Hartl 1988). Dabei wurde methodisch ein Primerpaar eingesetzt, welches im Vergleich zu einer klassischen Polymerase-Kettenreaktion in entgegengesetzter Richtung zueinander bindet. Auch für die *Round-the-horn* Klonierung werden die Primer gegenläufig zueinander entworfen. Dabei enthält ein Primer die gewünschte Mutation, welche in die Plasmidsequenz eingefügt werden soll. Diese auszutauschende Sequenz (vgl. Abbildung 8.2–5, roter Bereich des 5′-Primers) wird 5′ an eine bindende Primersequenz (vgl. Abbildung 8.2–5, blauer Bereich des 5′-Primers) angefügt. Der andere Primer dazu ist universell anwendbar und bindet das Plasmid vollständig (Reisch/Prather 2017). Nach der Amplifikation mit der Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase unter Standardbedingungen (vgl. Tabelle 8.2–5 und Tabelle 8.2–6) wird der gesamte PCR-Ansatz mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* behandelt. Dieses Enzym schneidet nur methylierte DNA, sodass das Template, welches zuvor aus *Escherichia coli* isoliert wurde (vgl. Kapitel 8.2.2.1.3) und die gewünschte einzuführende Mutation noch nicht enthält, aus dem Ansatz entfernt werden konnte (vgl. Kapitel 8.2.2.6.1). Dazu wurde der mit dem Enzym behandelte Ansatz in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Fragment mit dem GeneJET Gel Extraction Kit von Thermo Scientific[™] extrahiert und aufgereinigt (vgl. Kapitel 8.2.2.3.3). Nach der Konzentrationsbestimmung des Gelextraktes in einem weiteren Agarosegel (vgl. Kapitel 8.2.2.5.1) erfolgte eine Ligation, um das lineare PCR-Produkt zu zirkularisieren. Damit die T4 DNA Ligase die beiden Fragmentenden miteinander verknüpfen konnte, benötigte sie zum Ausbilden der Phosphodiesterbindung neben dem freien 3′-OH noch eine freie Phosphatgruppe am 5′-Ende (vgl. Kapitel 8.2.2.6.2). Diese wurde über den universellen Primer eingeführt, denn es wurde ein 5′-modifizierter Primer bestellt, der eine Phosphatgruppe trug (vgl. Tabelle 8.1–3). In Abbildung 8.2–5 ist der Ablauf der *Round-the-horn* Klonierung zur besseren Nachvollziehbarkeit schematisch dargestellt.

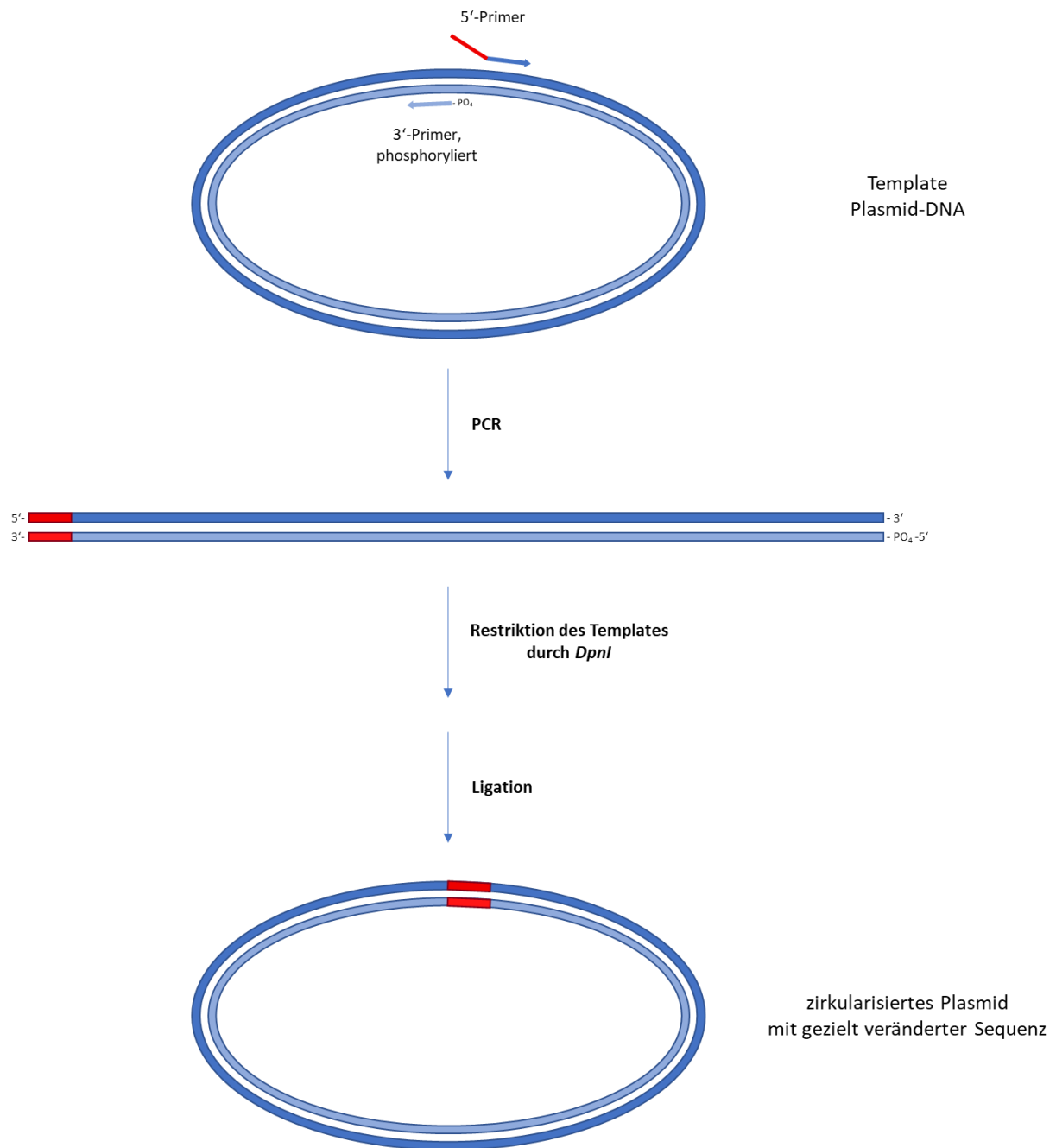


Abbildung 8.2–5: Inverse PCR: Round-the-horn Klonierung (nach: Reisch/Prather 2017, Figure 31.8.5)

Über den nicht-bindenden Bereich des 5'-Primers, der frei wählbar ist (rot dargestellt), wird die Plasmidsequenz gezielt ausgetauscht. In einer PCR mit der Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase mit diesem zusammengesetzten Primer und dem universalen 3'-Primer, der am 5'-Ende phosphoryliert vorliegt, wird ein Fragment amplifiziert, welches genauso lang wie das Plasmid groß ist. Nach der Restriktion mit *DpnI* zur Entfernung des Templates (Ursprungplasmid) und einer angeschlossenen Ligation, liegt erneut ein zirkuläres Plasmid mit der gezielte veränderten Sequenz vor.

8.2.2.2.4 Sequenzspezifische PCR: ARMS

Eine weitere spezielle Form der Polymerase-Kettenreaktion stellt die sequenzspezifische PCR dar, mit deren Hilfe bekannte Mutationen, wie Punktmutationen oder auch kleine Deletionen, im Genom nachgewiesen werden können. Im Jahre 1989 wurde diese Methode von Newton *et al.* unter dem Namen *amplification refractory mutation system* (ARMS) beschrieben (Newton *et al.* 1989). Diese

Technik beruht auf der Anwendung eines speziellen ARMS-Primers, welcher am 3'-Ende nicht hundertprozentig mit der Sequenz übereinstimmt und demnach unter entsprechenden PCR-Bedingungen kein Amplifikat liefert. Wird der Primer so gewählt, dass sein 3'-Ende genau an der Position der Mutation liegt, kann mit dieser Methode das Vorhandensein der Mutation detektiert werden. Zudem ist es wichtig eine Polymerase ohne *proof reading*-Funktion auszuwählen, wie beispielsweise der DreamTaq™ DNA Polymerase (Newton et al. 1989). Aufgrund ihrer fehlenden 3' → 5' Exonukleaseaktivität wird das Prinzip dieser sequenzspezifischen PCR erst ermöglicht (Chien/Edgar/Trela 1976). In dieser Arbeit wurde die ARMS-PCR als Screeningverfahren genutzt, um im Anschluss an die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/Cas9-System (vgl. Kapitel 8.2.2.10) die gewünschte Mutation im Gen *clpA* zu detektieren. Dazu wurde zuerst die ARMS-PCR mit einem Template, welches eine Mischung aus mehreren potenziellen richtigen Mutanten darstellte, durchgeführt, um eine schnelle Vorauswahl zu treffen. Zur Kontrolle wurde stets die PCR unter denselben Bedingungen mit dem Wildtyp (GK 571) bzw. mit *E. coli* MIII (GK 574) und mit *E. coli* MIVa (GK 575) bzw. mit der *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14 mitgeführt. Diese Kontrolle zeigte, je nachdem in welche Richtung die ARMS-PCR dabei entworfen war, dass generell nur bei dem einen Stamm ein Fragment amplifiziert wurde, wohingegen die PCR mit dem jeweils anderen Kontrollstamm als Template kein Amplifikat lieferte. Sobald die Kontrollen das erwartete Ergebnis lieferten, wurde das Screeningverfahren fortgeführt. Ausschließlich diejenigen PCR-Ansätze mit den gemischten Templates, bei denen ein PCR-Produkte amplifiziert wurde, konnten im Anschluss einzeln in einer ARMS-PCR mit den gleichen Primern untersucht werden. So konnte ein schnelles Screeningverfahren sichergestellt werden.

Methodisch wurden dazu drei verschiedene ARMS-Primer konstruiert; zwei dienten zur Detektion der *clpA* Wildtyp-Form, einmal ausgehend von *E. coli* MIVa und einmal von *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14, und der dritte diente der Erkennung der *clpA*-Mutation. Die jeweils zugehörigen Gegenprimer stellten konventionelle Standardprimer ohne Fehlpaarungen dar. Da eine einzelne Fehlpaarung am 3'-Ende des ARMS-Primers nicht komplett zuverlässig die Amplifikation verhindert (Huang/Arnheim/Goodman 1992), wurde eine weitere zusätzliche Veränderung an vorletzter Position eingefügt, wie es von Stephen Little beschrieben wurde, um das Primer-Annealing zu destabilisieren (Little 1995). Zur Kontrolle wurde die PCR stets auch mit den beiden bekannten Stämmen, der eine mit der zu detektierenden *clpA*-Mutation und der Wildtyp-Stamm ohne Mutation, durchgeführt, sodass ein fehlendes Amplifikat nicht auf den Ausfall der Polymerase-Kettenreaktion zurückgeführt werden konnte, sondern als Bestätigung der zu detektierenden Mutation galt. In der folgenden Abbildung 8.2–6 wird die ARMS-PCR beispielhaft an der Variante zur Detektion der *clpA*-Mutation schematisch dargestellt. Sämtliche verwendete Primer für die ARMS-PCR sind in Tabelle 8.1–3 im Materialteil im Kapitel 8.1.3 Oligonukleotide aufgeführt. Die verwendete

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

ten Ansätze und Programme der ARMS-PCR sind im Anschluss an dieses Kapitel aufgeführt (Tabelle 8.2–9 bis Tabelle 8.2–14).

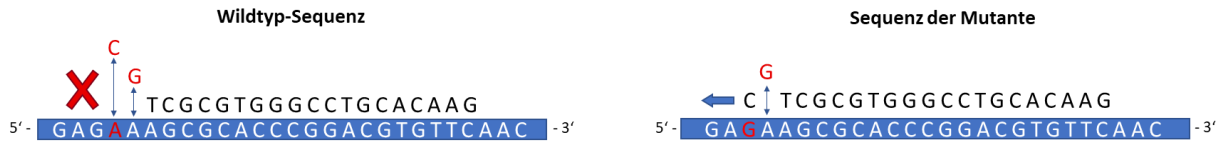


Abbildung 8.2–6: Schematische Darstellung des Prinzips der sequenzspezifischen PCR: ARMS

In Blau hinterlegt ist die Sequenz dargestellt, an der sich der Primer anlagert. Das rot markierte Nucleotid beschreibt die zu testende Mutation. Links in der Wildtyp-Sequenz liegt ein Adeninnucleotid vor und durch die Deletion dieses Nucleotids, befindet sich in der Mutante auf der rechten Seite der Abbildung an gleicher Stelle ein Guaninnucleotid (ebenfalls rot gekennzeichnet). Für die ARMS-PCR wurde ein universeller 5'-Primer verwendet (nicht dargestellt) und dazu ein 3'-Primer entwickelt, der in Schwarz über der Gensequenz dargestellt ist und als ARMS-Primer fungiert. Das letzte Primernucleotid in 5' → 3' Richtung, das C, bindet nur in der Mutante. Zur zusätzlichen Destabilisierung wurde auch das vorletzte Nucleotid in ein G getauscht, welches bei beiden Sequenzen keine Bindung zeigt. Beim Vorliegen der Wildtyp-Sequenz wird kein PCR-Produkt amplifiziert (rotes Kreuz), bei der Mutante hingegen wird das freie 3'-OH-Ende des Primers verlängert (symbolisiert durch den blauen Pfeil). (nach: Little 1995)

Das vorletzte Nucleotid des ARMS-Primers wurde zur Destabilisierung des Annealings beabsichtigt verändert, sodass es nicht weiter komplementär zur Gensequenz ist. Dies sollte den Unterschied in der Produktbildung zwischen Wildtyp und Mutante noch verstärken. Das Nucleotid wurde dabei, wie von Stephen Little beschrieben, anhand von Tabelle 8.2–7 gewählt (Little 1995, Table 9.8.1). Farblich hinterlegt sind diejenigen Nucleotidkombinationen, die für das Beispiel aus Abbildung 8.2–6 zur Detektion der *clpA*-Mutation genutzt wurden. Das vorletzte Nucleotid im ARMS-Primer ist demnach ein Guaninnucleotid (vgl. rot markiertes G in Tabelle 8.2–7 und in Abbildung 8.2–6).

Tabelle 8.2–7: Übersicht zur Auswahl der beabsichtigten Veränderung des vorletzten Nucleotids des ARMS-Primers (nach: Little 1995, Table 9.8.1)

Nucleotidpaar (mutiertes Nucleotid des codierenden Stranges & normales Nucleotid des codierenden Stranges)	Nucleotid des codierenden Stranges an vorletzter Position des Primers			
	A	G	C	T
AA	A	G	A	G
AG	C	T	A	G
AC	G	A	C	T
TT	C	T	A	G
TG	G	A	T	C oder T
TC	C	T	A	G
CC	C	T	A	G
GG	A	G	A	G

Das durch Tabelle 8.2–7 gewählte Nukleotid der vorletzten Position des Primers sorgt an dieser Stelle für eine maximale Destabilisierung zwischen dem Primer und der Gensequenz. In einzelnen Fällen kann dies dazu führen, dass auch das gewünschte Amplifikat in der ARMS-PCR nur schwach ausfällt. In dem Fall ist die Wahl eines Nukleotids, das zu einer schwächeren Destabilisierung führt, geeigneter. Der folgenden Tabelle 8.2–8 ist zu entnehmen, welche Nukleotidkombination zu welcher Destabilisierungsstärke führt (nach: Little 1995, Table 9.8.3). Für die ARMS-PCR zur Detektion der *clpA*-Wildtyp Variante, ausgehend von *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14, zeigte sich die maximale Destabilisierung als ungeeignet. Hier wurde die ARMS-PCR mit einem Primer, der an der vorletzten Nukleotidposition nur eine schwache Destabilisierung aufwies, etabliert (vgl. Kapitel 5.3.2.2.3).

Tabelle 8.2–8: Wahl des beabsichtigt veränderten Nukleotids an vorletzter Position des ARMS-Primers bei unterschiedlich starker Destabilisierung (nach: Little 1995, Table 9.8.3)

Destabilisierung	Nukleotidkombination (normales Nukleotid des codierenden Stranges & beabsichtigt verändertes Nukleotid des Primers)
maximal	GA, CT, TT
stark	CC
medium	AA, GG
schwach	CA, GT
keine	AT, GC

In den folgenden Tabellen sind die verschiedenen, jeweils verwendeten Ansätze und Programme der ARMS-PCR aufgeführt.

Tabelle 8.2–9: PCR-Ansatz der ARMS-PCR zur Detektion der CRISPR-Mutante mit der *clpA*-Mutation aus *E. coli* MIVa

Komponente	Volumen (in μL)
10x DreamTaq Buffer	2,5
5'-Primer (10 μM): <i>clpA_5_1462_EcoWT</i>	0,5
3'-Primer (10 μM): <i>clpA_3_1721_EcoMIVa_ARMS</i>	0,5
dNTP-Mix (je 2 mM)	0,625
DreamTaq™ DNA Polymerase (5 U/ μL)	0,125
DMSO (100 %)	0,75
Template-DNA (DNA der potenziellen CRISPR-Mutanten aus der Koch-Methode)	0,5
H ₂ O	ad 25 μL

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

Tabelle 8.2–10: PCR-Programm der ARMS-PCR zur Detektion der CRISPR-Mutante mit der *clpA*-Mutation aus *E. coli* MIVa

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1 x
Denaturierung	94 °C	30 sec	30 x
Annealing	72 °C	40 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1 x

Tabelle 8.2–11: PCR-Ansatz der ARMS-PCR zur Detektion der CRISPR-Mutante mit der *clpA*-Wildtyp-Variante ausgehend von *E. coli* MIVa

Komponente	Volumen (in µL)
10x DreamTaq Buffer	2,5
5'-Primer (10 µM): <i>clpA</i> _5_1462_EcoWT	0,5
3'-Primer (10 µM): <i>clpA</i> _3_1722_EcoWT_ARMS	0,5
dNTP-Mix (je 2 mM)	0,625
DreamTaq™ DNA Polymerase (5 U/µL)	0,125
DMSO (100 %)	1,375
Template-DNA (DNA der potenziellen CRISPR-Mutanten aus der Koch-Methode)	0,5
H ₂ O	ad 25 µL

Tabelle 8.2–12: PCR-Programm der ARMS-PCR zur Detektion der CRISPR-Mutante mit der *clpA*-Wildtyp-Variante ausgehend von *E. coli* MIVa

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1 x
Denaturierung	94 °C	30 sec	30 x
Annealing	72 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	18 sec	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1 x

Tabelle 8.2–13: PCR-Ansatz der ARMS-PCR zur Detektion der CRISPR-Mutante mit der *clpA*-Wildtyp-Variante ausgehend von der CRISPR-Mutante #14 aus der indirekten Mutagenese

Komponente	Volumen (in µL)
10x DreamTaq Buffer	2,5
5'-Primer (10 µM): <i>clpA</i> _5_1462_EcoWT	0,5
3'-Primer (10 µM): <i>clpA</i> _3_1713_EcoWT_ARMS_weak	0,25
dNTP-Mix (je 2 mM)	0,625
DreamTaq™ DNA Polymerase (5 U/µL)	0,125
Template-DNA (DNA der potenziellen CRISPR-Mutanten aus der Koch-Methode)	0,5
H ₂ O	ad 25 µL

Tabelle 8.2–14: PCR-Programm der ARMS-PCR zur Detektion der CRISPR-Mutante mit der *clpA*-Wildtyp-Variante ausgehend von der CRISPR-Mutante #14 aus der indirekten Mutagenese

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1 x
Denaturierung	94 °C	30 sec	30 x
Annealing	69 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	17 sec	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1 x

8.2.2.3 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA

Vor allem bei der Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse ist eine Aufreinigung der Probe mit der Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Konzentrierung mittels Ethanol-Präzipitation oftmals notwendig. Aber auch ein zu niedrig konzentrierter PCR-Ansatz beispielsweise kann durch eine Ethanol-Präzipitation aufkonzentriert werden. Des Weiteren kann die Ethanol-Präzipitation dazu genutzt werden, einen Puffer zu entfernen, der sonst bei einem im Anschluss an eine erste Enzymreaktion mit einem anderen Enzym bedingten Pufferwechsel die Enzymtätigkeit des zweiten Enzyms stören könnte. Die Durchführung dieser zwei Methoden ist in den folgenden Kapiteln 8.2.2.3.1 und 8.2.2.3.2 beschrieben.

8.2.2.3.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Bei der alkalischen Lyse von Bakterienstämmen, die Nukleasen exprimieren, ist die Abtrennung dieser Proteine oftmals nicht vollständig genug. Dies zeigt sich in anschließenden Reaktionen mit Restriktionsenzymen (vgl. Kapitel 8.2.2.6.1). Unter diesen Pufferbedingungen werden auch die noch vorhandenen Nukleasen aktiviert, sodass die DNA abgebaut wird, das sich in einem Agarose-Gelbild mit einem diffusen „Schmier“ anstatt von distinkten Banden darstellt. Bei der Extraktion mit Phenol werden beispielsweise diese Nukleasen denaturiert, aber auch Polysaccharide oder SDS können als Verunreinigungen vorliegen und entfernt werden.

Die aufzureinigende DNA-Lösung wurde in einem Eppendorf-Gefäß mit dem gleichen Volumen einer fertigen, käuflich zu erwerbender Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 (v/v) versetzt und gründlich mit dem Vortexer durchmischt. Durch die anschließende Zentrifugation für eine Minute bei 15000 rpm erfolgte eine Phasentrennung der organischen und der wässrigen Lösung. Das Phenol bewirkte die Denaturierung der Proteine und das Chloroform mit dem Isoamylalkohol sorgten vorrangig für die gute Phasentrennung. Die denaturierten Proteine sammelten sich in der unteren organischen Phase bzw. in der Zwischenschicht weiß und viskos an, wohingegen

sich die DNA in der oberen Schicht befand. Diese obere wässrige Schicht konnte vorsichtig in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt werden, ohne etwas von dem weißen viskosen Material zu erwischen. Anschließend erfolgte mindestens noch eine weitere Phenol/Chloroform-Aufreinigung, so lange bis die Zwischenschicht klar war, und darauf wurde mit der wässrigen Phase, die die DNA enthielt, eine Ethanol-Präzipitation durchgeführt.

8.2.2.3.2 Ethanol-Präzipitation

Die Ethanol-Präzipitation wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Aufkonzentrierung von DNA genutzt. Dies ist möglich, da die Nukleinsäuren in wässriger Lösung über eine Hydrathülle verfügen, welche durch monovalente Kationen wie Natriumionen und hohe Ethanolkonzentrationen der DNA entzogen wird, sodass diese ausfällt und in einem geringeren Endvolumen wieder aufgenommen werden kann.

Zu der aufzukonzentrierenden DNA-Lösung wurde zunächst ein Zehntel des Volumens an 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) gegeben für eine Endkonzentration von 0,3 M. Absoluter Alkohol (Ethanol) wurde in einer Menge hinzugegeben, die dem doppelten Volumen der DNA-Lösung entsprach. Nach zweiminütiger Inkubation wurde für fünf Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert, um die ausgefällte DNA zu sedimentieren. Der Überstand wurde vorsichtig gegenüber des nicht sichtbaren Pellets abpipettiert. Anschließend wurde das Pellet mit 1 mL frisch hergestelltem 70 %igen Ethanol überschichtet, um die noch vorhandenen Salze zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation bei 15000 rpm für 2 Minuten erfolgte die Trocknung des Pellets bzw. der DNA bei 37 °C im Brutschrank. Nach max. einer halben Stunde konnte die DNA in einem geringeren Endvolumen als zuvor in dH₂O oder 1:10 verdünntem EB-Puffer aufgenommen werden.

8.2.2.3.3 Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

In dieser Arbeit wurden für die Extraktion und die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen das GeneJET Gel Extraction Kit von Thermo Scientific™ verwendet. Die Verwendung des Kits ermöglicht, gezielt nur bestimmte DNA-Fragmente in einem Gemisch nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese zur Größenauftrennung aus einem Agarosegel-Stückchen zu isolieren. Dazu wurde unter möglichst kurzer Bestrahlung mit UV-Licht, um DNA-Schäden weitestgehend zu minimieren, sodass die DNA im Anschluss für Ligation oder Sequenzierung nutzbar blieb, die gewünschte Bande, z. B. das Hauptprodukt einer PCR ohne Nebenprodukte oder ein DNA-Fragment nach Restriktion von Plasmid-DNA, aus dem Agarosegel mit einem Skalpell oder mithilfe von speziellen Gelbanden-Ausstanzern ausgeschnitten und in ein tariertes Eppendorf-Gefäß überführt. Die nächsten Einzel-

schritte der Aufreinigung erfolgten im Allgemeinen nach den Angaben in der Bedienungsanleitung des Herstellers und sind im Folgenden aufgeführt (Thermo Fisher Scientific Inc. 2015).

Pro 100 mg Agarosegel wurden 100 μL des Bindungspuffers (Binding Buffer) hinzugefügt und im Wasserbad bei 50-60 $^{\circ}\text{C}$ für maximal zehn Minuten unter gelegentlichem Vortexen inkubiert, bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Der Bindungspuffer enthält einen pH-Wert abhängigen Farbindikator. Die gelbe Farbe zeigt den optimalen pH-Wert für die DNA-Bindung an die Säule an; falls die Farbe orange oder violett aussah, wurde dem gelösten Agarose-Puffer-Gemisch 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2 zugegeben. Bei besonders kleinen Fragmenten (≤ 500 bp) wurde zusätzlich Isopropanol in derselben Menge wie dem Bindungspuffer hinzugefügt. Anschließend wurde die Mischung auf die Säule des Kits pipettiert und bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Bei größeren Volumina konnte in mehreren Schritten zentrifugiert werden. Es galt zu beachten, dass nicht mehr als 1 g Agarose je Säule verwendet wurden. Sofern die DNA im Anschluss für eine Sequenzierung genutzt werden sollte, wurde an dieser Stelle ein optionaler Schritt ergänzt: 100 μL Bindungspuffer wurden auf die Säule pipettiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde die an der Silikamembran der Säule gebundene DNA gewaschen, indem 700 μL Waschpuffer (Wash Buffer) auf die Säulenmembran gegeben wurden. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 13000 rpm für eine Minute, wurde der Durchfluss verworfen. Erneut wurde für eine Minute zentrifugiert, um sämtliche Reste des Waschpuffers, v. a. Ethanolreste, zu entfernen. Die Säule wurde im Anschluss auf ein neues Eppendorf-Gefäß gesetzt. Der im Kit enthaltene Elutionspuffer (Elution Buffer, EB-Puffer) wurde 1:10 mit dH_2O verdünnt und 15-25 μL des verdünnten EB-Puffers wurden direkt mittig auf die Säulchenmembran pipettiert. Nach einer Inkubation von einer Minute wurde die DNA durch Zentrifugation für eine Minute bei 13000 rpm von der Membran eluiert. Zur Erhöhung der DNA-Ausbeute wurde der Elutionsschritt wiederholt. Bis zur weiteren Verwendung konnte die extrahierte und aufgereinigte DNA bei -20 $^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

8.2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren (Agarose-Gelelektrophorese)

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren stellt eine Standardmethode zur Trennung, Größenbestimmung und damit auch zur Identifizierung von DNA-Fragmenten dar. Sie beruht auf der Tatsache, dass die Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen im elektrischen Feld in Richtung Anode wandern. Des Weiteren ergibt sich die Auftrennung nach der Größe durch die unterschiedliche Porengröße der verwendeten Gelmatrix. Hierfür wurde Agarose, welches ein Polysaccharid aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose, die glykosidisch miteinander verknüpft sind, darstellt, verwendet. Nach dem Erhitzen und Lösen in Wasser, bildet sich beim Erkalten eine dreidimensionale Faserstruktur aus den Agaroseketten zu einem stabilen Gel mit Porendurchmessern von

50 bis >200 nm (Green/Sambrook 2012, S. 94, Band 1; Norton et al. 1986). Kleinere Moleküle wandern dabei schneller in Richtung Anode als größere. Zusätzlich ist auch die Konzentration des Agarosegels entscheidend: Je höher konzentriert, desto langsamer wandert die DNA und desto besser können kleinere Fragmente aufgetrennt werden. Bei konstanten Bedingungen, wie Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers und der angelegten Spannung, hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Länge der DNA ab; sie ist umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare (Helling/Goodman/Boyer 1974).

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Nukleinsäuren wurde die Agarose in Endkonzentrationen von 0,8 bis 2 % in 0,5x TAE-Puffer unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C wurde die Lösung vorsichtig und luftblasenfrei in einen mit einem Kamm vorbereiteten Gelträger einer Elektrophoresekammer gegossen. Sobald das Gel ausgehärtet war, wurde es mit dem Laufpuffer (0,5x TAE-Puffer) überschichtet und der Kamm konnte gezogen werden, sodass die Probenaschen zum Beladen vorbereitet waren. Anschließend wurden die Nukleinsäureproben mit 6x Ladepuffer (Verhältnis etwa 5:1) versetzt und in die Probenaschen pipettiert. Die Polysucroselösung des Ladepuffers (vgl. Tabelle 8.1–9) sorgt dafür, dass die Proben gut in die Taschen absinken. Die beiden enthaltenen Farbstoffe ermöglichen eine optische Kontrolle, wie weit die Proben in dem Gel während der Elektrophorese in etwa gelaufen sind. Die Elektrophorese erfolgte horizontal bei einer angelegten Spannung von 80 bis 140 V. Zur Auswertung wurde das Gel in dem Geldokumentationssystem unter UV-Licht fotografiert. Dabei wurde die DNA mithilfe von Ethidiumbromid, einem planaren Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA-Doppelhelix interkaliert, sichtbar. Es wurden zwei Färbemethoden angewendet. Normalerweise wurde der leicht abgekühlten, noch flüssigen Agaroselösung das Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/mL zugesetzt. Für ungeschnittene Plasmide wurde das Gel allerdings im Anschluss an die Elektrophorese in einem EtBr-Färbebad für 15-20 Minuten unter leichten Schwenkbewegungen nachträglich gefärbt. Zur Größenbestimmung wurde stets ein Größenmarker (vgl. Kapitel 8.1.4) als Vergleichsstandard für die DNA-Fragmentgrößen mit auf das Gel aufgetragen.

8.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen wurden zwei verschiedene Methoden in dieser Arbeit genutzt: Näherungsweise die Konzentrationsabschätzung im Agarosegel oder die genauere spektralphotometrische Bestimmung mit Reinheitsgradangabe. Beide Methoden werden im Folgenden vorgestellt.

8.2.2.5.1 Konzentrationsabschätzungen im Agarosegel

Die Konzentrationsabschätzung im Agarosegel erfolgte nach der elektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren unter UV-Licht. Zu beachten galt, dass der in jeder Agarose-Gelelektrophorese mit auf das Gel aufgetragene Größenmarker für die Konzentrationsabschätzung in der vom Hersteller vorgegebenen Menge eingesetzt wurde. Nur dann entsprach die Intensität einer Bande des Vergleichsstandard einer bestimmten Masse an Nukleinsäure in der Probe. Wurde beispielsweise der GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder von Thermo Scientific™ in einer Konzentration von 0,5 µg/5 µL eingesetzt, so war ein Auftragsvolumen von 5 µL des Größenmarkers notwendig, damit, wie vom Hersteller vorgegeben, pro Gelspur 0,5 µg eingesetzt wurden. Abgelesen wurde die Konzentration der Probe durch den Bandenintensitätsvergleich mit der Bande des Größenmarkers mit gleicher Fragmentgröße. Eine Probe mit einer Fragmentgröße von 1500 bp und gleicher Intensität, enthielt etwa 80 ng pro aufgetragenem Probenvolumen. Bei einer Größe von 1000 bp und auch gleicher Bandenintensität zur 1000 bp Bande des Größenmarkers, entsprach dementsprechend die Konzentration nur 25 ng pro aufgetragenem Probenvolumen (vgl. Abbildung 8.1–1 (A)). Für eine korrekte Konzentrationsabschätzung musste die Probe ggf. verdünnt bzw. in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen werden und anschließend auf die richtige Konzentration bezogen bzw. umgerechnet werden.

8.2.2.5.2 Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung (NanoDrop™)

Die genauere Konzentrationsbestimmung wurde mit den Mikrovolumen-Spektralphotometern NanoDrop™ 1000 bzw. NanoDrop™ 2000 durchgeführt. Dabei handelt es sich um Vollspektrum-UV/VIS Spektralphotometer, die zur Quantifizierung und zur Bestimmung des Reinheitsgrades von z. B. DNA und RNA eingesetzt werden. Kleinste Probenvolumina (1-2 µL) werden dabei auf die optische Messoberfläche pipettiert und in kürzester Zeit vermessen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass auch hoch konzentrierte Proben ohne vorheriges Verdünnen korrekt gemessen werden können (Thermo Fisher Scientific Inc. 2009; Thermo Fisher Scientific Inc. 2011).

Unter Anwendung einer modifizierten Version des Lambert-Beer'schen Gesetzes rechnet die Software des NanoDrop™ Spektralphotometers aus der gemessenen Absorption die Nukleinsäurekonzentration in ng/µL aus (vgl. Formel 8.2–5).

$$c = \frac{A \times \epsilon}{b}$$

Formel 8.2–5: Modifizierte Version des Lambert-Beer'schen Gesetzes der NanoDrop™ Software zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

c = Nukleinsäurekonzentration in ng/µL

A = Absorption in Absorptionseinheiten (AU)

*ε = wellenlängenabhängige Extinktionskoeffizient der Nukleinsäure in ng*cm/µL*

b = Schichtdicke in cm

(Thermo Fisher Scientific Inc. 2009; Thermo Fisher Scientific Inc. 2011)

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

Die zugehörigen Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleinsäuren sind in der folgenden Tabelle 8.2–15 aufgeführt.

Tabelle 8.2–15: Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Nukleinsäuren

Nukleinsäure	Extinktionskoeffizient [ng*cm/μL]
Doppelsträngige DNA	50
Einzelsträngige DNA	33
RNA	40

(Thermo Fisher Scientific Inc. 2009; Thermo Fisher Scientific Inc. 2011)

Die Reinheitsbestimmung wird auch von der Software des NanoDrop™ Spektralphotometers durchgeführt und ist durch die Quotienten aus den Absorptionswerten bei 260 nm und 230 nm bzw. 280 nm definiert. Reine DNA liefert ein Absorptionsverhältnis $A_{260/280}$ von 1,8; RNA hingegen ein Verhältnis von 2,0. Bei kleineren Reinheitswerten könnte die Probe mit Proteinen kontaminiert sein. Für das Absorptionsverhältnis $A_{260/230}$ sollten die Werte bei $\geq 2,0$ liegen, ansonsten könnten z. B. organische Bestandteile als Verunreinigung vorliegen, teilweise enthalten auch Puffer oder Reagenzien aus den verwendeten Kits Fluorophore, die den Wert verfälschen können, sofern diese Stoffe mit eluiert werden (Thermo Fisher Scientific Inc. 2009).

8.2.2.6 Enzymatische Modifizierung von DNA

8.2.2.6.1 Restriktion von DNA

Bei der Restriktion von doppelsträngiger DNA wird diese durch spezielle Enzyme, sogenannte Restriktionsendonukleasen, an definierten Erkennungsmotiven erkannt und durch Spaltung einer Phosphodiesterbindung je Strang geschnitten. Dabei werden spezifische Sequenzen von vier bis acht Basenpaaren von den Enzymen erkannt, welche oftmals Palindrome darstellen (Berg et al. 2018, Seite 165). Je nach Enzym können bei der Spaltung glatte (engl.: *blunt*) Enden oder welche mit einem 3'- bzw. 5'-Überhang, sogenannte kohäsive Enden (engl.: *sticky ends*), entstehen. Restriktionsendonukleasen kommen in vielen Prokaryoten vor, dort dienen sie als primitives Immunsystem dem Schutz vor fremder eingedrungener DNA, indem sie diese spalten, jedoch ist die eigene DNA vor der Spaltung geschützt (Berg et al. 2018, Seite 165). Diese ursprüngliche Eigenschaft der sequenzspezifischen Spaltung wird in der Molekularbiologie beispielsweise bei der Klonierung zu Nutze gemacht, v. a. der Vorteil der gerichteten Insertion eines Fragmentes in einen Vektor nach Verwendung von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen, die beide *sticky ends* erzeugen, und anschließender Ligation (vgl. Kapitel 8.2.2.6.2) wird ausgenutzt, oder für die Charakterisierung doppelsträngiger DNA vielfach ein-

gesetzt. Unterschieden werden vier Klassen (Typ I bis Typ IV) von Restriktionsendonukleasen, wobei die Enzyme vom Typ II die entscheidendste Rolle als molekulares Werkzeug spielen:

Typ I: Schneiden DNA nach dem Zufallsprinzip, weit entfernt von den Erkennungsmotiven.

Typ II: Schneiden DNA an definierten Positionen innerhalb der Erkennungssequenz bzw. in unmittelbarer Nähe davon.

Typ III: Schneiden DNA außerhalb der Erkennungssequenz, benötigen zwei Motive in entgegengesetzter Richtung.

Typ IV: Schneiden modifizierte, vor allem methylierte DNA.
(New England Biolabs Inc. o. J.-c)

In dieser Arbeit wurden die Restriktionsendonukleasen vom Typ II von den Firmen New England BioLabs® GmbH (NEB) und Thermo Scientific™ verwendet. Die eingesetzten Restriktionsenzyme (vgl. Kapitel 8.1.5) wurden jeweils nach Herstellerangaben, meistens in 20 µL Ansätzen pipettiert und für 30-60 Minuten bei 37 °C inkubiert. In besonderen Fällen war eine angeschlossene Hitzeinaktivierung nötig und möglich. Eine Besonderheit stellt das Enzym *DpnI* dar, welches zu den methylierungsabhängigen Restriktionsendonukleasen zählt. Bei der Konstruktion des Plasmids pHPAS10-01.4 und einiger pKDsgRNA-Plasmide für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System wurde die Eigenschaft, dass *DpnI* nur methylierte DNA schneidet, genutzt, um das Template-Plasmid aus dem Ansatz zu entfernen (vgl. Kapitel 5.2, Kapitel 5.3.2 und Kapitel 8.2.2.2.3).

8.2.2.6.2 Ligation von DNA

Bei der Ligation werden freie Enden von beispielsweise vorab durch Restriktionsendonukleasen (vgl. Kapitel 8.2.2.6.1) geschnittener doppelsträngiger DNA miteinander verknüpft. Das dazu benötigte Enzym, die T4 DNA Ligase, katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien OH-Gruppe am 3'-Ende eines DNA-Stranges und einer freien Phosphatgruppe am 5'-Ende des anderen zu verknüpfenden DNA-Stranges unter ATP-Verbrauch. Die beiden freien Enden können dabei auch aus unterschiedlichen DNA-Molekülen stammen. In dieser Arbeit wurde die ATP-abhängige T4 DNA Ligase von Thermo Scientific™ bzw. New England BioLabs® GmbH (NEB) verwendet, um zum einen zwei Enden unterschiedlicher Moleküle (Insert und Vektor bei der Plasmidkonstruktion (vgl. Kapitel 5.2 und Kapitel 5.3.1.1)) oder eines Moleküls (PCR-Fragment mit phosphoryliertem Primer (vgl. Kapitel 5.2 und Kapitel 5.3.2.1.1)) miteinander zu verknüpfen. Dabei kann die T4 DNA Ligase sowohl bei glatten (engl.: *blunt*) oder kohäsiven (engl.: *sticky*) Enden, die je nach Restriktionsendonuklease entstanden sind, eine Phosphodiesterbindung katalysieren, sofern beide Enden dieselben zueinander passenden Überhänge besitzen. Wurden zwei verschiedene Moleküle für die Ligation

verwendet, so wurden Insert und Vektor in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt. Die Berechnung erfolgte über den Ligation Calculator NEBioCalculator® (Version 1.13.1) von New England Biolabs® GmbH (NEB) (New England Biolabs Inc. 2021). Generell wurden die verwendeten Fragmente vor der Ligasereaktion mit dem GeneJET Gel Extraction Kit von Thermo Scientific™ aus einem Agarosegel extrahiert und aufgereinigt (vgl. Kapitel 8.2.2.3.3). Die Konzentrationsabschätzung dieser Fragmente erfolgte in einem weiteren Agarosegel (vgl. Kapitel 8.2.2.5.1). Der Ligationsansatz, welcher nach Herstellerangaben pipettiert wurde (Thermo Fisher Scientific Inc. 2014), wurde in einem möglichst kleinen Volumen (meistens 20 µL) angesetzt und für 16 Stunden bei 16 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die Ligase bei 65 °C für zehn Minuten hitzeinaktiviert und der Ansatz je nach Konzentration in Teilen oder vollständig für eine Transformation (vgl. Kapitel 8.2.2.8) eingesetzt. In der folgenden Abbildung 8.2–7 ist die enzymatische Ligationsreaktion von einem Insert mit einem Vektor schematisch dargestellt.

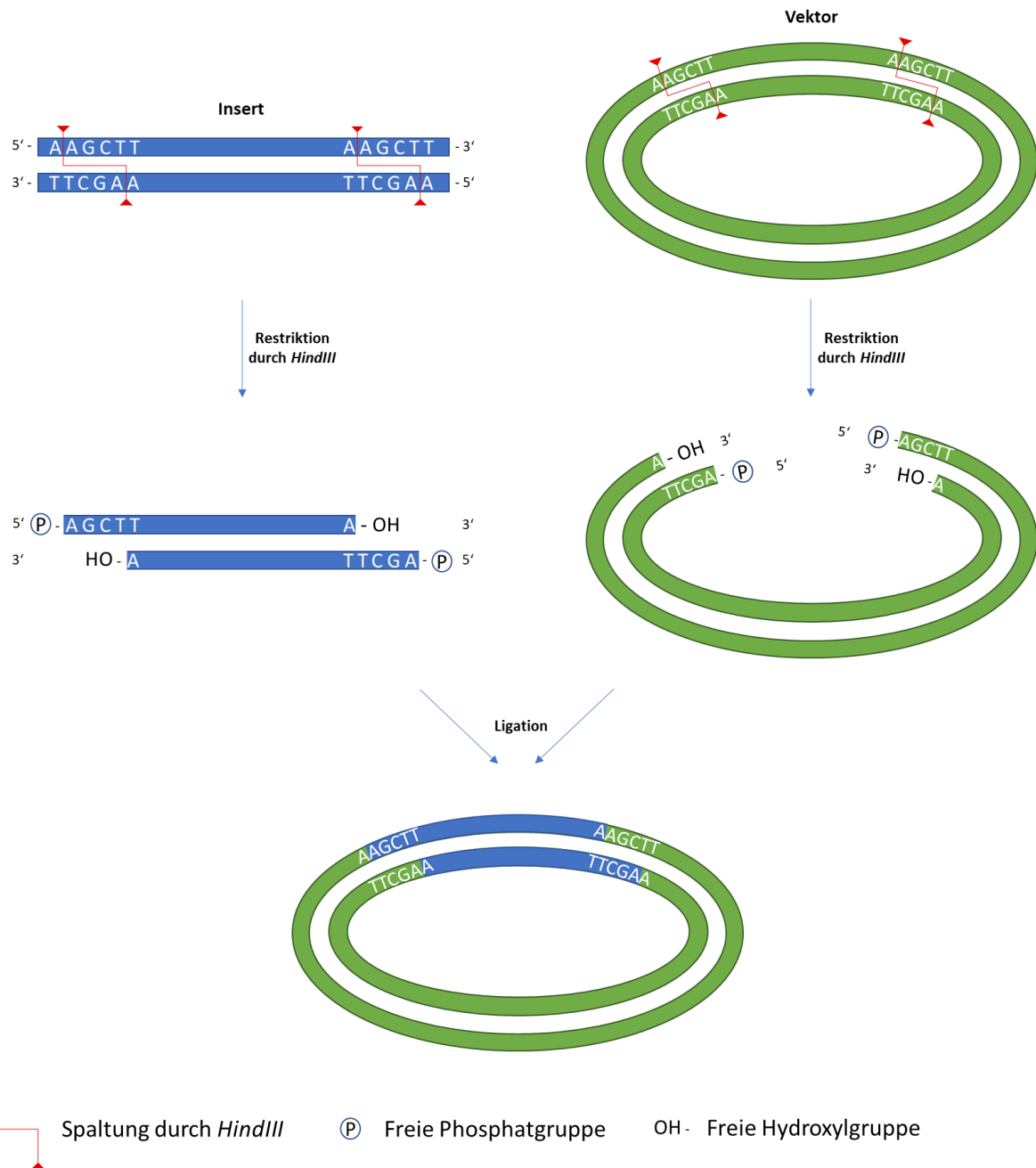


Abbildung 8.2–7: Schematische Darstellung der Ligation eines Inserts mit einem Vektor nach der jeweiligen Behandlung mit der Restriktionsendonuklease *HindIII*

Durch die Restriktionsendonuklease *HindIII* entstehen sogenannte kohäsive Enden (engl.: sticky ends). Die freien 3'-OH-Enden des Inserts werden mit der freien Phosphatgruppe am 5'-Ende des Vektors über die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verknüpft und andersherum.

8.2.2.7 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter Bakterienzellen dient als Vorbereitung für die Übertragung von DNA durch die Transformation (vgl. Kapitel 8.2.2.8). Experimentell wird dadurch die Eigenschaft der Bakterien, DNA aus der Umgebung der Bakterienzelle aufzunehmen, verstärkt. Je nachdem welche Methode der Transformation angewendet wird, werden die kompetenten Bakterienzellen darauf ange-

passt unterschiedlich hergestellt. Im Folgenden sind die zwei Varianten, die in dieser Arbeit Anwendung finden, beschrieben.

8.2.2.7.1 CaCl₂-kompetente Bakterienzellen

Im Jahre 1970 wurde erstmals von Mandel und Higa beschrieben, dass *Escherichia coli* Zellen, welche mit Calciumchlorid (CaCl₂) behandelt wurden, Phagen-DNA aufnehmen können (Mandel/Higa 1970). Zwei Jahre später berichteten Cohen *et al.*, dass durch die Behandlung auch Plasmid-DNA aufgenommen werden kann (Cohen/Chang/Hsu 1972). 1983 veröffentlichte Douglas Hanahan seine verbesserte Methode zur Herstellung CaCl₂-kompetenter Bakterienzellen, welche zu einer erhöhten Transformationseffizienz führte (Hanahan 1983). Der Hintergrund beruht darauf, dass sich die zweiwertigen Calcium-Ionen (Ca²⁺) an die negativ geladene Membran der Bakterien lagern und sich nach einem kurzen Hitzeschock die Permeabilität der Bakterienzelle erhöht, sodass die DNA aufgenommen werden kann (vgl. Kapitel 8.2.2.8.1).

In dieser Arbeit wurden die CaCl₂-kompetenten Bakterienzellen folgendermaßen hergestellt. Eine Übernachtskultur, ggf. mit einem Selektionsantibiotikum versetzt, sofern der Stamm bereits ein Plasmid trägt, wurde 1:100 in 50 mL SOB-Medium (ggf. plus Selektionsantibiotikum) verdünnt und bei der optimalen Wachstumstemperatur des Stammes, meistens 37 °C, unter Schütteln bei 130 rpm inkubiert (vgl. Kapitel 8.2.1.1.2). Die Tageskultur wurde je nach Stamm bei einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,3 bis 0,6 geerntet. Die Wildtyp-Stämme und die daraus hervorgegangenen Mutanten wurden bei einer OD_{600 nm} von etwa 0,3 geerntet, die K12-Laborsicherheitsstämme (*recA*-) erst bei einer OD_{600 nm} von ca. 0,6. Dazu wurde die Zellsuspension bei erreichter optischer Dichte in zwei auf Eis vorgekühlte Falcons portioniert und fünf Minuten bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand wurde abgegossen. Die Zellpellets wurden ab diesem Zeitpunkt nur auf Eis gelagert und in jeweils 5 mL kalter CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (4000 rpm, 4 °C, 5 min) und dem Verwerfen des Überstandes, wurden die Pellets nochmals in je 5 mL kalter CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert. Eine 20-minütige Ruhephase auf Eis folgte, bevor ein letzter Zentrifugationsschritt (4000 rpm, 4 °C, 5 min) angeschlossen wurde. Die beiden Zellpellets wurden wieder vereint und in insgesamt 1 mL kalter CaCl₂-Lösung (100 mM) aufgenommen. Für die direkt anschließende Transformation (vgl. Kapitel 8.2.2.8.1) wurden die fertigen kompetenten Zellen à 100 µL aliquotiert und auf Eis gelagert.

8.2.2.7.2 Elektrokompetente Bakterienzellen

Eine weitere Methode zur Erhöhung der bakteriellen Kompetenz und der damit erleichterten Übertragung von DNA wird durch die Erzeugung eines elektrischen Feldes dargestellt. Diese Methode der kurzzeitig angelegten Hochspannung wird als Elektroporation bezeichnet und wurde von Dower *et al.* 1988 für *Escherichia coli* beschrieben (Dower/Miller/Ragsdale 1988). Das elektrische Feld soll das Membranpotential der Bakterienzelle erhöhen und durch vorübergehende erhöhte Permeabilität die Aufnahme der DNA begünstigen. Durch die Elektroporation wird eine deutlich höhere Transformationseffizienz als bei der Calciumchlorid-Methode erreicht und ermöglicht auch eine Transformation von schwierigen zu transformierenden Stämmen (vgl. Kapitel 8.2.2.8.1 und Kapitel 8.2.2.8.2).

Die elektrokompetenten Bakterienzellen wurden in dieser Arbeit wie folgt hergestellt. Genauso wie im Kapitel 8.2.2.7.1 für die CaCl₂-kompetenten Bakterienzellen beschrieben, erfolgte die Anzucht der Tageskultur und der Zeitpunkt der Zellernte auch für die elektrokompetenten Bakterienzellen. Bei erreichter optischer Dichte wurde die Zellsuspension in zwei vorgekühlte Falcons überführt und zehn Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 5500 rpm und 4 °C für fünf Minuten und Verwerfen des Überstandes. Die Pellets wurden in jeweils 5 mL eiskaltem dH₂O resuspendiert. Hierbei galt zu beachten, dass zum einen nach den Waschschritten möglichst keine Medienreste mehr im Pellet hingen und zum anderen das zugefügte Wasser frei von Salzen war, da auch nur kleine Salzreste später bei der Elektroporation einen Kurzschluss auslösen konnten. Ein zweiter Zentrifugationsschritt (5500 rpm, 4 °C, 5 min) folgte, der Überstand wurde verworfen und die Pellets in jeweils 2 mL eiskaltem dH₂O resuspendiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt (5500 rpm, 4 °C, 5 min) und dem Verwerfen des Überstandes wurden beide Zellpellets vereint in 500 µL eiskaltem dH₂O aufgenommen. Jeweils 50 µL der fertigen elektrokompetenten Bakterienzellen wurden aliquotiert und direkt für die Transformation (vgl. Kapitel 8.2.2.8.2) verwendet. Eine längere Lagerung der Zellen war in dem nährstofffreien und nicht isotonischen Milieu nicht möglich.

8.2.2.8 Übertragung von DNA durch Transformation von Bakterienzellen

Die Übertragung von DNA durch die Transformation von Bakterienzellen wurde in dieser Arbeit mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt. Die vorbereitenden Schritte wurden bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben. In den beiden folgenden Kapiteln wird der Ablauf der Transformation und der Einsatz der jeweiligen Kontrollen näher ausgeführt.

8.2.2.8.1 Calciumchlorid-Methode

Ein Aliquot von 100 μL der CaCl_2 -kompetenten Bakterienzellen (vgl. Kapitel 8.2.2.7.1) wurde mit etwa 100 ng isolierter Plasmid-DNA (vgl. Kapitel 8.2.2.1.3) bzw. einem Ligationsansatz (vgl. Kapitel 8.2.2.6.2) in einem Eppendorf-Gefäß vermengt und für zwei Stunden auf Eis inkubiert. In diesem Schritt ermöglichten die Calcium-Kationen die Anlagerung der DNA an die Zellmembran der Bakterien. Es folgte ein Hitzeschock, bei 42 °C wurden die Ansätze für 90 Sekunden im Wasserbad inkubiert und anschließend sofort wieder für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Hierbei wurde kurzfristig die Permeabilität der Zellmembran erhöht und eine Übertragung der DNA in die Zellen ermöglicht. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde die Zellsuspension vollständig in ein Reagenzglas mit Deckel, welches zuvor mit 900 μL SOC-Medium befüllt wurde, überführt und zur Regeneration für 45-60 Minuten bei der optimalen Wachstumstemperatur des Stammes und bei 130 rpm geschüttelt. Die aufgenommene DNA hatte Zeit sich in den Zellen zu etablieren und die mit dem Plasmid neu erworbene Antibiotikaresistenz war ausgeprägt, sodass die Bakteriensuspension auf mehreren selektionsantibiotikahaltigen LB-Agarplatten (25 μL bis maximal 200 μL je Agarplatte) ausgestrichen werden konnte, welche über Nacht im Brutschrank inkubiert wurden. Zum eigentlichen Transformationsansatz wurden noch einige Kontrollen ergänzt mitgeführt. Zum einen wurde ein weiteres Aliquot der kompetenten Zellen, die auch den Hitzeschritt durchliefen, einmal auf reinen LB-Agar und einmal auf dem Selektionsagar als Wachstumskontrolle ausplattiert. Hier sollte auf dem LB-Agar ein deutlicher Bakterienrasen entstehen, genaue Keimzahlbestimmung erfolgte ergänzend mit den kompetenten Zellen (KBE-Bestimmung vgl. Kapitel 8.2.1.2), wohingegen auf dem antibiotikahaltigen Agar kein Wachstum sichtbar sein durfte. Zur Kontrolle der Kompetenz der Bakterienzellen wurden diese mit einem bekannten, leicht zu transformierenden Plasmid, meistens pBR329, transformiert. Hier sollte eine vergleichbare Transformationseffizienz wie in vorherigen Versuchen zu bestimmen sein. Des Weiteren wurden sämtliche verwendete Medien und Lösungen auf Kontaminationen kontrolliert. Bei der Transformation von Bakterienzellen mit einem Ligationsansatz, wurden noch weitere Kontrollen durchgeführt. In einer Verdauungskontrolle wurde der mit einer Restriktionsendonuklease behandelte Vektor ohne T4 DNA Ligase zu den kompetenten Zellen gegeben. Bei einer vollständigen Enzymreaktion der Restriktionsendonuklease, durften keine Kolonien auf dem Selektionsagar wachsen. In einer Ligasekontrolle wurde der zuvor beschriebene Ansatz mit T4 DNA Ligase behandelt, aber kein Insert hinzugefügt. Hier sollten auf dem Selektionsagar mindestens eine gleichgroße Anzahl an Kolonien entstehen, wie bei der eigentlich gewünschten Transformation. Nur wenn alle Kontrollen das gewünschte Ergebnis lieferten, wurden die Transformanden in anschließenden Versuchen eingesetzt.

8.2.2.8.2 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden 50 µL der frischen elektrokompetenten Zellen (vgl. Kapitel 8.2.2.8.2) mit etwa 50 ng DNA, mit der die Bakterienzellen transformiert werden sollten, vermischt und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz, bestehend aus einem möglichst geringen Volumen, wurde im Anschluss in eine vorgekühlte trockene Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 0,1 cm überführt. Nachdem die Küvette verschlossen in den Gene Pulser® II gestellt wurde, erfolgte der elektrische Impuls (1,8 kV/200 Ω/25 µF) für 4,8-5,0 Millisekunden. Direkt im Anschluss wurde 1 mL SOC-Medium in die Küvette pipettiert und der gesamte Ansatz nach kurzem Durchmischen durch Auf- und Abpipettieren in ein steriles Reagenzglas mit Deckel überführt. Die Regeneration fand bei der optimalen Wachstumstemperatur des Stammes für 45-60 Minuten bei 130 rpm statt. Vergleichbar mit der Calciumchlorid-Methode (vgl. Kapitel 8.2.2.8.1) wurden 25 µL bis 100 µL des Ansatzes auf mehreren selektionsantibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen. Ebenfalls wurden auch hier sämtliche Kontrollen mitgeführt, die im vorherigen Kapitel 8.2.2.8.1 bereits beschrieben wurden. Die Elektroporationsküvetten wurden im Anschluss an die Transformation mit Salzsäure (0,1 M) befüllt und zehn Minuten einwirken gelassen, damit restliche DNA-Reste zerstört werden konnten. Über Nacht blieben die Küvetten mit Ethanol (70 %) stehen und wurden am Folgetag gründlich mit dH₂O gespült. Nach dem Trocknen und anschließendem Autoklavieren, konnten die Elektroporationsküvetten zwei- bis dreimal wiederverwendet werden.

8.2.2.9 Sequenzierung von DNA

8.2.2.9.1 Sanger-Sequenzierung

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System DNA-Sequencer der Firma Beckman Coulter, Inc. genutzt, um die Nukleotid-Abfolge eines DNA-Moleküls zu bestimmen. Dieser Sequencer wendet die Methode des Cycle Sequencing an, welche auf dem 1977 von Sanger *et al.* veröffentlichtem Kettenabbruchverfahren beruht (Sanger/Nicklen/Coulson 1977). Das gewünschte DNA-Molekül, ein PCR-Amplifikat oder ein Plasmid als Template, wird dabei mit nur einem Primer, dem sogenannten Sequenzier-Primer, amplifiziert. Die Synthese erfolgt damit nur an einem Strang, daher spricht man auch von einer linearen Amplifikation. Eine weitere Besonderheit dieser modifizierten PCR besteht darin, dass eine definierte Mischung aus den vier klassischen Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und vier fluoreszenzmarkierter 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) verwendet wird. Jeder dieser vier verschiedenen ddNTPs ist mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die ddNTPs sorgen bei dem Einbau während der Synthese dafür, dass es zum Kettenabbruch kommt, weil die freie OH-Gruppe der Desoxyribose fehlt, sodass die Phosphodiesterbindung nicht ausgebildet werden kann. Durch diese beiden Besonderheiten der PCR-

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

Reaktion wird von einem statistischen Einbau der ddNTPs ausgegangen, der dafür sorgt, dass Amplifivate jeder möglichen Fragmentlänge in der Mischung vorliegen. Kapillarelektrophoretisch werden diese Fragmente der Größe nach aufgetrennt und durch Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe, die basenspezifisch verschiedene Farbsignale liefern, ermittelt die Software des DNA-Sequenzers die Nukleotidsequenz der eingesetzten DNA.

Für ein zu sequenzierendes Plasmid oder ein PCR-Fragment wurde zunächst die Konzentration im Agarosegel abgeschätzt (vgl. Kapitel 8.2.2.5.1), das Plasmid musste dafür vorher mit einer Restriktionsendonuklease linearisiert werden (vgl. Kapitel 8.2.2.6.1) und sollte über ein Kit isoliert worden sein (vgl. Kapitel 8.2.2.1.3). Sofern PCR-Produkte zur Sequenzierung genutzt wurden, wurden diese zunächst von Primern und nicht eingebauten dNTPs mithilfe der beiden Enzyme Exonuklease I und FastAP, einer thermosensitiven alkalischen Phosphatase, entfernt (Thermo Fisher Scientific Inc. 2012). Sollte das PCR-Amplifikat aus einem Agarosegel extrahiert worden sein (vgl. Kapitel 8.2.2.3.3), entfiel dieser Schritt. Für den Cycle Sequencing Ansatz wurden 5-40 ng PCR-Fragmente bis zu einer Größe von 400 bp bzw. 30-100 ng bei Fragmenten bis zu 1000 bp eingesetzt. Bei Plasmiden wurden 100-500 ng verwendet. Alle weiteren Komponenten des Ansatzes sind der folgenden Tabelle 8.2–16 zu entnehmen.

Tabelle 8.2–16: Standard-Ansatz für das Cycle Sequencing

Komponente	PCR-Produkt	Plasmid-DNA
	Volumen (in μL)	
10x Puffer ¹	1-3	1
Sequenzier-Primer (10 μM)	1	1
QuickStart Mastermix ^{1,2}	1-3	3
DMSO	-	1
Template-DNA (aufgereinigtes PCR-Amplifikat bzw. Plasmid-DNA)	5-100 ng (je nach Größe)	100-500 ng (je nach Größe)
H ₂ O	ad 20 μL	ad 20 μL

¹ Bestandteil des GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit von Beckman Coulter Inc.

² Mastermix bestehend aus Polymerase, dNTPs und fluoreszenzmarkierter ddNTPs

Die Temperatur- und Zeit-Programme unterscheiden sich, je nachdem ob ein PCR-Produkt oder Plasmid-DNA sequenziert wird. Bei Plasmiden wird eine Vorinkubation vorgenommen, anschließend der QuickStart Mastermix hinzugefügt und dann das Programm fortgeführt. Die genauen Temperatur-Programme sind der Tabelle 8.2–17 und der Tabelle 8.2–18 zu entnehmen.

Tabelle 8.2–17: Temperatur-Programm für PCR-Produkte

Temperatur	Zeitdauer	Anzahl der Zyklen
96 °C	20 sec	30 x
45-60 °C	20 sec	
60 °C	4 min	
4 °C	∞	1 x

Tabelle 8.2–18: Temperatur-Programm für Plasmid-DNA

Temperatur	Zeitdauer	Anzahl der Zyklen
96 °C	5 min	1 x (Vorinkubation)
96 °C	20 sec	30 x
60 °C	4 min	
4 °C	∞	1 x

Nach der 5-minütigen Vorinkubation wird erst der QuickStart Mastermix hinzugegeben.

Nach dem Cycle Sequencing wurde eine modifizierte Ethanol-Präzipitation (vgl. Kapitel 8.2.2.3.2) durchgeführt. Dazu wurden dem 20 µL Ansatz 5 µL Fällungsreagenz (bestehend aus 2 µL 3 M Natriumacetatlösung pH 5,2, 2 µL 100 mM EDTA pH 8 und 1 µL Glycogen [20 mg/mL]) und 60 µL Ethanol absolut zugefügt. Es wurde für zwölf Minuten bei Raumtemperatur und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend zweimal mit 200 µL Ethanol (70 %, frisch hergestellt) gewaschen (Zentrifugation für 30 Sekunden bei Raumtemperatur und 14000 rpm). Nachdem das Pellet bei Raumtemperatur abgedunkelt für maximal zehn Minuten getrocknet wurde, wurde es in 30 µL SLS (*sample loading solution*), welche Formamid enthält und eine Komponente des GenomeLab™ DTCS Quick Start Kits darstellt, aufgenommen. Dieser Ansatz wurde komplett in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte überführt und die Sequenzierung im GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System gestartet. Im Anschluss wurden die Daten der Software des DNA-Sequenzers mit dem Programm Vector NTI Advance™ 11.5.0 angesehen und ausgewertet.

Ab dem Jahr 2018 wurden die DNA-Moleküle nicht mehr selbst sequenziert, sondern bei der Firma Eurofins Genomics Germany GmbH, welche den Sequenzierservice der Firma GATC Biotech AG übernommen hat, in Auftrag gegeben. Das Produkt LightRun Tube wurde zur Sanger-Sequenzierung aufgereinigter Plasmide und PCR-Produkte verwendet. Dazu wurden lediglich die Proben mit dem gewünschten Sequenzier-Primer versetzt, in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt und mit einem Barcode versehen, den die Firma zur Identifizierung der Proben der Universität bereitgestellt hatte. Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde diese über ein Kit isoliert (vgl. Kapitel 8.2.2.1.3) und nach Linearisierung durch eine Restriktionsendonuklease wurde die Konzentration des isolierten Plasmids

über ein Agarosegel abgeschätzt (vgl. Kapitel 8.2.2.5.1). 5 µL Plasmid-DNA in einer Konzentration von 80-100 ng/µL wurden mit 5 µL Sequenzier-Primer (5 pmol/µL) vermengt und in das Sequenzierlabor der Eurofins Genomics Sequencing GmbH nach Köln verschickt bzw. über eine sogenannte DropBox abgeholt (Eurofins Genomics GmbH 2021). Zu sequenzierende PCR-Produkte wurden, wie oben bereits beschrieben mit den Enzymen Exonuklease I und FastAP behandelt oder zur Aufreinigung aus einem Agarosegel extrahiert (vgl. Kapitel 8.2.2.3.3). Nach der Konzentrationsbestimmung, ebenfalls über ein Agarosegel (vgl. Kapitel 8.2.2.5.1), wurden je nach Amplifikatsgröße bestimmte Mengen in ein 1,5 mL Eppendorf-Gefäß pipettiert: Bei 150-300 bp kleinen Fragmenten wurden 5 µL in einer Konzentration von 2 ng/µL benötigt, bei 300-1000 bp jedoch 5 µL einer Konzentration von 12 ng/µL. Waren die PCR-Amplifikate 1000-3000 bp groß, waren 5 µL einer Konzentration von 25 ng/µL nötig. In jedem Fall wurden die Proben mit 5 µL Sequenzier-Primer (5 pmol/µL) versetzt und mit dem LightRun Tube Barcode versehen (Eurofins Genomics GmbH 2021). Am Folgetag des Erreichens der Proben im Sequenzierlabor wurden die Nukleotidsequenzen und die dazugehörigen Elektropherogramme online zum Abruf und Herunterladen bereitgestellt und konnten mit dem Programm Vector NTI Advance™ 11.5.0 ausgewertet werden.

8.2.2.9.2 Pyrosequencing®

Neben der Sanger-Sequenzierung wurde in dieser Arbeit eine weitere Methode zur Aufklärung der Nukleotid-Sequenz eines DNA-Moleküls verwendet: Das Pyrosequencing®. Angewendet wurde diese Methode zur Verifikation des Austausches von 20 Nukleotiden, der sogenannten N₂₀-Sequenz, bei der Konstruktion der pKDsgRNA-Plasmide, welche für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/Cas9-System benötigt wurden (vgl. Kapitel 8.2.2.10.1, 5.3.1.2, 5.3.2.1.2 und 5.3.2.2.2). Generell handelt es sich bei dem Pyrosequencing® um eine schnellere und kostengünstigere Analyse im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung (vgl. Kapitel 8.2.2.9.1) und eignet sich besonders für kurze zu sequenzierende DNA-Abschnitte. Das Prinzip basiert auf dem „*sequencing-by-synthesis*“, im Jahre 1985 von Robert J. Melamede entwickelt und im Jahre 1989 patentiert (Melamede 1989), und der Detektion von Pyrophosphat während der DNA-Synthese (Hyman 1988). Mostafa Ronaghi beschrieb die benötigten Enzyme und den instrumentellen Aufbau, sodass durch das detektierte Lichtsignal auf die Nukleotid-Abfolge zurückgeschlossen werden konnte (Ronaghi 2001).

Generell werden vier Enzyme benötigt: DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase. Als erstes katalysiert die DNA-Polymerase den Einbau des ersten, von vier möglichen, zugegebenen Desoxynukleosidtriphosphates (dNTP), sofern dieses komplementär zum Template-Strang ist. Dabei entsteht Pyrophosphat proportional zur Anzahl der eingebauten dNTPs eines Typs. Die ATP-Sulfurylase wandelt das entstandene Pyrophosphat mit APS (Adenosin-5'-phosphosulfat) zu ATP um,

welches von der Luciferase als Energiequelle benötigt wird, um Luciferin in Oxyluciferin umzuwandeln. Das dabei generierte Licht ist wiederum proportional zu der Menge an ATP und wird über eine CCD-Kamera (*charge coupled device*) detektiert und als Peak in einem Pyrogramm dargestellt. Die Höhe des angezeigten Peaks steht im Verhältnis zu der Anzahl der eingebauten dNTPs eines Typs, sodass auch eine Abfolge von z. B. zwei gleichen Nukleotiden ermittelt werden kann. Wird ein zugegebenes dNTP einer Art nicht eingebaut, wird auch kein Licht erzeugt und kein Peak im Pyrogramm dargestellt. Damit dies möglich ist, bedarf es zusätzlich dem letzten Enzym, der Apyrase. Dieses Enzym baut kontinuierlich ATP und nicht eingebaute dNTPs ab, sodass die Lichtreaktion erlischt und im Anschluss der nächste Typ dNTP zugegeben werden kann (Pyrosequencing® AB 2002). Durch die Vorgabe der Reihenfolge (*dispensation order*), individuell je nach Sequenz anzugeben, der von der Apparatur zuzugebenden einzelnen dNTP-Lösungen kann im Anschluss aus dem Pyrogramm durch die jeweiligen Peaks und ihrer Höhe auf die Sequenz zurückgeschlossen werden. Als interne Kontrolle der Methode wurde zu Beginn der *dispensation order* ein Nukleosid gewählt, welches in der Sequenzabfolge nicht an erster Stelle auftrat. Hiermit sollte ein „Nichteinbau“ überprüft werden. Im Pyrogramm durfte kein Peak zu sehen sein. Die Pyrosequencing®-Apparatur kontrollierte zusätzlich selbstständig die Lösungen des Enzymmixes und des Substratmixes, dargestellt unter „E“ bzw. „S“ am Anfang des Pyrogrammes, bei denen ein kleiner Peak für den Substratmix entstand. Die beiden letzten zugegebenen dNTP-Lösungen mit Guanin und Thymin verifizierten bei dieser Anwendung der Methode den Übergang zur restlichen sgRNA *downstream* der N₂₀-Sequenz, die bereits Bestandteil des ursprünglichen Plasmids pKDsgRNA-ack sind.

Methodisch erfolgte zunächst eine Polymerase-Kettenreaktion (vgl. Kapitel 8.2.2.2.1) eines 292 bp großen Fragmentes, welches den zu sequenzierenden Bereich umspannte, mit den Primern pKDsgRNA_5_5255 und pKDsgRNA_3_5546_PSO_Biotin. Die Primer wurden vorab mit der Software „PSQ Assay Design“ der Pyrosequencing®-Apparatur entworfen. Zu beachten galt, dass eine erhöhte Anzahl an PCR-Zyklen, nämlich 45 Stück, durchgeführt wurden, um eine ausreichend große Menge an Ausgangsprodukt zu erhalten, und dass außerdem ein 3'-Primer eingesetzt wurde, der am 5'-Ende eine Biotin-Markierung aufwies. Außerdem wurde ein 50 µL Ansatz für die Polymerase-Kettenreaktion hergestellt. Das PCR-Produkt wurde in einem Agarosegel (1,6 %) auf Reinheit überprüft (vgl. Kapitel 8.2.2.4) und im Anschluss wurden 40 µL des PCR-Ansatzes in eine Mikrotiterplatte pipettiert, in welcher bereits Binding Buffer, dH₂O und Streptavidin-Sepharose-Beads vorgelegt waren. Diese Platte wurde verschlossen für 5 Minuten geschüttelt. In dieser Zeit konnte das biotinmarkierte PCR-Produkt von dem Streptavidin zur Abtrennung der restlichen Komponenten des PCR-Ansatzes gebunden werden. In der Zwischenzeit wurde eine Pyrosequencing®-Mikrotiterplatte mit

dem Sequenzierprimer pKDsgRNA_5_5316_PSQ_Seq, der ebenfalls über die Software „PSQ Assay Design“ entworfen wurde, und mit Annealing Buffer vorbereitet. Durch die Nutzung eines Vacuum Prep Tools (VPT; 96 Filterstifte in Anordnung der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte, die an eine Vakuumpumpe angeschlossen sind) wurde das an die Streptavidin-Sepharose-Beads gebundene PCR-Produkt aufgenommen, in Ethanol (70 %) gewaschen, in 0,2 M Natronlauge denaturiert und anschließend in Washing Buffer (vgl. Tabelle 8.1–9) gewaschen. Nur der biotinylierte DNA-Einzelstrang blieb über die Beads am Filter zurück und konnte durch Abschalten des Vakuums in die Pyrosequencing®-Mikrotiterplatte überführt werden. Bei 60-70 °C für zehn Minuten im Heizblock fand das Annealing des Sequenzierprimers an den DNA-Einzelstrang statt. Nach dem Abkühlen der Platte wurde diese zur Analyse in die Pyrosequencing®-Apparatur gestellt. Zusätzlich wurde die sogenannte Cartridge der Pyrosequencing®-Apparatur laut Herstellerangaben mit den einzelnen dNTPs, dem Enzymmix aus DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase und dem Substratmix aus APS und Luciferin befüllt. Alle Substanzen sind Bestandteile des Kits PyroMark Gold Q96 Reagents (5 x 96) von QIAGEN. Die Sequenzierung wurde laut Herstellerangaben gestartet (Pyrosequencing® AB 2003).

8.2.2.9.3 Next-Generation Sequencing

Das Next-Generation Sequencing (NGS) wurde genutzt, um Genomsequenzierungen einiger Mutanten bzw. Selektanden durchführen zu lassen. Dazu wurde lediglich ein Teil der Probenvorbereitung selbst ausgeführt. Ein Großteil der Aufgaben wurde in Auftrag gegeben und von der Firma GENEWIZ® Germany GmbH erledigt. Zur Probenvorbereitung zählte die Isolierung doppelsträngiger genomischer DNA der zu analysierenden Bakterienstämme. Dazu wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit von QIAGEN genutzt. Im Allgemeinen erfolgte die Isolierung nach Herstellerangaben für gramnegative Bakterien (QIAGEN GmbH 2020a). Dafür wurde 1 mL einer Übernachtskultur des Bakterienstammes von Interesse, die für maximal 16 h bei 37 °C und 130 rpm in 3 mL LB-Medium inkubiert worden war, durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 7500 rpm und bei Raumtemperatur in einem Eppendorf-Gefäß pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 180 µL ATL Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse mit Zugabe von 20 µL Proteinase K. Nach dem vollständigen Durchmischen mithilfe eines Vortexers wurde der Ansatz für zehn Minuten im Wasserbad bei 56 °C inkubiert, bis die Lösung vollständig klar erschien. Damit die genomische DNA keine RNA-Verunreinigungen enthielt, wurden zusätzlich zu der Probe 20 µL RNase A in einer Konzentration von 10 mg/mL hinzugefügt und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kräftigem Vortexen (15 sec) wurden 200 µL AL Puffer hinzugefügt und nach weiterem Durchmischen 200 µL Ethanol (96-100 %). Ein weiteres Mal wurde die Probe sofort und gründlich vermengt. Diese Mischung wurde

im Anschluss auf das im Kit enthaltene Säulchen (DNeasy Mini spin column), welches zuvor in ein mitgeliefertes Auffanggefäß gesetzt wurde, pipettiert. Nach Zentrifugation bei 8000 rpm für eine Minute wurde die Säule auf ein neues Auffanggefäß gesteckt und die auf der Säulchenmembran gebundene DNA zuerst mit 500 µL Waschpuffer AW1 gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (8000 rpm, eine Minute) und dem Wechseln des Auffanggefäßes, wurden 500 µL Waschpuffer AW2 hinzugefügt. Zum Trocknen der Säulchenmembran erfolgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm für drei Minuten. Nun wurde das Säulchen in ein neues Eppendorf-Gefäß gesetzt, ohne dabei mit der Säulenspitze den Waschdurchfluss zu berühren. Der im Kit enthaltene Elution Buffer (AE-Puffer) wurde 1:10 mit dH₂O verdünnt und 100 µL des verdünnten AE-Puffers wurden direkt mittig auf die Säulchenmembran pipettiert. Nach einer Inkubation von einer Minute wurde die genomische DNA durch Zentrifugation für eine Minute bei 8000 rpm von der Membran eluiert und konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden (QIAGEN GmbH 2020a). Es folgte eine spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mit dem NanoDrop™ (vgl. Kapitel 8.2.2.5.2). Wie von der Firma GENEWIZ® Germany GmbH gewünscht, sollte die Konzentration bei mindestens 20 ng/µL liegen und der Quotient des Absorptionsverhältnisses $A_{260/280}$ bei 1,8 bzw. leicht darüber, jedoch RNA-frei. Insgesamt 1,5 µg genomische DNA wurden in einem Eppendorf-Gefäß auf Trockeneis für die Genomsequenzierung verschickt.

Die folgenden Schritte wurden von der Firma GENEWIZ® Germany GmbH durchgeführt und sind daher nur in ihren Kernpunkten aufgeführt. Zunächst erfolgte die sogenannte *Library Preparation*. Dazu wurde die gelieferte genomische DNA fragmentiert und sämtliche Teilstücke wurden an beiden Enden (5' und 3') mit zwei unterschiedlichen Adaptermolekülen ligiert. Diese Adapter-markierten DNA-Fragmente wurden als Gesamtpool (= *Library*) für die sogenannte *Cluster Generation* auf eine Fließzelle (*flow cell*), auf deren Oberfläche Oligonukleotide gebunden sind, geladen. Die DNA-Fragmente banden an die oberflächengebundenen Oligonukleotide. An den dabei entstehenden Brücken fand die Amplifikation dieser Fragmente statt (*bridge amplification*) und es bildeten sich Cluster identischer einzelsträngiger DNA-Fragmente (Illumina Inc. 2017). Im Anschluss folgte die eigentliche Sequenzierungsreaktion. Die GENEWIZ® Germany GmbH nutzt dafür das NovaSeq™ 6000-Sequenziersystem von Illumina®, welches die bewährte Methode des *Sequencing by Synthesis* (SBS) anwendet (Illumina Inc. 2020a; Illumina Inc. 2020b). Dabei werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide, welche zusätzlich eine Terminatorgruppe enthalten, schrittweise komplementär zu den einzelsträngigen DNA-Fragmenten, die an die Fließzelle gebunden sind, eingebaut. Nach der Abspaltung der Fluoreszenzgruppe und Detektion des Lichtsignals wurde auch die Terminatorgruppe abgelöst, sodass das nächste Nukleotid eingebaut werden konnte. Nach dem Abschluss der Sequenzierung der kurzen DNA-Fragmente aus dieser Richtung, erfolgte in einer zweiten Runde nach einem Waschschritt die Sequenzierung mit einem weiteren Primer von der entgegengesetzten Richtung, sodass

eine sogenannte *paired-end* Sequenzierung daraus hervorging. Zur Detektion verwendet das NovaSeq™ 6000-Sequenziersystem eine Zweikanal-Sequenzierungsschemie. Dementsprechend wurde nicht für jede Base ein unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, sondern lediglich zwei verschiedene. Thymin wurde mit einem grünem und Cytosin mit einem roten Fluorophor markiert. Adenin hingegen trug beide Fluoreszenzfarbstoffe und Guanin keinen. Durch die Verwendung von Filtern, die ausschließlich die rote bzw. grüne Fluoreszenz passieren lassen bzw. die Strahlung dieser Wellenlängen, kann durch den Vergleich durch welchem Filter eine Fluoreszenz zu detektieren ist, auf die Basenabfolge geschlossen werden (Illumina Inc. 2018). Im Anschluss identifizierte die Software des Sequenziersystems darüber die Nukleotide und erzeugte sogenannte *Base-Call*-Dateien (BCL-Dateien) (Illumina Inc. 2020a). Von der Firma GENEWIZ® Germany GmbH wurden abschließend die BCL-Daten mit der Software ihres Sequenziersystems zu Sequenzdaten im FASTQ-Format (Cock et al. 2010) konvertiert und bereitgestellt. Daraufhin konnten diese Daten mit dem Programm CLC Genomics Workbench 8.0.2 von QIAGEN N.V. analysiert werden. Nach dem durchgeführten Assembly der Daten erfolgte das Alignment gegen den bereits sequenzierten Referenzstamm *E. coli* WT (GK 571). Im Anschluss konnten sogenannte *Variants* herausgestellt werden, welche in *Track Lists* von dem Programm aufgeführt wurden (vgl. Kapitel 10.4 im Anhang). Zur näheren Analyse der gefundenen Varianten wurden die einzelnen Alignments aus dem Programm CLC Genomics Workbench 8.0.2 mithilfe des Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson et al. 2011; Thorvaldsdóttir/Robinson/Mesirov 2012) angesehen und miteinander verglichen. Hierbei konnte beispielsweise überprüft werden, wie gut die Abdeckung der Sequenzierung an bestimmten Stellen war, und beurteilt werden, wie wahrscheinlich die angezeigte Veränderung in der Genomsequenz auch wirklich vorhanden ist.

8.2.2.10 Genomische Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System

Die Etablierung des CRISPR/*Cas9*-Systems, welches ursprünglich eine Art Immunsystem des Bakteriums darstellt und dieses vor der erneuten Infektion durch einen Bakteriophagen schützt, zur gezielten Genomeditierung wurde im Jahre 2012 zuerst in den Arbeitsgruppen von Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna beschrieben (Jinek et al. 2012). 2020 bekamen die beiden Biochemikerinnen für diese Entwicklung den Nobelpreis für Chemie verliehen. Die Abkürzungen CRISPR/*Cas9* stehen dabei für *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* bzw. *CRISPR-associated*. Die Technik wurde seitdem vielfach angewendet, um das Erbgut lebender Zellen gezielt zu verändern, und für verschiedene Organismen optimiert. In dieser Arbeit fand die Methode von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather Anwendung, die sich speziell auf die genomische Mutagenese von *Escherichia coli* konzentriert haben und ein System entwickelten, bei dem es zu einer punktuellen

Veränderung des Genoms kommt, ohne der Einführung weiterer Veränderungen, wie z.B. Narbensequenzen. Genannt wurde diese Methode von ihnen no-SCAR System (*Scarless Cas9 Assisted Recombinering*) (Reisch/Prather 2015).

8.2.2.10.1 Zwei-Plasmid-System

Bei der no-SCAR Genomeditierungsmethode von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather handelt es sich um ein Zwei-Plasmid-System. Erworben wurden die Plasmide pCas9-CR4 und pKDsgRNA-ack über Addgene, wo diese von Kristala Prather zur Verfügung gestellt wurden.

Das Plasmid pCas9-CR4 (vgl. Abbildung 8.2–8) ist ein *medium-copy* Plasmid (p15A *origin of replication*) und trägt zur Selektion eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol, vermittelt durch die Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT). Die optimale Wachstumstemperatur der Stämme, die dieses Plasmid tragen, liegt bei 37 °C. Des Weiteren codiert das Plasmid für die Endonuklease *Cas9* aus *Streptococcus pyogenes*, welches ein RNA-abhängiges Enzym ist und an einem gewünschten DNA-Sequenzabschnitt einen Doppelstrangbruch katalysiert. Damit *Cas9* an der richtigen Zielsequenz schneiden kann, benötigt es neben einem sogenannten Protospacer im Genom, an den die sgRNA (*single guide RNA*), die auch diese Sequenz enthält, des zweiten Plasmids pKDsgRNA-ack binden kann, noch eine PAM-Stelle (*protospacer adjacent motif*), welche aus dem Triplet 5'-NGG-3' besteht, bei dem „N“ beliebig für jede der vier Basen der DNA stehen kann. Der Doppelstrangbruch wird zwischen dem dritten und vierten Nukleotid, von der PAM-Stelle gesehen, eingeführt. Induziert wird die Expression der Endonuklease *Cas9* bei der genomischen Mutagenese über den Promotor P_{TET} durch Anhydrotetracyclin (aTC). Außerdem codiert das Plasmid pCas9-CR4 für den Repressor TetR, welcher ebenfalls unter der Kontrolle des aTC-induzierbaren Promotors P_{TET} steht. Dies sorgt dafür, dass unter Abwesenheit des Induktors aTC, TetR die Transkription von *cas9* reprimiert, sodass erst nach der Induktion Doppelstrangbrüche eingeführt werden und nicht ein Teil der Zellen, die nur das pCas9-CR4 tragen aufgrund der *leaky* Expression nicht überleben. Zur Verstärkung der Reprimierung wurde ein zweiter konstitutiver Promotor *upstream* von *tetR* eingeführt. Für die noch stärkere Kontrolle über die Expression von *cas9*, wurde eine SsrA-Markierung an *cas9* gehängt, welche als Erkennungssequenz für die Protease ClpP gilt und zu einem schnelleren Abbau von *Cas9* führt (McGinness/Baker/Sauer 2006; Reisch/Prather 2015).

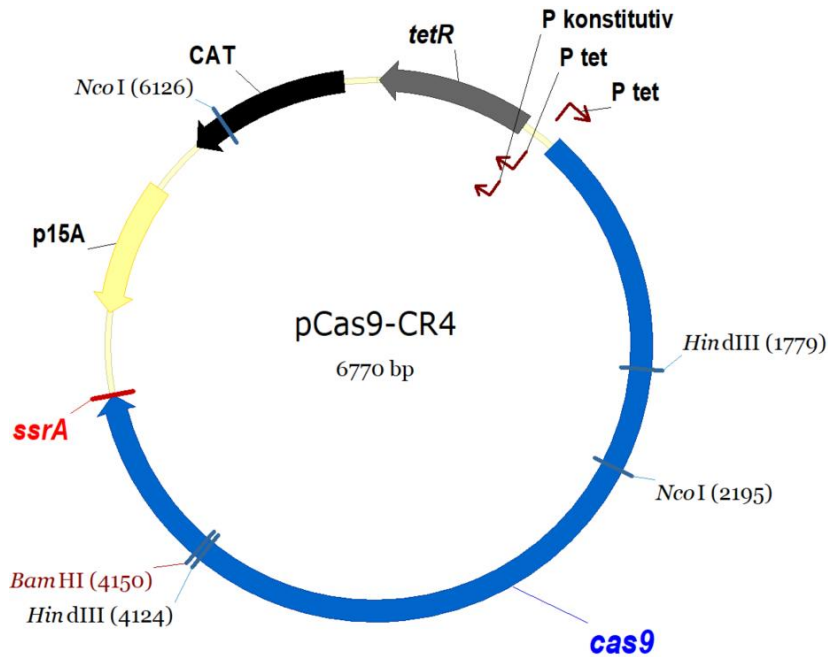


Abbildung 8.2–8: Plasmidkarte von pCas9-CR4

Das 6770 bp große Plasmid pCas9-CR4 mit dem origin of replication p15A (als hellgelber Blockpfeil dargestellt) trägt eine Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) (schwarzer Blockpfeil), sodass eine Chloramphenicolresistenz für die Selektion vermittelt wird. Das Gen tetR (dunkelgrauer Blockpfeil), welches für den Repressor TetR codiert und das Gen cas9 (blauer Blockpfeil), welches für die Endonuklease Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* (SsrA-markiert) codiert, werden über den Anhydrotetracyclin-induzierbaren Promotor P_{TET} reguliert. Unter Abwesenheit des Induktors aTC, reprimiert TetR dementsprechend die Transkription von cas9. Zur Verstärkung der Reprimierung wurde ein zweiter konstitutiver Promotor upstream von tetR eingeführt. Ein Promotor (P) ist jeweils als kleiner dunkelroter Pfeil symbolisiert. Die Restriktionsendonukleasen (BamHI) sind in dunkelrot dargestellt, sobald sie nur eine Erkennungssequenz im Plasmid aufweisen und in schwarz, wenn mindestens zwei Erkennungssequenzen vorliegen, wie bei NcoI und HindIII. Die Zahlen in den Klammern beschreiben die Position der Erkennungssequenz im Plasmid.

Das Plasmid pKDsgRNA-ack (vgl. Abbildung 8.2–9) ist ein Abkömmling des Plasmids pKD46 von Datsenko and Wanner für die homologe Rekombination (Datsenko/Wanner 2000). Dementsprechend handelt es sich auch bei dem Plasmid pKDsgRNA-ack um ein *low-copy* Plasmid mit dem temperatursensitiven pSC101 *origin of replication*. Das für die Replikation mit pSC101 benötigte Protein RepA liegt dafür in einer temperatursensitiven (ts) Variante vor (Armstrong et al. 1984). Die optimale Wachstumstemperatur der Stämme, die dieses Plasmid tragen, liegt daher bei nur 30 °C. Eine höhere Temperatur führt zum Plasmid Curing (vgl. Kapitel 8.2.2.10.3). Als Selektionsmarker codiert *aadA* für eine Aminoglykosid-Adenyltransferase und vermittelt eine Spectinomycinresistenz (Hollingshead/Vapnek 1985). Des Weiteren codiert das Plasmid pKDsgRNA-ack, wie auch das Plasmid pKD46, für die Gene *gam*, *beta*, *exo* des λ -Red-Systems der homologen Rekombination. Diese Gene stehen unter der Kontrolle des durch L-Arabinose induzierbaren Promotors P_{araB} des Arabinose-Operons. Für die Regulation des Promotors wird zusätzlich das Gen *araC* benötigt, welches für das L-Arabinose regulierende Protein codiert (Guzman et al. 1995). Als Unterschied zum Plasmid pKD46 wurde ein Sequenzabschnitt ergänzt, der für die sgRNA (*single-guide* RNA) codiert und essenziell für

die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/Cas9-System ist (Reisch/Prather 2015). Die Expression der sgRNA steht ebenfalls unter der Kontrolle des aTC-induzierbaren Promotors P_{TET} , wie auch *cas9* im Plasmid pCas9-CR4. Bei der sgRNA handelt es sich um eine künstliche RNA, welche Bestandteile der crRNA und der tracrRNA, welche *Cas9* aus *Streptococcus pyogenes* ursprünglich bindet, kombiniert (Jinek et al. 2012). Der Bereich der crRNA der sgRNA umfasst 20 Nukleotide, die dem Protospacer *upstream* der PAM-Stelle entsprechen und dafür sorgen, dass *Cas9* an diese Stelle im Genom geführt wird, um den Doppelstrangbruch dort einzuführen (vgl. Abbildung 8.2–10). In dem Plasmid pKDsgRNA-ack sind diese 20 Nukleotide der sgRNA aus dem Gen *ack*, in dem durch die no-SCAR Methode eine genomische Mutagenese vollzogen werden sollte (Reisch/Prather 2015). Um sämtliche andere Bereiche im Genom von *Escherichia coli* zu adressieren, konnte das Plasmid pKDsgRNA-ack als Vorlage genutzt werden und nur die 20 Nukleotide wurden dementsprechend durch eine ebenso kurze Sequenz des gewünschten Zielgens, in dem eine Mutation eingeführt werden sollte, ausgetauscht. Methodisch wurde dieser Austausch in dieser Arbeit in zwei verschiedenen Varianten durchgeführt (vgl. Kapitel 5.3.1.1, 5.3.2.1.1 und 5.3.2.2.1), welche sich an dem Protokoll von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather orientieren (Reisch/Prather 2017).

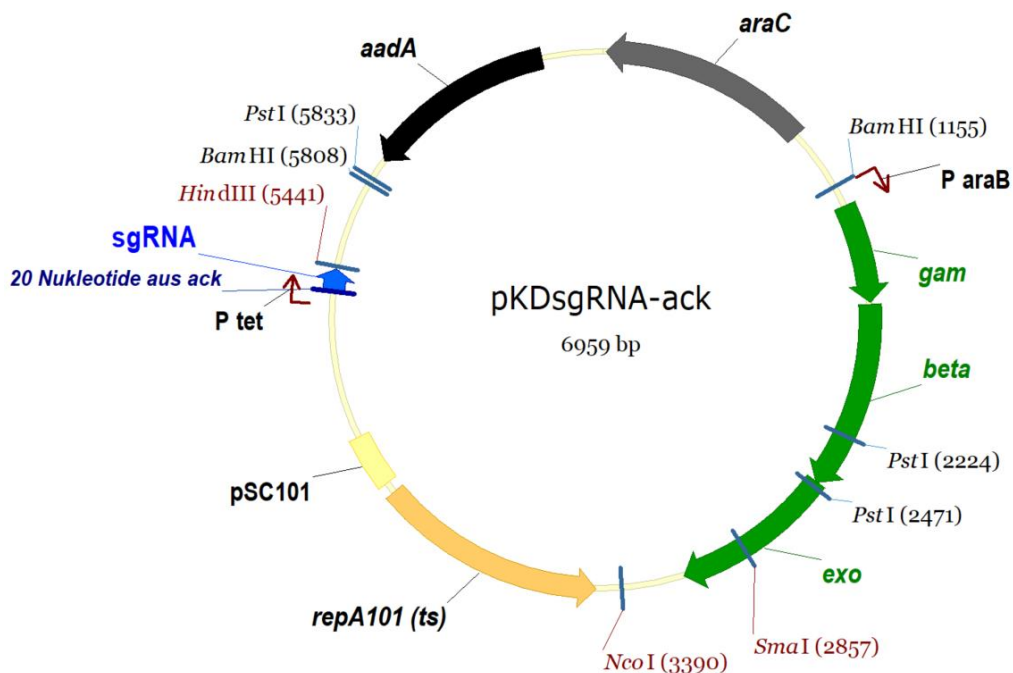


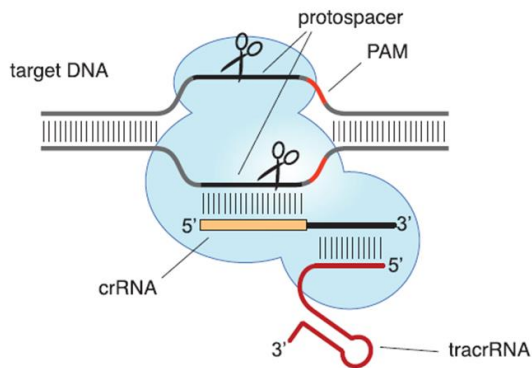
Abbildung 8.2–9: Plasmidkarte von pKDsgRNA-ack

Das 6959 bp große Plasmid pKDsgRNA-ack ist ein Derivat des Plasmids pKD46 der homologen Rekombination und besitzt daher ebenfalls den temperatursensitiven origin of replication pSC101 (als hellgelber Block dargestellt). Das für die Replikation mit pSC101 benötigte Protein RepA liegt dafür in einer temperatursensitiven (ts) Variante vor (helloranger Blockpfeil). Das Plasmid trägt das Gen *aadA* (schwarzer Blockpfeil), welches für eine Aminoglykosid-Adenyltransferase codiert und damit eine Spectinomycinresistenz vermittelt. Außerdem trägt es die Gene *gam*, *beta*, *exo* (grüne Blockpfeile) des λ -Red-Systems der homologen Rekombination. Sie stehen unter der Kontrolle des durch L-Arabinose induzierbaren Promotors P_{araB} des Arabinose-Operons. Für die Regulation des Promotors wird zusätzlich das Gen *araC* (dunkelgrauer Blockpfeil) benötigt, welches für das L-Arabinose regulierende Protein codiert. Zusätzlich enthält das Plasmid einen Sequenzabschnitt, der für die

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

sgRNA (single-guide RNA) (blauer Blockpfeil) codiert und essenziell für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/Cas9-System ist. Sie enthält in diesem Plasmid die 20 Nukleotide des Gens *ack*. Die Expression der sgRNA steht unter der Kontrolle des aTC-induzierbaren Promotors P_{TET} . Ein Promotor (P) ist jeweils als kleiner dunkelroter Pfeil symbolisiert. Die Restriktionsendonukleasen (*HindIII*, *SmaI* und *NcoI*) sind in dunkelrot dargestellt, sobald sie nur eine Erkennungssequenz im Plasmid aufweisen und in schwarz, wenn mindestens zwei Erkennungssequenzen vorliegen, wie bei *BamHI* und *PstI*. Die Zahlen in den Klammern beschreiben die Position der Erkennungssequenz im Plasmid.

Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex



Cas9 programmed by single chimeric RNA

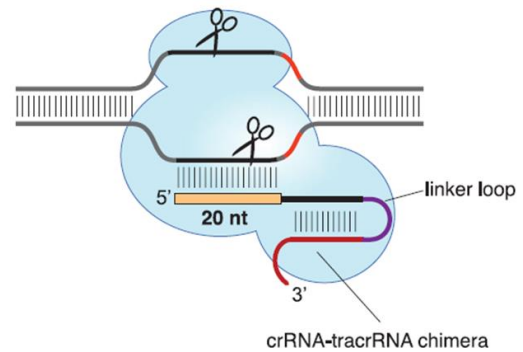


Abbildung 8.2–10: Darstellung von crRNA und tracrRNA bzw. single chimeric RNA im Zusammenspiel mit Cas9 (Jinek et al. 2012, Fig. 5. (A))

Links: Ursprüngliches Zusammenspiel von crRNA und tracrRNA mit Cas9 aus *Streptococcus pyogenes*. Die crRNA bindet an die Protospacer-Sequenz und Cas9 schneidet den Doppelstrang der Ziel-DNA (target DNA) upstream der PAM-Stelle.

Rechts: Die künstlich konstruierte sgRNA (single guide RNA bzw. single chimeric RNA) bildet eine Kombination aus crRNA und tracrRNA, verbunden über einen linker loop. Die eigentliche crRNA kann durch beliebige 20 Nukleotide ausgetauscht werden, um die entsprechende Ziel-DNA zu adressieren.

Generell wurde für die Konstruktion der pKDsgRNA-Plasmide zunächst die 20 Nukleotide umfassende Sequenz des gewünschten Gens, in dem die Mutation eingeführt werden sollte, ausgewählt. Dazu wurde in der Zielgenesequenz nach einer 5'-NGG-3' PAM-Stelle, welche im Idealfall maximal 15 bp (inklusive dem 5'-NGG-3') von der gewünschten Mutationsstelle entfernt lag, gesucht (Reisch/Prather 2017). Auf welchem Strang dabei die PAM-Stelle lag, war nicht relevant. Jedoch musste diese 3' zur gewünschten Mutationsstelle liegen, sodass für die Sequenz 5'-N₂₀NGG-3' galt. Die 20 Nukleotide, ohne die 5'-NGG-3' PAM-Stelle und noch ohne die einzuführende Mutation, wurden für den Austausch der 20 Nukleotide von dem Gen *ack* im Plasmid pKDsgRNA-*ack* genutzt. Bevor das neue pKDsgRNA-Plasmid konstruiert wurde, erfolgte ein Test der ausgewählten 20 Nukleotide auf sogenannte *off-target* Effekte. Dabei wird überprüft, ob der kurze ausgewählte Sequenzbereich spezifisch für das Gen ist und es sich nicht um ein wiederholendes Motiv handelt. Damit Cas9 einen spezifischen Doppelstrangbruch an bekannter Stelle einführt, darf die N₂₀-Sequenz in der Suche gegen das Referenzgenom nur eine Bindung aufzeigen. Mittlerweile gibt es zahlreiche kleine Programme zur Untersuchung dieser Sequenzspezifität. In dieser Arbeit wurde der Cas-OFFinder verwendet

(Bae/Park/Kim 2014; Molecular Genome Engineering Lab - Hanyang University Korea 2016). Bei diesem Programm kann die verwendete Endonuklease, hier „SpCas9 from *Streptococcus pyogenes*: 5'-NGG-3'“, und das Genom, mit dem gearbeitet wird, ausgewählt werden. Da der in dieser Arbeit genutzte Wildtyp-Stamm (GK 571) dem Stamm *Escherichia coli* CFT073 recht ähnlich ist und dieses Genom in dem Cas-OFFinder hinterlegt ist, wurden die *off-target* Effekte an diesem Stamm ermittelt. Nach der Eingabe der 20 Nukleotide im FASTA Format in 5'→3' Richtung läuft der Sequenzabgleich gegen das Referenzgenom. Wurde durch das Programm nur ein exakter Treffer ermittelt, konnte die Konstruktion des pKDsgRNA-Plasmids mit dieser Sequenz ausgeführt werden.

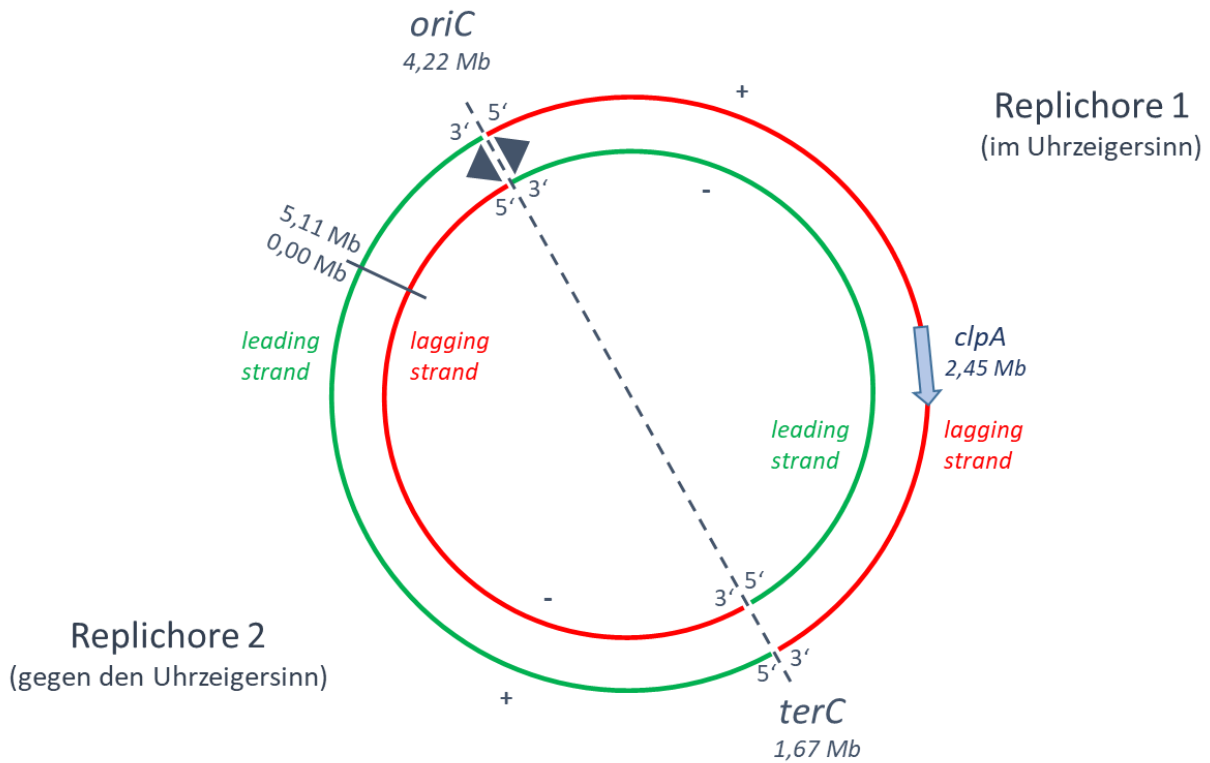
Wie bereits erwähnt, erfolgte die Konstruktion der pKDsgRNA-Plasmide bzw. der Austausch der spezifischen 20 Nukleotide in zwei verschiedenen Varianten. Das erste verwendete Plasmid pKDsgRNA-HPclpA wurde über SOEing, einer Fusions-PCR, (vgl. Kapitel 8.2.2.2.2) konstruiert. Der genaue Ablauf ist in den Ergebnissen unter der Kapitelnummer 5.3.1.1 beschrieben. Die weiteren pKDsgRNA-Plasmide wurden methodisch über eine Art inverse PCR, der *Round-the-horn* Klonierung, angefertigt (vgl. Kapitel 8.2.2.2.3). Detailliert ist dieser Prozess auch im Ergebnisteil in den Kapiteln 5.3.2.1.1 und 5.3.2.2.1 zu finden.

Sobald ein Laborsicherheitsstamm, hier wurde der Stamm *E. coli* K12 DH5 α (GK 409) verwendet, mit dem pKDsgRNA-Plasmid transformiert war, konnte dieses Plasmid und auch das Plasmid pCas9-CR4 mittels dem Monarch[®] Plasmid Miniprep Kit von NEB isoliert werden (vgl. Kapitel 8.2.2.1.3). Im Anschluss wurde der gewünschte Stamm, bei dem die genomische Mutagenese vollzogen werden sollte, zunächst mit dem Plasmid pCas9-CR4 über die Calciumchlorid-Methode (vgl. Kapitel 8.2.2.8.1) transformiert. Die Selektion erfolgte auf Chloramphenicol bei 37 °C. Anschließend wurde der resultierende Stamm mit dem zweiten Plasmid, nämlich dem pKDsgRNA-Plasmid mit der gewünschten N₂₀-Sequenz, transformiert. Für diese Transformation wurde die Elektroporation (vgl. Kapitel 8.2.2.8.2) angewendet. Angezogen wurden die Transformanden aufgrund des temperatursensitiven *origin of replication* des pKDsgRNA-Plasmids nun bei 30 °C. Die Selektion fand auf den beiden Antibiotika Chloramphenicol und Spectinomycin statt, sodass gesichert war, dass der Stamm beide Plasmide trug. Kontrolliert wurde dies außerdem über die Isolierung der Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (vgl. Kapitel 8.2.2.1.2) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 8.2.2.4). Damit war der Bakterienstamm für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System vorbereitet.

8.2.2.10.2 Übertragung der Mutation durch ein Oligonukleotid

Die Übertragung der Mutation bei der genomischen Mutagenese mit dem CRISPR/*Cas9*-System erfolgte über ein längeres Oligonukleotid, welches im Vergleich zum Ausgangsstamm die gewünschte

einzuführende Mutation trägt. Dieses in etwa 80 nt lange Oligonukleotid wurde so entwickelt, dass es den Sequenzbereich der Mutationsstelle gut abdeckt und bis auf die gezielte Mutation genau der Sequenz des Ausgangsstammes entsprach. Im Idealfall lag die Mutation in der Mitte, jedoch sollte sie sich nicht näher als 15 nt des Endes des Oligonukleotids befinden (Reisch/Prather 2017). Des Weiteren galt zu beachten, dass dieses Oligonukleotid mit dem *lagging strand* korrespondierte. Um sicher zu gehen, welche Sequenz für das Oligonukleotid gewählt werden sollte, wurde überprüft auf welchem Replichore das Zielgen liegt. Dafür konnten nicht die Angaben von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather verwendet werden (Reisch/Prather 2017, S. 31.8.4), da sich diese auf den Bakterienstamm *Escherichia coli* MG1655 beziehen und der in dieser Arbeit genutzte Wildtyp-Stamm anders aufgebaut ist. Das Genom des verwendeten Wildtyp-Stammes ist mit 5,11 Megabasen (= 5.110.000 bp) etwas größer und der *origin of replication (oriC)* ist im Vergleich zum *E. coli* MG1655 umgekehrt und komplementär (engl.: *reverse complement*), daher musste das Model für den Wildtyp einmal gespiegelt werden. Aus der Abbildung 8.2–11 ergibt sich, welche der dargestellten Eltern-DNA-Stränge während der Replikation als Vorlage für die kontinuierliche Synthese des Leitstrangs (engl.: *leading strand*) bzw. die diskontinuierliche des Folgestrangs (engl.: *lagging strand*) dienen. Außerdem wird die Einteilung in Replichore 1 bzw. 2 für den in dieser Arbeit genutzten *Escherichia coli* Wildtyp (GK 571) ersichtlich. Als Replichore 1 wird die Hälfte des Genoms bezeichnet, die ab dem *origin of replication* im Uhrzeigersinn, und die andere Hälfte, die auf dem Replichore 2 liegt, gegen den Uhrzeigersinn repliziert wird. Als Beispiel ist das Gen *clpA* eingezeichnet, welches im Rahmen dieser Arbeit in den *Escherichia coli* Genomen gezielt mit dem CRISPR/Cas9-System mutiert wurde. In dem Wildtyp-Stamm (GK 571) ist *clpA* auf dem Replichore 1 bei ca. 2,45 Megabasen lokalisiert und die kodierende Sequenz ist auf dem (+)-Strang. Um mit dem etwa 80 nt langen Oligonukleotid mit dem *lagging strand* zu korrespondieren, wurde das *reverse complement* der 5'→3' *clpA*-Gensequenz genutzt. Dieses Oligonukleotid entsprach damit einem 3'-Primer. Für alle anderen Möglichkeiten je nach Lage und Orientierung des jeweiligen Zielgens, können die benötigten Sequenzen für das Oligonukleotid in der Tabelle 8.2–19 abgelesen werden.



► Richtung der Replikation

Abbildung 8.2–11: Modell zur Veranschaulichung der Richtung der Replikation (nach: Bhagwat et al. 2016, Fig. S2) Dieses Modell wurde in unserer Arbeitsgruppe speziell für das Genom von *E. coli* WT (GK 571) umgeschrieben, da in diesem Bakterienstamm der *oriC*-Locus im Vergleich zu dem von *E. coli* MG1655, welcher von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather verwendet wurde (Reisch/Prather 2017, S. 31.8.4), reverse complement ist. Die zugehörige Einteilung in Replichore 1 bzw. 2 ist in dem umgeschriebenen Modell dargestellt. Außerdem sind die Eltern-DNA-Stränge, die während der Replikation als Vorlage für die kontinuierliche Synthese des Leitstrangs (engl.: leading strand) dienen in Grün bzw. als Vorlage für die diskontinuierliche Synthese des Folgestrangs (engl.: lagging strand) in Rot dargestellt. Als Beispiel ist das Gen *clpA* eingezeichnet, welches bei einer Position von ca. 2,45 Mb im Genom von *E. coli* WT (GK 571) lokalisiert ist.

Tabelle 8.2–19: Wahl der Sequenz des Oligonukleotids je nach Lage und Orientierung des Zielgens im Genom von *E. coli* WT (GK 571) um dem lagging strand zu korrespondieren

Position des Zielgens im Genom von <i>E. coli</i> WT (GK 571)	Replichore	Strang der kodierenden Sequenz des Zielgens	Sequenz des Oligonukleotids
> 1,67 Mb und < 4,22 Mb	1	(+)-Strang (Bsp. <i>clpA</i>)	(-)-Strang Sequenz, = komplementär zur Gensequenz
> 1,67 Mb und < 4,22 Mb	1	(-)-Strang	(-)-Strang Sequenz, = Gensequenz
> 4,22 Mb oder < 1,67 Mb	2	(+)-Strang	(+)-Strang Sequenz, = Gensequenz
> 4,22 Mb oder < 1,67 Mb	2	(-)-Strang	(+)-Strang Sequenz, = komplementär zur Gensequenz

Sobald eine etwa 80 nt lange Oligonukleotidsequenz mit mittig positionierter Mutation und mithilfe der Tabelle 8.2–19 gefunden wurde, war es zusätzlich notwendig diese auf Sekundärstrukturen zu überprüfen. Dazu wurde das kleine Programm mFold im Internet genutzt (Zuker 2003; Zuker o. J.). Dort konnte die Sequenz des Oligonukleotids im FASTA-Format eingetragen werden und mit dem Anklicken des Knopfes „Fold DNA“ wurden die Ergebnisse generiert. Dabei konnten unter dem Punkt „View Individual Structures“ die einzelnen Faltungsenergien als ΔG in kcal/mol angesehen werden. Bei Werten, die größer als -12,5 kcal/mol waren, konnte das Oligonukleotid für die genomische Mutagenese mit dem CRISPR/Cas9-System verwendet werden (Reisch/Prather 2017, S. 31.8.4). Sobald der Wert jedoch kleiner als -12,5 kcal/mol war, also eine größere negative Zahl aufwies, musste das Oligonukleotid optimiert werden. Dies konnte über die leichte Verschiebung des Sequenzbereiches des Oligonukleotids *upstream* oder *downstream* geschehen, sodass die eingefügte Mutation nicht mehr ganz mittig von den etwa 80 nt lag. Sobald eine erneute Überprüfung der Sekundärstruktur ein geeignetes ΔG aufzeigte, konnte das Oligonukleotid mit dieser Sequenz für die weitere Durchführung der genomischen Mutagenese bestellt werden. Dabei galt es zu beachten, dass das Oligonukleotid modifiziert werden sollte, und zwar mit Phosphothioat-Brücken (Reisch/Prather 2017). Die letzten zwei bis vier Nukleotide wurden anstelle der nativen Phosphodiester-Brücken mit Phosphothioat-Brücken miteinander verknüpft, dabei wurde ein Sauerstoff- durch ein Schwefelatom ersetzt, wie in Abbildung 8.2–12 zu sehen. In dieser Arbeit wurden jeweils die letzten vier Nukleotide beider Enden des Oligonukleotids über die Phosphothioat-Brücken verknüpft (vgl. Tabelle 8.1–3). Durch diese Modifikationen wurden die Oligonukleotide vor dem Abbau durch extra- und intrazelluläre Nukleasen geschützt (Putney/Benkovic/Schimmel 1981).

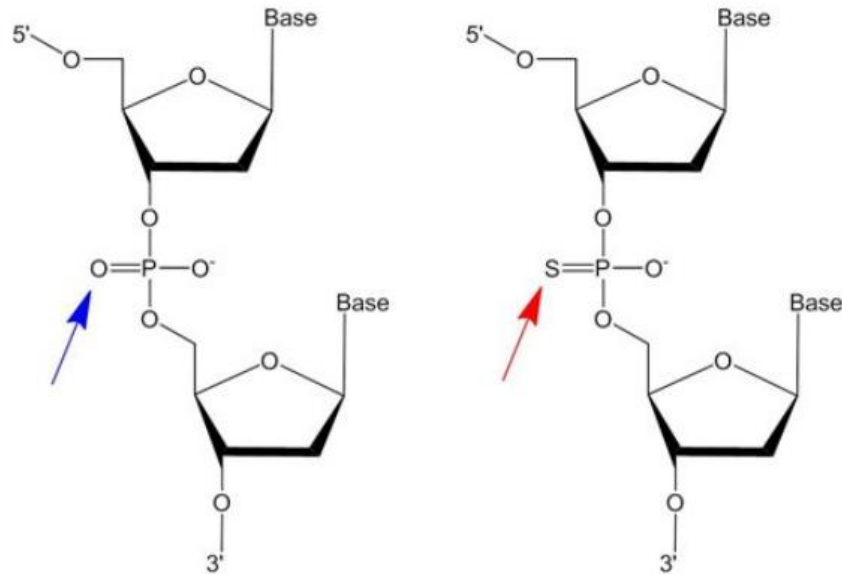


Abbildung 8.2–12: Verknüpfung der Oligonukleotide (Merck KGaA - Sigma-Aldrich® o. J., Figure 1)

Links: Native Verknüpfung über Phosphodiester-Brücken (blauer Pfeil). Rechts: Modifizierte Verknüpfung über Phosphothioat-Brücken, bei der ein Sauerstoff- durch ein Schwefelatom ersetzt wurde (roter Pfeil).

Für die Durchführung der genomischen Mutagenese mit dem CRISPR/Cas9-System bzw. speziell mit dem no-SCAR System von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather (Reisch/Prather 2015), wurden die zuvor erzeugten Stämme, die bereits die beiden Plasmide, pCas9-CR4 und das pKDsgRNA-Plasmid mit der gewünschten N₂₀-Sequenz, trugen (vgl. Kapitel 8.2.2.10.1), benötigt. Wie in Kapitel 8.2.2.7.2 beschrieben, wurden zunächst elektrokompente Zellen hergestellt. Die Anzucht der Stämme erfolgte in SOB-Medium, welchem zur Selektion Chloramphenicol und Spectinomycin zugesetzt war. Als Unterschied zu der herkömmlichen Herstellung kompetenter Zellen, wurden für diese Anwendung die Bakterienzellen bei 30 °C und 130 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD_{600 nm}) von 0,4-0,5 angezogen. Anschließend folgte die Induktion der Gene des λ-Red-Systems (pKDsgRNA-Plasmid) mit einer L-(+)-Arabinose-Lösung in einer Endkonzentration von 0,2 % für 20-30 Minuten bei 30 °C und 130 rpm. Nachdem die Zellen im Anschluss für mindestens fünf Minuten auf Eis standen, erfolgten die herkömmlichen Wasch- und Zentrifugationsschritte zur Herstellung der elektrokompenten Bakterienzellen (vgl. Kapitel 8.2.2.7.2).

Die angeschlossene Elektroporation fand grundsätzlich unter den Bedingungen, wie sie in dem Kapitel 8.2.2.8.2 beschrieben wurde, statt. Die methodischen Abweichungen sind im Folgenden näher beschrieben. Anstelle der Plasmid-DNA wurde das Oligonukleotid mit den kompetenten Zellen vermengt und in eine vorgekühlte trockene Elektroporationsküvette überführt. Das Oligonukleotid kam vom Bestellanbieter im lyophilisierten Zustand und wurde standardmäßig, wie auch sämtliche verwendeten Primer, laut Analysenzertifikat in dH₂O aufgenommen, dass eine Konzentration von

100 pmol/ μL eingestellt wurde. Anders als bei den Primern für z. B. eine PCR, wurde mit dieser Stammlösung des Oligonukleotids direkt weitergearbeitet. Es wurden 2 μL , also 200 pmol für die Elektroporation mit den kompetenten Zellen eingesetzt. Der elektrische Impuls (1,8 kV/200 Ω /25 μF) für 4,8-5,0 Millisekunden erfolgte auf herkömmliche Weise und nachdem 1 mL SOC-Medium der Bakteriensuspension zugefügt worden waren, erfolgte die Regeneration der Zellen für 60 Minuten bei 30 °C und 130 rpm. Im Unterschied zu einer Standard-Elektroporation wurden die Zellen im Anschluss zum einen nicht nur auf die Selektionsantibiotika, deren Resistenz in dem Stamm bereits durch die vorliegenden beiden Plasmide vermittelt wurde, ausgestrichen, sondern dem LB-Agar war zudem Anhydrotetracyclin (aTC) in einer Konzentration von 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zugesetzt worden. Dies sorgte über den aTC-induzierbaren Promotor P_{TET} für die Induktion der Expression der Gene *cas9* und der sgRNA, wie oben bereits detailliert beschrieben. Zum anderen galt die Besonderheit zu beachten, dass die regenerierte Bakteriensuspension aus dem Transformationsansatz zunächst in physiologischer Kochsalzlösung in fünf Schritten jeweils 1:10 verdünnt wurde, bevor sie auf den LB-Agar mit Chloramphenicol, Spectinomycin und Anhydrotetracyclin ausgestrichen wurde. Dies war wichtig, da es durch die Zugabe von aTC nicht zu so einer starken Zellzahlabnahme kam, wie bei der klassischen Selektion, bei der eine Resistenz über ein Plasmid vermittelt wird und nur diejenigen Bakterienzellen auf dem Antibiotikum lebensfähig sind, die dieses Plasmid tragen. Von jeder Verdünnung wurden 200 μL pro Agarplatte ausgestrichen. Diejenigen Kolonien, die auf einer Agarplatte einzeln abgegrenzt gewachsen waren, konnten im Anschluss näher charakterisiert werden, indem über eine entwickelte ARMS-PCR (vgl. Kapitel 8.2.2.2.4 bzw. die Kapitel 5.3.1.3, 5.3.2.1.3 und 5.3.2.2.3) die Sequenz auf die spezifische Mutation untersucht werden konnte. Des Weiteren wurde eine Kontrolle durchgeführt, indem ein Ansatz der elektrokompenten Bakterienzellen ohne zugefügtes Oligonukleotid dem elektrischen Impuls ausgesetzt wurde und davon die Verdünnungen, vergleichbar mit dem eigentlichen Transformationsansatz, einmal als Wachstumskontrolle nur auf Spectinomycin und Chloramphenicol ausgestrichen wurden und als Aktivitätskontrolle auf Spectinomycin, Chloramphenicol und Anhydrotetracyclin. Dabei sollte sich eine deutliche Abnahme in der Anzahl der lebenden Bakterienzellen um mindestens das Hundertfache ergeben. Die Endonuklease *Cas9* sorgt unter aTC-Induktion für einen Doppelstrangbruch. Da den Zellen trotz des aktivierten λ -Red-Systems, aber aufgrund der fehlenden Reparaturmatrize, dem Oligonukleotid, eine Reparatur des Doppelstrangbruchs nicht möglich war, sterben diese Zellen ab (Reisch/Prather 2015).

Wenn sämtliche Kontrollen in Ordnung waren, also eine deutliche Abnahme in der Zellzahl zu verzeichnen war, wurden die einzelnen Klone, die aus dem Ansatz mit dem Oligonukleotid hervorgegangen waren, durch eine Passage auf LB-Agarplatten ohne Anhydrotetracyclin gesichert. Im Anschluss wurde die chromosomale DNA mittels Koch-Methode (vgl. Kapitel 8.2.2.1.1) isoliert, um letztendlich

die Klone mit der ARMS-PCR (vgl. Kapitel 8.2.2.2.4) und der Sanger-Sequenzierung (vgl. Kapitel 8.2.2.9.1) auf die gewünschte Mutation zu untersuchen.

8.2.2.10.3 Plasmid Curing

Damit für sich anschließende Experimente die beiden, nach der genomischen Mutagenese nicht mehr benötigten, Plasmide nicht stören bzw. die Mutante unnötig belasten, wurden diese wieder entfernt bzw. die Bakterienstämme von den Plasmiden kuriert (engl.: *Plasmid Curing*). Dazu wurden methodisch zwei verschiedene Strategien verfolgt.

Bei der ersten Variante orientierte sich die Durchführung des Plasmid Curing an dem Protokoll von Christopher R. Reisch und Kristala L. J. Prather und ist nachfolgend methodisch näher beschrieben (Reisch/Prather 2017). Diese Methode wurde angewendet, wenn die Wildtyp-Stämme von den Plasmiden kuriert werden sollten. Zunächst wurde das pKDsgRNA-Plasmid über einen Temperaturshift entfernt, dies war aufgrund des temperatursensitiven *origin of replication* möglich, sodass bei der erhöhten Temperatur keine Replikation des Plasmids stattfand und es in den sich schnell teilenden Zellen herausverdünnt wurde. Dazu wurde von dem gewünschten Stamm, bei dem die Plasmide kuriert werden sollten, eine ÜNK in reinem LB-Medium ohne Antibiotikazusatz angelegt und für 24 Stunden bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Am Folgetag wurde eine Verdünnungsreihe bis zur Stufe 10^{-7} angefertigt und 50 µL der Verdünnungen 10^{-4} bis 10^{-7} wurden auf einzelne LB-Agarplatten, denen Chloramphenicol in einer Konzentration von 35 µg/mL zugesetzt war, ausgestrichen und über Nacht bei 42 °C im Brutschrank inkubiert. Die gewachsenen Einzelkolonien wurden in einem Tüpfeltest sowohl auf LB-Agarplatten mit 50 µg/mL Spectinomycin und reinen LB-Agarplatten zur Kontrolle und Stammanzucht ausgestrichen, sodass eine Zuordnung der einzelnen Stämme im Nachhinein möglich war. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. Diejenigen Bakterienzellen, die nur auf dem reinen LB-Agar Wachstum aufwiesen und nicht auf Spectinomycin, hatten das pKDsgRNA-Plasmid verloren. Ein Bakterienstamm, der das beschriebene Wachstumsverhalten zeigte, wurde im Anschluss von dem Plasmid pCas9-CR4 kuriert. Dazu wurde der Stamm mit dem Plasmid pKDsgRNA-p15 (Addgene #62656) über eine Elektroporation transformiert (vgl. Kapitel 8.2.2.8.2). Abweichend von einer herkömmlichen Elektroporation wurden die Zellen nach dem elektrischen Impuls für zwei bei drei Stunden in SOC-Medium bei 30 °C und 130 rpm regeneriert. Anschließend wurde zur Induktion der Expression der Gene *cas9* und der sgRNA dem Medium Anhydrotetracyclin in einer Konzentration von 0,1 µg/mL zugefügt und die Zellen wurde für weitere zwei Stunden bei 30 °C und 130 rpm inkubiert. *Cas9* führt einen Doppelstrangbruch im *origin of replication* p15A des Plasmids pCas9-CR4 ein und sorgt damit für das Plasmid Curing. Die Zellsuspension wird auf spectinomycin- und anhydrotetracyclin-inhaltigen LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Kolonien

in einem erneuten Tüpfeltest überprüft. Dazu wurde Zellmaterial auf LB-Agarplatten mit 35 µg/mL Chloramphenicol und reinen LB-Agarplatten zur Kontrolle und Stammanzucht ausgestrichen, sodass die Zuordnung wieder nachvollziehbar war. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C. Die Bakterienzellen, die nur auf reinem LB-Agar ein Wachstum aufwiesen, waren von den beiden Plasmiden kuriert worden. Das letzte Plasmid pKDsgRNA-p15 wurde, wie oben bereits beschrieben, über einen Temperaturshift entfernt und erneut über einen Tüpfeltest bestätigt. Der vollständig von Plasmiden kurierte Bakterienstamm durfte nur auf LB-Agar anwachsen, jedoch weder auf spectinomycin- noch auf chloramphenicolhaltigem LB-Agar.

Die zweite Variante des Plasmid Curing wurde bei den aus dem Wildtyp selektierten Mutanten *E. coli* MIII (GK 574) und *E. coli* MIVa (GK 575) angewendet. Hierbei handelt es sich um einen deutlich verkürzten Ablauf. Nachdem eine ÜNK des zu kurierenden Bakterienstammes bei 37 °C in antibiotikafreiem LB-Medium angezogen wurde, erfolgte am Folgetag die Erstellung einer Verdünnungsreihe bis 10^{-6} . Von den Verdünnungen 10^{-5} und 10^{-6} wurden jeweils 50 µL auf eine reine LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 42 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Tüpfeltest bei 30 °C Inkubationstemperatur durchgeführt. Diejenigen Bakterienkolonien, die nur auf reinem LB-Agar wuchsen und weder Wachstum auf Spectinomycin noch auf Chloramphenicol zeigten, waren vollständig von den beiden Plasmiden kuriert. Die zum Teil hoch resistenten Mutanten zeigten auch aufgrund eines anderen Fitnessverhaltens erfahrungsgemäß die Eigenschaft, dass sie, sobald kein Selektionsdruck vorhanden ist, nicht benötigte Plasmide nicht mehr replizieren und diese dann über mehrere Passagen herausverdünnt werden konnten. Diese Eigenschaft wurde für ein schnelles und einfaches Plasmid Curing dieser Stämme ausgenutzt.

8.2.3 Arbeiten mit RNA

Im Unterschied zu dem Arbeiten mit DNA, sind bei dem Arbeiten mit RNA zusätzlich einige Aspekte zu beachten. Auf die Vermeidung von Kontaminationen sollte noch stärker geachtet werden, da die Enzyme Ribonukleasen (*RNasen*) ubiquitär vorkommen und es sich um stabile und aktive Enzyme handelt. Kleinste Mengen sind in der Lage durch Degradation der RNA diese zu zerstören. Daher wurden alle Arbeiten mit RNA an einem gesonderten Arbeitsplatz durchgeführt, bei dem zu Beginn und nach Abschluss der Tätigkeiten dort sämtliche Flächen und Materialien mit dem Reagenz RNase AWAY™, welches *RNasen*- und DNA-Kontaminationen entfernt, gründlich abgewischt wurden. Zudem wurden bei allen Arbeiten puderfreie Nitrilhandschuhe getragen, *RNase*-freie Einmalmaterialien wie z. B. Eppendorf-Gefäße verwendet und ein gesonderter Pipettensatz genutzt. Die Pipettenspitzen wurden fertig gesteckt erworben und waren zusätzlich mit Filtern ausgestattet, um Kontaminationen zu vermeiden. Verwendetes Wasser wurde stets auch *RNase*-frei eingesetzt. Dabei kam es

auf die benötigte Menge und den Verwendungszweck an. Kleinste Mengen wurden mit gekauftem Reinstwasser (Water for Molecular Biology, RT-PCR Tested (# H2OMB0106) von Merck Millipore) pipettiert. Zum Ansetzen von Pufferlösungen wurde DEPC-Wasser verwendet. Dafür wurde eine Endkonzentration von 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) dem Wasser aus der Millipore RiOs™ 5 Anlage zugesetzt, über Nacht verschlossen inkubieren gelassen und am Folgetag autoklaviert. Das DEPC zerstört die *RNasen* und zerfällt beim Autoklavieren selbst in Ethanol und Kohlenstoffdioxid. Zum Spülen von Gelkammern wurde das *RNase*-freie Reinstwasser aus der Milli-Q® Reference A+ System Anlage genutzt.

8.2.3.1 Zellernte für die RNA-Isolierung

Die Anzucht der Stämme, von denen die RNA isoliert werden sollte, erfolgte zunächst als Übernachtskultur in 3 mL LB-Medium (vgl. Kapitel 8.2.1.1.2) und davon ausgehend am Folgetag 1:100 verdünnt als Tageskultur. Diese wurde bei der optimalen Wachstumstemperatur des Bakterienstammes, meist 37 °C, unter Schütteln bei 130 rpm bis zu einer optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) von 0,5 inkubiert. Bei Erreichen des Wachstumsgrades, wurden zum einen 500 µL der Kultur entnommen für eine KBE-Bestimmung (vgl. Kapitel 8.2.1.2) und zum anderen wurden 500 µL Bakteriensuspension in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, in dem bereits 1 mL RNAprotect® Bacteria Reagent (QIAGEN GmbH) vorgelegt waren. Dieser Ansatz wurde für fünf Sekunden mit einem Vortexer gründlich vermengt und anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für zehn Minuten bei 5000 x *g*. Nachdem der Überstand abgossen wurde und das Eppendorf-Gefäß kurz über Kopf gedreht abgestellt wurde, konnte das unsichtbare Pellet bei -80 °C eingefroren werden. Das RNAprotect® Bacteria Reagent diente in dieser Zeit als Schutz und der Stabilisierung der gesamten RNA in den Bakterien. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C für maximal vier Wochen bis im Anschluss die RNA isoliert wurde. (QIAGEN GmbH 2020b, S. 19-21). Je Bakterienstamm wurden drei Übernachtskulturen angelegt und die Pellets wie oben beschrieben geerntet. Dadurch wurden jeweils drei voneinander unabhängige, biologische Proben herangezogen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen.

8.2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA mit *DNase*-Behandlung und Aufreinigung

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das bei -80 °C gelagerte Zellpellet (vgl. Kapitel 8.2.3.1) zunächst auf Eis aufgetaut und darauf mit TE-Puffer, dem kurz vor dem Verwenden Lysozym in einer Endkonzentration von 1 mg/mL zugesetzt war, vermengt. Durch kräftiges Vermengen mithilfe des Vortexers wurde das Pellet resuspendiert und anschließend für fünf Minuten bei 25 °C inkubiert. In

diesem Schritt wurden die Zellen aufgeschlossen. Die Isolierung erfolgte mit dem Monarch® Total RNA Miniprep Kit von NEB und wurde im Allgemeinen nach Herstellerangaben für gramnegative Bakterien folgendermaßen durchgeführt (New England Biolabs Inc. 2020e, v. a. S. 11-12). Die mit Lysozym behandelte Bakteriensuspension wurde für die Lyse der Zellen mit 220 µL RNA Lysis Buffer vermengt und für zehn Sekunden durchmischt. Nach Zentrifugation für zwei Minuten bei 16000 x g wurde der Überstand auf die Säule mit dem hellblauen Ring (*gDNA Removal Column*) überführt. Dieser Ansatz wurde für 30 Sekunden bei 16000 x g zur Abtrennung der genomischen DNA (gDNA) zentrifugiert. An der Säulenmembran blieb die gDNA gebunden und mit dem Durchfluss wurde weitergearbeitet, indem 165 µL Ethanol absolut hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren durchmischt wurden. Die zugegebene Menge entsprach einem halben Volumen des Ansatzes und sorgte so dafür, dass RNA ≤ 200 nt bei der Isolierung ausgeschlossen wurden, die restliche RNA jedoch gebunden werden konnte. Diese Ethanol-Mischung wurde auf eine weitere Säule, jedoch mit einem petrolfarbenem Ring (*RNA Purification Column*), pipettiert. In diesem Schritt wurde die RNA an der Säule gebunden und in den folgenden Waschsritten aufgereinigt. Dazu wurden einmal 500 µL RNA Priming Buffer und zweimal je 500 µL RNA Wash Buffer verwendet. Durch jeweilige Zentrifugationsschritte für 30 Sekunden bei 16000 x g wurde der Durchfluss abgetrennt. Der letzte Zentrifugationsschritt wurde zur Trocknung der Membran auf zwei Minuten erhöht, um sämtliche Flüssigkeiten bzw. auch Ethanol des Waschpuffers zu entfernen. Im Anschluss wurden 50 µL *RNase*-freies dH₂O direkt auf die Säule pipettiert, um die RNA von der Säule zu eluieren. Nach einer einminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur, erfolgte die Zentrifugation für 30 Sekunden bei 16000 x g.

Das erhaltene Eluat konnte bei -80 °C gelagert oder auch direkt für die anschließende *DNase*-Behandlung genutzt werden. Bei der Verwendung des Monarch® Total RNA Miniprep Kits von NEB kann die *DNase*-Behandlung auch optional während der Isolierung auf der Säule erfolgen, jedoch zeigte eine angeschlossene Behandlung bessere Ergebnisse. Aus diesem Grund wurden ca. 2 µg isolierte RNA mit *DNase* I und dem zugehörigen Puffer für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Die *DNase*-behandelte RNA wurde in einem letzten Schritt mit dem Monarch® RNA Cleanup Kit von NEB aufgereinigt und aufkonzentriert. Die *DNase* I und der Puffer konnten so abgetrennt werden. Laut Herstellerangaben (New England Biolabs Inc. 2020d, v. a. S. 7) wurde der Reaktionsansatz aus der *DNase*-Behandlung mit *RNase*-freiem dH₂O auf ein Volumen von 50 µL ergänzt. Zusätzlich wurden 100 µL RNA Cleanup Bindung Buffer und 150 µL Ethanol absolut hinzugegeben und vorsichtig invertiert. Der gesamte Ansatz wurde auf die im Kit enthaltene Säule pipettiert und eine Minute bei 16000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die RNA war an der Säulenmembran gebunden. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µL RNA Cleanup Wash Buffer und einminütigen Zentrifugationsschritten bei 16000 x g. 20 µL *RNase*-freies dH₂O wurden im Anschluss direkt auf

die Säulenmembran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute bei Raumtemperatur wurde das Eluat über einen letzten Zentrifugationsschritt von einer Minute bei 16000 x *g* gewonnen. Bis zur Weiterverarbeitung konnte die aufgereinigte RNA bei -80 °C gelagert werden.

8.2.3.3 Qualitätsbestimmung der RNA

Bevor mit der isolierten RNA (vgl. Kapitel 8.2.3.2) weitergearbeitet wurde, erfolgte eine Qualitätsbestimmung dieser. Dazu wurde zunächst eine spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mit dem NanoDrop™ durchgeführt (vgl. Kapitel 8.2.2.5.2). Es wurden dazu die Quotienten aus den Absorptionswerten bei 260 nm und 230 nm bzw. 280 nm betrachtet. Reine RNA liefert ein Absorptionsverhältnis $A_{260/280}$ von 2,0. Bei kleineren Reinheitswerten könnte die Probe mit Proteinen kontaminiert sein. Für das Absorptionsverhältnis $A_{260/230}$ sollten die Werte bei $\geq 2,0$ liegen, ansonsten könnten z. B. organische Bestandteile als Verunreinigung vorliegen. Zeigten sich für die isolierte RNA gute Absorptionsquotienten, so wurde diese zusätzlich elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 150 ng RNA-Isolierung zur Auflösung der Sekundärstrukturen vorab mit dem gleichen Volumen eines 2x RNA-Ladepuffers, welcher Ethidiumbromid und Formamid enthält, für zehn Minuten bei 70 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben sofort auf Eis abgekühlt und vollständig auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen. Wie oben bereits beschrieben, wurde die Elektrophoresekammer zuvor mit einer SDS-Lösung (0,5 %) und danach mit *RNase*-freiem Reinstwasser aus der Milli-Q® Reference A+ System Anlage gespült. Nach der Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 8.2.2.4) konnten unter UV-Licht idealerweise drei distinkte Banden der ribosomalen RNA betrachtet werden. Dabei handelt es um die 23S rRNA, die 16S rRNA und die 5S rRNA. Letztere wird dabei nur schwach im unteren Bereich des Agarosegels sichtbar. Die beiden anderen Banden sollten bei guter Qualität der isolierten RNA als zwei starke distinkte Banden zu erkennen sein. Im Idealfall leuchtet dabei die obere Bande (23S rRNA) doppelt so intensiv wie die der 16S rRNA und deutet so auf intakte RNA hin. Allerdings ist die 23S rRNA deutlich instabiler und somit ist die Qualität der RNA auch noch ausreichend gut, wenn die beiden Banden in etwa die gleiche Intensität aufweisen. Wichtig ist jedoch, dass zusätzlich keine diffusen Banden zu erkennen sind.

8.2.3.4 Quantitative *real-time* PCR (RT-qPCR)

8.2.3.4.1 Primer-Design

Sämtliche Oligonukleotide, die in der quantitativen *real-time* PCR als Primer zum Einsatz kamen, wurden über die „Primer Express® Software for Real-Time PCR, Version 3.0“ entworfen. Hierzu wurde die Sequenz des Gens von Interesse im FASTA-Format eingeladen und mehrere mögliche Primer-

Kombinationen wurden von der Software ermittelt und nach einem sogenannte *Penalty-Score* in eine Rangfolge gebracht. Dabei beachtet die Software die üblichen Kriterien des Primer-Design wie z. B. den ausgeglichenen GC-Gehalt von 30-80 % und einer ähnlichen Schmelztemperatur (T_M) von ca. 60 °C beider Primer. Das amplifizierte Produkt sollte eine Größe von etwa 60 bp aufzeigen (übernommene Voreinstellung der Software: 50-150 bp). Ausgewählt wurde jeweils das Primer-Paar, welches einerseits einen möglichst kleinen Penalty-Score aufwies und dabei andererseits auch im hinteren Bereich des Gens band. Dies galt es zu beachten, damit es zum einen keine unspezifischen Bindungen gab, die zu Nebenprodukten führen würden, und zum anderen keine kurzen abgebrochenen Transkripte miterfasst wurden. Bestellt wurden die so konzipierten Primer für die Expressionsanalysen mit der RT-qPCR in der hochwertigeren Qualität der HPLC-Aufreinigung.

8.2.3.4.2 cDNA-Synthese (Reverse Transkriptase (RT) Reaktion)

Für die quantitative *real-time* PCR wird DNA als Template benötigt. Die isolierte RNA wurde daher in einem ersten Schritt umgeschrieben und diente dabei als Vorlage für die Synthese der cDNA (*complementary* bzw. *copy*). Dieser Schritt kann auch mit dem folgenden kombiniert werden zu einer 1-Schritt-RT-qPCR, jedoch war es hier von Vorteil die beiden Versuchsabläufe zu trennen, um die fertige cDNA für verschiedene Experimente nutzen zu können. Verwendet wurde für die cDNA-Synthese der 2-Schritt-RT-qPCR das LunaScript® RT SuperMix Kit von NEB. Das Kit besteht aus zwei separaten Mastermixen: LunaScript RT SuperMix und No-RT ControlMix. Der LunaScript RT SuperMix beinhaltet die thermostabile Luna® Reverse Transkriptase (RT), welche auch bei höheren Temperaturen befähigt ist, die Synthese des zur RNA komplementären DNA-Stranges zu katalysieren. Des Weiteren ist der rekombinante, murine *RNase* Inhibitor in dem SuperMix enthalten, der die eingesetzte RNA vor dem Abbau schützt. Als Primer wurden keine der mit der Primer Express® Software entworfenen verwendet, die später bei der qPCR Anwendung fanden, sondern wurde bei diesem Kit durch den Einsatz von Random-Hexamer- und poly d(T)-Primern die gesamte RNA in cDNA umgeschrieben. Die Synthese der vollständigen cDNA war besonders vorteilhaft, wenn im Anschluss an eine erste qPCR-Messung in einem weiteren Experiment noch andere Gene vermessen werden sollten. Die cDNA konnte universell eingesetzt werden. In dem SuperMix sind außerdem noch ein Puffer und die dNTPs enthalten. Der zweite Mastermix, der No-RT ControlMix, wurde für die Kontrolle NAC (*no amplification control*) genutzt. Hier sind sämtliche Komponenten des LunaScript RT SuperMixes enthalten mit Ausnahme der Luna® Reversen Transkriptase. In der angeschlossenen qPCR konnte mit dieser Kontrolle überprüft werden, dass die eingesetzte RNA frei von genomischen Kontaminationen war. Die Durchführung der cDNA-Synthese erfolgte nach den Herstellerangaben. Die beiden Ansätze mit dem

zugehörigen Zeitprogramm sind nachfolgend in Tabelle 8.2–20, Tabelle 8.2–21 und Tabelle 8.2–22 dargestellt (New England Biolabs Inc. 2020b).

Tabelle 8.2–20: Standard-Ansatz cDNA-Synthese

Komponente	Volumen (in μL)
5x LunaScript RT SuperMix	4
RNA	150 ng
H ₂ O	ad 20 μL

Tabelle 8.2–21: Standard-Ansatz der Kontrolle (NAC)

Komponente	Volumen (in μL)
5x No-RT ControlMix	4
RNA	150 ng
H ₂ O	ad 20 μL

Tabelle 8.2–22: Standard-Programm für cDNA-Synthese und NAC

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Anzahl der Zyklen
Primer Annealing	25 °C	2 min	1 x
cDNA Synthese	55 °C	10 min	
Hitze-Inaktivierung	95 °C	1 min	

8.2.3.4.3 Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Im Anschluss an die cDNA-Synthese folgt als zweiter Schritt die quantitative *real-time* PCR (qPCR). Diese Variante der PCR, bei der in Echtzeit die Amplifikate quantitativ detektiert werden können, wurde in den frühen 90er Jahren von Higuchi *et al.* entwickelt (Higuchi et al. 1992; Higuchi et al. 1993). Die Methode beruht darauf, dass ein Fluoreszenzfarbstoff dem PCR-Ansatz hinzugefügt wird, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Bei der Amplifikation einer Gensequenz wird mehr Fluoreszenzfarbstoff gebunden, dies sorgt wiederum für eine erhöhte Fluoreszenz. Die Fluoreszenzänderung wird dabei in Echtzeit gemessen und ist proportional zu der Menge an doppelsträngiger DNA, die im Laufe eines PCR-Zyklus amplifiziert wird. In den ersten Zyklen der PCR ist diese Linearität noch nicht gegeben und die noch schwache Fluoreszenz ist nicht von dem Hintergrundrauschen zu unterscheiden. Jedoch in der exponentiellen Phase der PCR steigt die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge des amplifizierten PCR-Produktes. Der PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert des Hintergrundrauschens überschreitet, wird als Ct-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet (Heid et al. 1996) und dient als Maß der qPCR. Der Ct-Wert ist dabei abhängig von dem Ausgangsmaterial. Je niedriger der Ct-Wert für ein bestimmtes Gen ist, desto mehr Startkopien der mRNA dieses Gens lagen als Ausgangsmaterial vor und dementsprechend desto höher wurde dieses

Gen in dem Bakterienstamm zum Versuchszeitpunkt exprimiert. Einer der bekanntesten Fluoreszenzfarbstoffe, der bei der quantitativen *real-time* PCR Anwendung findet, ist das SYBR® Green. In dieser Arbeit wurde jedoch mit dem Luna® Universal qPCR Master Mix von NEB gearbeitet, welcher einen neuartigen passiven Referenz-Farbstoff enthält, der mit allen SYBR® Green Apparaturen kompatibel ist. Die Durchführung der qPCR erfolgte mit Ausnahme kleiner Anpassungen anhand der Herstellerangaben (New England Biolabs Inc. 2020a) und ist im Folgenden beschrieben.

Zuerst wurden für jedes Gen, welches hinsichtlich der Expression untersucht werden sollte, ein einzelner Mastermix angefertigt, der bis auf die cDNA sämtliche Komponenten enthielt, die in Tabelle 8.2–23 aufgeführt sind. Der Luna® Universal qPCR Master Mix enthält neben dem neuartigen passiven Referenz-Farbstoff eine Hot Start *Taq*-DNA Polymerase und sämtliche weiteren Komponenten für einen PCR-Ansatz, wie Puffer und dNTPs. Abweichend der Angaben von NEB (New England Biolabs Inc. 2020a) wurden aufgrund durchgeführter Vorversuche nur 150 nM der beiden Primer eingesetzt. Die Primer wurden dafür, wie in Kapitel 8.2.3.4.1 beschrieben, entworfen und in HPLC-aufgereinigter Qualität bestellt. Für jede Probe, bei dem die Expression des jeweiligen Gens bestimmt werden sollte, wurden 18 µL des Mastermixes in eine Mikrotiterplatte für die *real-time* PCR pipettiert. Im Anschluss wurde die Lösung in der Mikrotiterplatte mit 2 µL einer mit dH₂O frisch hergestellten 1:10-Verdünnung der cDNA ergänzt und durch Auf- und Abpipettieren vermenget. Außerdem wurde für jede Probe (in der Regel je Stamm) eine Kontrolle auf genomische Verunreinigungen durchgeführt. Dazu wurde der Mastermix des Referenz- bzw. *house keeping* Gens *dnaQ*, welches bei jeder Messung mitgeführt wurde und bei der Berechnung der relativen Genexpression von Bedeutung ist (vgl. Kapitel 8.2.3.4.4), verwendet und anstelle der verdünnten cDNA wurde die ebenfalls 1:10 verdünnte Lösung der NAC (*no amplification control*) (vgl. Kapitel 8.2.3.4.2) verwendet. Zur weiteren Kontrolle der qPCR wurde für jedes untersuchte Gen einmalig je Messung eine NTC (*no template control*) angesetzt. Dazu wurden anstelle der cDNA 2 µL dH₂O in der Mikrotiterplatte ergänzt. Die mit allen Proben und Kontrollen vollständig befüllte Mikrotiterplatte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde die Platte in die Apparatur des Applied Biosystems® ViiA™ 7 Real-Time PCR System in einen *fast-96-well*-Block eingesetzt und der Lauf mit dem in Tabelle 8.2–24 beschriebenen Programm gestartet. Wie dort zu sehen ist, wurde nach dem Ablauf des eigentlichen PCR-Programmes (40 Zyklen) noch eine weitere Analyse angeschlossen. Bei dieser Aufnahme der Schmelzkurve wurde jede Probe nach den Angaben des Gerätes unter einem bestimmten Temperatur- und Zeitprogramm kontinuierlich von 60 °C auf 95 °C erwärmt. Dabei wurde weiterhin die Fluoreszenzintensität stetig gemessen. Diese Analyse wird benötigt, weil der Fluoreszenzfarbstoff unspezifisch von jeder doppelsträngigen DNA gebunden wird. Dies können zum einen vorhandene Primer-Dimere oder zum anderen auch unspezifische Nebenprodukte der PCR-Reaktion sein. Um die Reaktionsspezifität zu überprüfen und diese unerwünschten Produkte ausschließen

bzw. von dem gewünschten Hauptprodukt unterscheiden zu können, wird als Kontrolle die Schmelzkurve mit aufgezeichnet. Während die Probe kontinuierlich erhitzt wird, kommt es je nach Größe des Produktes, bei einer für das Produkt spezifischen Temperatur zur Denaturierung des Doppelstranges. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff gelöst und es kommt zu einem sofortigen Abfall der Fluoreszenzintensität, welche detektiert wird. Wird in der Schmelzpunktanalyse ein einzelner Peak bei der spezifischen Temperatur dargestellt, spricht dies für eine Probe, die frei von unspezifischen Amplifikaten war, welche sonst als zusätzliche Spitzen in der Kurve zu sehen wären.

Tabelle 8.2–23: Standard-Ansatz der quantitativen real-time PCR

Komponente	Volumen (in μL)
2x Luna® Universal qPCR Master Mix	10
5'-Primer (10 μM)	0,3
3'-Primer (10 μM)	0,3
cDNA (1:10 verdünnt)	2
H ₂ O	7,4

Tabelle 8.2–24: Standard-Programm der quantitativen real-time PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	1 min	1 x
Denaturierung	95 °C	15 sec	40 x
Annealing/Elongation	60 °C	30 sec	
Schmelzkurve	95 °C – 60 °C – 95 °C	15 sec – 1 min – 15 sec	1 x

8.2.3.4.4 Bestimmung der Genexpression

Die Bestimmung der Genexpression kann mithilfe verschiedener Quantifizierungsmethoden erfolgen. Unterschieden werden dabei die absolute und die relative Quantifizierung. Eine absolute Quantifizierung ist deutlich aufwendiger und war in dieser Arbeit nicht notwendig, da die vergleichenden Aussagen der relativen Quantifizierung, bei der die Änderung der Expression eines Gens in einer Probe relativ auf eine Kontrollprobe als Referenz bezogen werden, von Interesse waren. So konnte die Genexpression der jeweiligen Stämme gegenüber dem Referenzstamm dargestellt und verglichen werden. Generell wurden die ermittelten Werte jeweils aus drei unabhängigen biologischen Proben je Stamm ermittelt. Die Unterschiede in der Expression der untersuchten Gene zwischen den verschiedenen Stämmen wurden mit der $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Methode berechnet (Livak/Schmittgen 2001; Pfaffl 2004). Hierbei wird davon ausgegangen, dass sich die doppelsträngige DNA in jedem Zyklus verdoppelt. Als Referenzstamm wurde je nach Versuchsziel meistens entweder *E. coli* WT (GK571) oder die Mutante *E. coli* MIII (GK574) gewählt (vgl. Kapitel 5.6 und 5.7). Das für die relative Quantifizierungsmethode notwendige Referenzgen war bereits im Arbeitskreis für die verwendeten Stämme unter normalen

Experimenteller Teil (Material und Methoden)

Wachstumsbedingungen etabliert worden, daher wurde *dnaQ* auch im Rahmen dieser Arbeit als Kontrollgen verwendet (Heisig, A., Heisig, P., persönliche Mitteilung).

Die Bestimmung der relativen Genexpression ging von den Ct-Werten, welche die Software des Applied Biosystems® ViiA™ 7 Real-Time PCR System ermittelte, aus. Zunächst wurden je Stamm und je untersuchtes Gen von Interesse (Zielgen) das ΔCt berechnet, indem von dem Ct-Wert des Zielgens eines Stammes der Ct-Wert des Referenzgens *dnaQ* desselben Stammes subtrahiert wurde (vgl. Formel 8.2–6).

$$\Delta Ct = Ct_{Zielgen} - Ct_{Referenzgen} = Ct_{Zielgen} - Ct_{dnaQ}$$

Formel 8.2–6: Berechnung des ΔCt

Im Anschluss erfolgte die Berechnung des $\Delta\Delta Ct$. Dies erfolgte auch für jedes einzelne Zielgen und für jeden Stamm, der jeweils auf einen Referenzstamm bezogen wurde. Mathematisch wurde eine Differenz gebildet aus den ΔCt -Werten eines Gens und eines Stammes (Zielstamm) und aus den ΔCt -Werten dieses Gens des Kontrollstammes bzw. Referenzstammes (vgl. Formel 8.2–7). Die ΔCt -Werte des Kontrollstammes waren dabei Mittelwerte aus den drei biologischen Proben.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Zielstamm} - \Delta Ct_{Referenzstamm}$$

Formel 8.2–7: Berechnung des $\Delta\Delta Ct$

Im letzten Schritt zur Bestimmung der relativen Genexpression wurde der negative $\Delta\Delta Ct$ -Wert als Potenz zur Basis zwei gesetzt (vgl. Formel 8.2–8). Auch dieser Wert wurde je Zielgen und Zielstamm ermittelt und jeweils pro Referenzstamm, auf den sich bezogen wurde. Im Anschluss wurde hiervon der Mittelwert aus den drei biologischen Proben gezogen und die Standardabweichung ermittelt. Diese Daten wurden graphisch als Säulendiagramme je Stamm und Zielgen mit zugehörigen Fehlerbalken aus der Standardabweichung dargestellt, wobei sich je Diagramm auf einen Referenzstamm bezogen wurde (vgl. Kapitel 5.6 und 5.7).

$$\text{relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Formel 8.2–8: Berechnung der relativen Genexpression

9 Literaturliste

- Abu Mraheil, Mobarak (2004): Entwicklung eines molekularbiologischen Testsystems zum Nachweis von Inhibitoren bakterieller Topoisomerasen, deren Wirkung und des DNA-Superspiralisierungsgrades *in vivo*. Dissertation. Universität Hamburg.
- Abu Mraheil, Mobarak/Heisig, Anke/Heisig, Peter (2013): An improved assay for the detection of alterations in bacterial DNA supercoiling *in vivo*. In: Pharmazie, 68. Jg. (7), S. 541-548.
- Abu Sin, Muna et al. (2018): Globale und nationale Strategien gegen Antibiotikaresistenzen. In: Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 61. Jg. (5), S. 507-514.
- Ahmad, Shamim I./Kirk, Sandra H./Eisenstark, Abraham (1998): Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. In: Annual Review of Microbiology, 52. Jg., S. 591-625.
- Aizenman, Einat/Engelberg-Kulka, Hanna/Glaser, Gad (1996): An *Escherichia coli* chromosomal "addiction module" regulated by guanosine [corrected] 3',5'-bispyrophosphate: A model for programmed bacterial cell death. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93. Jg. (12), S. 6059-6063.
- Alam, Jawed/Cook, Julia L. (1990): Reporter Genes: Application to the Study of Mammalian Gene Transcription. In: Analytical Biochemistry, 188. Jg. (2), S. 245-254.
- Alanis-Lobato, Gregorio et al. (2021): Frequent loss of heterozygosity in CRISPR-Cas9-edited early human embryos. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 118. Jg. (22), S. 1-9 (e2004832117).
- Aldred, Katie J./Kerns, Robert J./Osheroff, Neil (2014): Mechanism of Quinolone Action and Resistance. In: Biochemistry, 53. Jg. (10), S. 1565-1574.
- Allen, Joshua E. et al. (2013): Dual Inactivation of Akt and ERK by TIC10 Signals Foxo3a Nuclear Translocation, TRAIL Gene Induction, and Potent Antitumor Effects. In: Science Translational Medicine, 5. Jg. (171), S. 1-13 (171ra117).
- Almirón, Marta et al. (1992): A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. In: Genes & Development, 6. Jg. (12b), S. 2646-2654.
- Amitai, Shahar et al. (2009): *Escherichia coli* MazF Leads to the Simultaneous Selective Synthesis of Both "Death Proteins" and "Survival Proteins". In: PLoS Genetics 5. Jg. (3), S. 1-10 (e1000390).
- Andersen, Janet et al. (1989): The Function of *micF* RNA. *micF* RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in *Escherichia coli*. In: Journal of Biological Chemistry, 264. Jg. (30), S. 17961-17970.
- Andersen, Paal Skytt/Smith, John M./Mygind, Bente (1992): Characterization of the *upp* gene encoding uracil phosphoribosyltransferase of *Escherichia coli* K12. In: European Journal of Biochemistry, 204. Jg. (1), S. 51-56.
- Andriole, Vincent T. (2005): The Quinolones: Past, Present, and Future. In: Clinical Infectious Diseases, 41. Jg. (Supplement 2), S. 113-119.
- Aono, Rikizo/Tsukagoshi, Norihiko/Yamamoto, Mami (1998): Involvement of Outer Membrane Protein TolC, a Possible Member of the *mar-sox* Regulon, in Maintenance and Improvement of Organic Solvent Tolerance of *Escherichia coli* K-12. In: Journal of Bacteriology, 180. Jg. (4), S. 938-944.
- Aoyama, Takashi et al. (1983): Essential structure of *E. coli* promoter: effect of spacer length between the two consensus sequences on promoter function. In: Nucleic Acids Research 11. Jg. (17), S. 5855-5864.
- Apte, Arun/Daniel, Saurabha (2009): PCR Primer Design. In: Cold Spring Harbor Protocols, 4. Jg. (3), S. 1-10.
- Aquino, Patricia et al. (2017): Coordinated regulation of acid resistance in *Escherichia coli*. In: BMC Systems Biology, 11. Jg. (1), S. 1-15.

- Armstrong, Karen A. et al. (1984): A 37 x 10³ Molecular Weight Plasmid-encoded Protein is Required for Replication and Copy Number Control in the Plasmid pSC101 and its Temperature-sensitive Derivative pHS1. In: *Journal of Molecular Biology*, 175. Jg. (3), S. 331-348.
- Arntjen, Birte (2011): Der Einfluss von *multiple antibiotic resistance (mar)* Mutationen auf die Fitness fluorochinolonresistenter Mutanten von *Escherichia coli*. Dissertation. Universität Hamburg.
- Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (ÄZQ) (2020a): Patienteninformation. Antibiotika - Behandlung. URL: <https://www.patienten-information.de/medien/kurzinfomationen/antibiotikabehandlung-kip.pdf> (05.10.2022).
- Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (ÄZQ) (2020b): Patienteninformation. Antibiotika - Resistenzen. URL: <https://www.patienten-information.de/medien/kurzinfomationen/antibiotikaresistenzen-kip.pdf> (05.10.2022).
- Atlung, Tove/Christensen, Bjarke Bak/Hansen, Flemming G. (1999): Role of the Rom Protein in Copy Number Control of Plasmid pBR322 at Different Growth Rates in *Escherichia coli* K-12. In: *Plasmid*, 41. Jg. (2), S. 110-119.
- Bachmann, Barbara J. (1972): Pedigrees of Some Mutant Strains of *Escherichia coli* K-12. In: *Bacteriological Reviews* 36. Jg. (4), S. 525-557.
- Bachmann, Barbara J. (1996): Derivations and Genotypes of Some Mutant Derivatives of *Escherichia coli* K-12. In: Neidhardt, F. C. (Hrsg.): *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2. Auflage, Washington, D.C., USA: ASM Press, S. 2460–2488.
- Bachmann, Barbara J./Low, K. Brooks/Taylor, Austin L. (1976): Recalibrated Linkage Map of *Escherichia coli* K-12. In: *Bacteriological Reviews* 40. Jg. (1), S. 116-167.
- Bae, Sangsu/Park, Jeongbin/Kim, Jin-Soo (2014): Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. In: *Bioinformatics*, 30. Jg. (10), S. 1473-1475.
- Bagel, Simone (1998): Adhärenzeigenschaften chinolonresistenter *Escherichia coli* Isolate. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Bagel, Simone et al. (1999): Impact of *gyrA* and *parC* Mutations on Quinolone Resistance, Doubling Time, and Supercoiling Degree of *Escherichia coli*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43. Jg. (4), S. 868-875.
- Baker, Tania A./Sauer, Robert T. (2012): ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823. Jg. (1), S. 15-28.
- Ball, Peter (2000): Quinolone generations: natural history or natural selection? In: *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46. Jg. (Supplement 3), S. 17-24.
- Barnard, Faye M./Maxwell, Anthony (2001): Interaction between DNA Gyrase and Quinolones: Effects of Alanine Mutations at GyrA Subunit Residues Ser⁸³ and Asp⁸⁷. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45. Jg. (7), S. 1994-2000.
- Bass, Steven/Sorrells, Vincenza/Youderian, Philip (1988): Mutant Trp Repressors with New DNA-Binding Specificities. In: *Science*, 242. Jg. (4876), S. 240-245.
- Berg, Jeremy M. et al. (2018): *Stryer Biochemie*. 8. Auflage. Berlin: Springer-Verlag.
- Beuron, Fabienne et al. (1998): At Sixes and Sevens: Characterization of the Symmetry Mismatch of the ClpAP Chaperone-Assisted Protease. In: *Journal of Structural Biology*, 123. Jg. (3), S. 248-259.
- Bhagwat, Ashok S. et al. (2016): Strand-biased cytosine deamination at the replication fork causes cytosine to thymine mutations in *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113. Jg. (8), S. 2176-2181.
- BioSense Solutions ApS (o. J.): oCelloScope - Accelerate your science with richer, reliable data. oCelloScope live-cell imaging system drives faster, label-free bioanalysis. URL: <https://biosensesolutions.dk/ocelloscope/> (03.03.2021).
- BioTek Instruments Inc. (2016): Application Note: Comparative Analysis of Dual-Luciferase® Assay Technologies in a High Throughput Microplate Format. URL: https://www.biotek.com/assets/tech_resources/DLR%20App%20Note_FINAL.pdf (19.01.2022).

- Birnboim, H. C./Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic acids research*, 7. Jg. (6), S. 1513-1523.
- Bisacchi, Gregory S. (2015): Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded "Discovery Story". In: *Journal of Medicinal Chemistry*, 58. Jg. (12), S. 4874-4882.
- Blanchard, Jeffrey L. et al. (2007): Rapid Changes in Gene Expression Dynamics in Response to Superoxide Reveal SoxRS-Dependent and Independent Transcriptional Networks. In: *PLoS One*, 2. Jg. (11), S. 1-13 (e1186).
- Blattner, Frederick R. et al. (1997): The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. In: *Science*, 277. Jg. (5331), S. 1453-1462.
- Bodmann, Klaus-Friedrich et al. (2019): Einführung und Antibiotika. In: Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. (Hrsg.): *Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen - Update 2018. PEG S2k Leitlinie (AWMF-Registernummer 082-006). 2. aktualisierte Version*, S. 8-16.
- Botos, Istvan et al. (2004): The Catalytic Domain of *Escherichia coli* Lon Protease Has a Unique Fold and a Ser-Lys Dyad in the Active Site. In: *Journal of Biological Chemistry*, 279. Jg. (9), S. 8140-8148.
- Böttcher, Thomas/Sieber, Stephan A. (2008): β -Lactones as Specific Inhibitors of ClpP Attenuate the Production of Extracellular Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*. In: *Journal of the American Chemical Society*, 130. Jg. (44), S. 14400-14401.
- Brötz-Oesterhelt, Heike et al. (2005): Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. In: *Nature Medicine*, 11. Jg. (10), S. 1082-1087.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit/Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. (2016): *GERMAP 2015. Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland*. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence. Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH.
- Bundesministerium für Bildung und Forschung (o. J.): *Globale Antibiotika Forschungs- und Entwicklungs-Partnerschaft (GARDP)*. URL: <https://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/globale-antibiotika-forschungs-und-entwicklungs-partnerschaft-gardp-8587.php> (12.10.2022).
- Bundesministerium für Gesundheit (2022a): *DART 2020 - Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie*. URL: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/antibiotika-resistenzen/antibiotika-resistenzstrategie.html> (11.10.2022).
- Bundesministerium für Gesundheit (2022b): *Erforschung und Entwicklung neuer Antibiotika*. URL: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/antibiotika-resistenzen/erforschung-und-entwicklung-neuer-antibiotika.html> (12.10.2022).
- Bundesministerium für Gesundheit/Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft/Bundesministerium für Bildung und Forschung (2015): *DART 2020. Antibiotika-Resistenzen bekämpfen zum Wohl von Mensch und Tier*. URL: https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/Broschueren/DART2020.pdf?__blob=publicationFile&v=5 (11.10.2022).
- Bundesministerium für Gesundheit/Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft/Bundesministerium für Bildung und Forschung (2022): *DART 2020. Abschlussbericht*. URL: https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3_Downloads/D/DART_2020/BMG_DART_2020_Abschlussbericht_bf.pdf (11.10.2022).
- Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (o. J.): *One Health. Der One-Health-Ansatz*. URL: <https://www.bmz.de/de/themen/one-health> (10.10.2022).
- Burton, Randall E./Baker, Tania A./Sauer, Robert T. (2005): Nucleotide-dependent substrate recognition by the AAA+ HslUV protease. In: *Nature Structural & Molecular Biology*, 12. Jg. (3), S. 245-251.
- Bush, Natassja G. et al. (2020): Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. In: *Molecules*, 25. Jg. (23), S. 1-27 (5662).

- Bush, Natassja G./Evans-Roberts, Katherine/Maxwell, Anthony (2015): DNA Topoisomerases. In: *EcoSal Plus*, 6. Jg. (2), S. 1-34.
- Busse, Hans-Jürgen/Wöstmann, Claudia/Bakker, Evert P. (1992): The bactericidal action of streptomycin: membrane permeabilization caused by the insertion of mistranslated proteins into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* and subsequent caging of the antibiotic inside the cells due to degradation of these proteins. In: *Journal of General Microbiology*, 138. Jg. (3), S. 551-561.
- Cabañas, María Jesús /Vázquez, David/Modolell, Juan (1978): Inhibition of ribosomal translocation by aminoglycoside antibiotics. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 83. Jg. (3), S. 991-997.
- Casadaban, Malcolm J. (1976): Transposition and Fusion of the *lac* Genes to Selected Promoters in *Escherichia coli* using Bacteriophage Lambda and Mu. In: *Journal of Molecular Biology*, 104. Jg. (3), S. 541-555.
- Cassini, Alessandro et al. (2019): Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. In: *The Lancet Infectious Diseases*, 19. Jg. (1), S. 56-66.
- Cattoir, Vincent/Poirel, Laurent/Nordmann, Patrice (2008): Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Pump QepA2 in an *Escherichia coli* Isolate from France. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52. Jg. (10), S. 3801-3804.
- Chang, Annie C. Y./Cohen, Stanley N. (1978): Construction and Characterization of Amplifiable Multicopy DNA Cloning Vehicles Derived from the P15A Cryptic Miniplasmid. In: *Journal of Bacteriology*, 134. Jg. (3), S. 1141-1156.
- Chapman, John S./Georgopapadakou, Nafsika H. (1988): Routes of Quinolone Permeation in *Escherichia coli*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32. Jg. (4), S. 438-442.
- Chen, Chien-Chung et al. (2005): A Cis-spreading Nucleoprotein Filament Is Responsible for the Gene Silencing Activity Found in the Promoter Relay Mechanism. In: *Journal of Biological Chemistry*, 280. Jg. (6), S. 5101-5112.
- Chien, Alice/Edgar, David B./Trela, John M. (1976): Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus aquaticus*. In: *Journal of Bacteriology* 127. Jg. (3), S. 1550-1557.
- Chin, David T. et al. (1988): Sequence of the *lon* Gene in *Escherichia coli*. A heat-shock gene which encodes the ATP-dependent protease La. In: *Journal of Biological Chemistry*, 263. Jg. (24), S. 11718-11728.
- Cho, Seung Woo et al. (2014): Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. In: *Genome Research* 24. Jg. (1), S. 132-141.
- Choi, Umji et al. (2016): Increased expression of genes involved in uptake and degradation of murein tripeptide under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. In: *FEMS Microbiology Letters*, 363. Jg. (14), S. 1-8 (fnw136).
- Chowdhury, Nandan et al. (2019): Identification of *AcrAB-TolC* Efflux Pump Genes and Detection of Mutation in Efflux Repressor *AcrR* from Omeprazole Responsive Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates Causing Urinary Tract Infections. In: *Microbiology Insights*, 12. Jg., S. 1-10.
- Chuang, Shuang-En et al. (1993): Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the *hslTS/ibpAB* and *hslVU* operons in *Escherichia coli*. In: *Gene*, 134. Jg. (1), S. 1-6.
- Chung, Chin Ha/Goldberg, Alfred L. (1981): The product of the *lon* (*capR*) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78. Jg. (8), S. 4931-4935.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018): *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. CLSI Standard M07. 11. Auflage. Pennsylvania, USA.
- Cock, Peter J. A. et al. (2010): The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. In: *Nucleic Acids Research* 38. Jg. (6), S. 1767-1771.

- Cohen, Seth P./McMurry, Laura M./Levy, Stuart B. (1988): *marA* Locus Causes Decreased Expression of OmpF Porin in Multiple-Antibiotic-Resistant (Mar) Mutants of *Escherichia coli*. In: Journal of Bacteriology, 170. Jg. (12), S. 5416-5422.
- Cohen, Stanley N./Chang, Annie C. Y./Hsu, Leslie (1972): Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 69. Jg. (8), S. 2110-2114.
- Compton, Corey L. et al. (2013): Antibacterial Activity of and Resistance to Small Molecule Inhibitors of the ClpP Peptidase. In: ACS Chemical Biology, 8. Jg. (12), S. 2669-2677.
- Conter, Annie/Menchon, Carine/Gutierrez, Claude (1997): Role of DNA Supercoiling and RpoS Sigma Factor in the Osmotic and Growth Phase-dependent Induction of the Gene *osmE* of *Escherichia coli* K12. In: Journal of Molecular Biology, 273. Jg. (1), S. 75-83.
- Correia, Susana et al. (2017): Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? In: Journal of Medical Microbiology, 66. Jg. (5), S. 551-559.
- Costantino, Nina/Court, Donald L. (2003): Enhanced levels of λ Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100. Jg. (26), S. 15748-15753.
- Creighton, Thomas E. (1992): Proteins: Structures and Molecular Properties. 2. Auflage. New York: W. H. Freeman and Company.
- Crisona, Nancy J. et al. (2000): Preferential relaxation of positively supercoiled DNA by *E. coli* topoisomerase IV in single-molecule and ensemble measurements. In: Genes & Development, 14. Jg. (22), S. 2881-2892.
- Cui, Lun/Bikard, David (2016): Consequences of Cas9 cleavage in the chromosome of *Escherichia coli*. In: Nucleic Acids Research 44. Jg. (9), S. 4243-4251.
- Culviner, Peter H./Laub, Michael T. (2018): Global Analysis of the *E. coli* Toxin MazF Reveals Widespread Cleavage of mRNA and the Inhibition of rRNA Maturation and Ribosome Biogenesis. In: Molecular Cell, 70. Jg. (5), S. 868-880.
- Cunningham, Louise/Gruer, Megan J./Guest, John R. (1997): Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. In: Microbiology, 143. Jg. (12), S. 3795-3805.
- Dame, Remus Thei/Wyman, Claire/Goosen, Nora (2001): Structural basis for preferential binding of H-NS to curved DNA. In: Biochimie, 83. Jg. (2), S. 231-234.
- Darlison, Mark G./Guest, John R. (1984): Nucleotide sequence encoding the iron-sulphur protein subunit of the succinate dehydrogenase of *Escherichia coli*. In: Biochemical Journal, 223. Jg. (2), S. 507-517.
- Datsenko, Kirill A./Wanner, Barry L. (2000): One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97. Jg. (12), S. 6640-6645.
- Davies, Julian/Anderson, Porter/Davis, Bernard D. (1965): Inhibition of Protein Synthesis by Spectinomycin. In: Science, 149. Jg. (3688), S. 1096-1098.
- Delihias, Nicholas/Forst, Steven (2001): MicF: An Antisense RNA Gene Involved in Response of *Escherichia coli* to Global Stress Factors. In: Journal of Molecular Biology, 313. Jg. (1), S. 1-12.
- Deutsche Gesellschaft für Urologie (2017): Interdisziplinäre S3 Leitlinie: Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten. Aktualisierung 2017. AWMF Registernummer: 043/04. Langversion 1.1-2. URL: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-044l_S3_Harnwegsinfektionen_2017-05.pdf (21.10.2022).
- DiNardo, Stephen et al. (1982): *Escherichia coli* DNA Topoisomerase I Mutants Have Compensatory Mutations in DNA Gyrase Genes. In: Cell, 31. Jg. (1), S. 43-51.
- Dip, Phat Vinh et al. (2014): Structure, mechanism and ensemble formation of the alkylhydroperoxide reductase subunits AhpC and AhpF from *Escherichia coli*. In: Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 70. Jg. (11), S. 2848-2862.
- Domagala, John M. (1994): Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 33. Jg. (4), S. 685-706.

- Doña, I. et al. (2012): Drug Hypersensitivity Reactions: Response Patterns, Drug Involved, and Temporal Variations in a Large Series of Patients. In: *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 22. Jg. (5), S. 363-371.
- Dorman, Charles J. (2004): H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. In: *Nature Reviews Microbiology*, 2. Jg. (5), S. 391-400.
- Dorman, Charles J./Dorman, Matthew J. (2016): DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. In: *Biophysical Reviews* 8. Jg. (Suppl 1), S. 89-100.
- Dougan, David A. et al. (2002): ClpS, a Substrate Modulator of the ClpAP Machine. In: *Molecular Cell*, 9. Jg. (3), S. 673-683.
- Dower, William J./Miller, Jeff F./Ragsdale, Charles W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. In: *Nucleic acids research*, 16. Jg. (13), S. 6127-6145.
- Doyle, Shannon M./Wickner, Sue (2009): Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. In: *Trends in Biochemical Sciences*, 34. Jg. (1), S. 40-48.
- Drlica, Karl et al. (2009): Quinolones: Action and Resistance Updated. In: *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9. Jg. (11), S. 981-998.
- Du, Dijun et al. (2014): Structure of the AcrAB–TolC multidrug efflux pump. In: *Nature*, 509. Jg. (7501), S. 512-515.
- Dupont, Myrielle et al. (2007): An Early Response to Environmental Stress Involves Regulation of OmpX and OmpF, Two Enterobacterial Outer Membrane Pore-Forming Proteins. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51. Jg. (9), S. 3190-3198.
- Duran, Elizabeth C./Weaver, Clarissa L./Lucius, Aaron L. (2017): Comparative Analysis of the Structure and Function of AAA+ Motors ClpA, ClpB, and Hsp104: Common Threads and Disparate Functions. In: *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4. Jg. (54), S. 1-19.
- Dwyer, Daniel J. et al. (2014): Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111. Jg. (20), S. 2100-2109.
- Dwyer, Daniel J. et al. (2007): Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. In: *Molecular Systems Biology*, 3. Jg. (1), S. 1-15 (Article Number 91).
- Eid, John et al. (2009): Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. In: *Science*, 323. Jg. (5910), S. 133-138.
- El Khoury, Jessica Y. et al. (2022): The AAA+ ATPase RavA-ViaA complex sensitizes *Escherichia coli* to aminoglycosides under anaerobic low energy conservation conditions. In: *bioRxiv*, (476284).
- Elkins, Christopher A./Nikaido, Hiroshi (2003): 3D structure of AcrB: the archetypal multidrug efflux transporter of *Escherichia coli* likely captures substrates from periplasm. In: *Drug Resistance Updates*, 6. Jg. (1), S. 9-13.
- Ellis, Hilary M. et al. (2001): High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98. Jg. (12), S. 6742-6746.
- Emrich, Nadine-Christine (2011): Molekulare Grundlagen der Entstehung der Variante AAC(6')-Ib-cr und deren Bedeutung für die Aktivität von Fluorchinolonen im Vergleich zu anderen plasmidkodierten und chromosomalen Fluorchinolon-Resistenzmechanismen. Dissertation. Universität Hamburg.
- Engelberg-Kulka, Hanna/Hazan, Ronen/Amitai, Shahar (2005): *mazEF*: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. In: *Journal of Cell Science*, 118. Jg. (19), S. 4327-4332.
- Engelberg-Kulka, Hanna et al. (2004): Bacterial programmed cell death systems as targets for antibiotics. In: *Trends in Microbiology*, 12. Jg. (2), S. 66-71.
- Erbse, Annette H. et al. (2008): Conserved residues in the N-domain of the AAA+ chaperone ClpA regulate substrate recognition and unfolding. In: *The FEBS Journal*, 275. Jg. (7), S. 1400-1410.
- Erental, Ariel et al. (2014): Apoptosis-Like Death, an Extreme SOS Response in *Escherichia coli*. In: *mBio*, 5. Jg. (4), S. 1-14.

- Eurofins Genomics GmbH (2021): LightRun Tube. Sample Submission Guide for the LightRun Tube Sequencing Service. Version 2021_0506. URL: https://eurofinsgenomics.eu/media/1611196/eurofins-flyer-samplesubmission-lightrun-tube_20210506_online.pdf (20.05.2021).
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (o. J.): Surveillance Atlas of Infectious Diseases. URL: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx> (04.10.2022).
- Fakhrai-Rad, Hossein/Pourmand, Nader/Ronaghi, Mostafa (2002): Pyrosequencing™: An Accurate Detection Platform for Single Nucleotide Polymorphisms. In: *Human Mutation*, 19. Jg. (5), S. 479-485.
- Falconi, M. et al. (1988): Proteins from the prokaryotic nucleoid: primary and quaternary structure of the 15-kD *Escherichia coli* DNA binding protein H-NS. In: *Molecular Microbiology*, 2. Jg. (3), S. 323-329.
- Fan, Frank/Wood, Keith V. (2007): Bioluminescent Assays for High-Throughput Screening. In: *Assay and Drug Development Technologies*, 5. Jg. (1), S. 127-136.
- Farbman, Mary E./Gershenson, Anne/Licht, Stuart (2008): Role of a Conserved Pore Residue in Formation of a Pre-Hydrolytic High Substrate Affinity State in the AAA+ Chaperone ClpA. In: *Biochemistry*, 47. Jg. (51), S. 13497-13505.
- Farr, Spencer B./Kogoma, Tokio (1991): Oxidative Stress Responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. In: *Microbiological Reviews*, 55. Jg. (4), S. 561-585.
- Farrell, Christopher M./Grossman, Alan D./Sauer, Robert T. (2005): Cytoplasmic degradation of ssrA-tagged proteins. In: *Molecular Microbiology*, 57. Jg. (6), S. 1750-1761.
- Felix, Jan et al. (2022): The AAA+ ATPase RavA and its binding partner ViaA modulate *E. coli* aminoglycoside sensitivity through interaction with the inner membrane. In: *bioRxiv*, (479298).
- Fenton, Henry John Horstman (1894): Oxidation of Tartaric Acid in presence of Iron. In: *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 65. Jg., S. 899-910.
- Fetzer, Christian et al. (2017): A Chemical Disruptor of the ClpX Chaperone Complex Attenuates the Virulence of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. In: *Angewandte Chemie International Edition*, 56. Jg. (49), S. 15746-15750.
- Flanagan, John M. et al. (1995): Scanning Transmission Electron Microscopy and Small-Angle Scattering Provide Evidence that Native *Escherichia coli* ClpP is a Tetradecamer with an Axial Pore. In: *Biochemistry*, 34. Jg. (34), S. 10910-10917.
- Fralick, Joe A. (1996): Evidence that TolC Is Required for Functioning of the Mar/AcrAB Efflux Pump of *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology*, 178. Jg. (19), S. 5803-5805.
- Frees, Dorte et al. (2003): Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. In: *Molecular Microbiology*, 48. Jg. (6), S. 1565-1578.
- Gambino, Laura/Gracheck, Stephen J./Miller, Paul F. (1993): Overexpression of the MarA Positive Regulator Is Sufficient To Confer Multiple Antibiotic Resistance in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology*, 175. Jg. (10), S. 2888-2894.
- Gefter, Malcolm L. et al. (1971): Analysis of DNA Polymerases II and III in Mutants of *Escherichia coli* Thermosensitive for DNA Synthesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68. Jg. (12), S. 3150-3153.
- Gellert, Martin et al. (1976): DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73. Jg. (11), S. 3872-3876.
- Geng, Keyi et al. (2021): CRISPR/Cas9 deletions induce adverse on-target genomic effects leading to functional DNA in human cells. In: *bioRxiv*, (450727).
- Gersch, Malte et al. (2014): Disruption of Oligomerization and Dehydroalanine Formation as Mechanisms for ClpP Protease Inhibition. In: *Journal of the American Chemical Society*, 136. Jg. (4), S. 1360-1366.
- Global Antibiotic Research and Development Partnership (GARDP) (o. J.): 5 BY 25. URL: <https://gardp.org/who-we-are/5-by-25/> (12.10.2022).
- Glynn, Steven E. et al. (2009): Structures of Asymmetric ClpX Hexamers Reveal Nucleotide-Dependent Motions in a AAA+ Protein-Unfolding Machine. In: *Cell*, 139. Jg. (4), S. 744-756.

- Gottesman, Susan (2003): Proteolysis in Bacterial Regulatory Circuits. In: Annual Review of Cell and Developmental Biology, 19. Jg. (1), S. 565-587.
- Gottesman, Susan et al. (1993): ClpX, an Alternative Subunit for the ATP-dependent Clp Protease of *Escherichia coli*. Sequence and *in vivo* Activities. In: Journal of Biological Chemistry, 268. Jg. (30), S. 22618-22626.
- Gottesman, Susan/Clark, William P./Maurizi, Michael R. (1990): The ATP-dependent Clp Protease of *Escherichia coli*. Sequence of *clpA* and Identification of a Clp-Specific Substrate. In: Journal of Biological Chemistry, 265. Jg. (14), S. 7886-7893.
- Gottesman, Susan/Maurizi, Michael R. (1992): Regulation by Proteolysis: Energy-Dependent Proteases and Their Targets. In: Microbiological Reviews, 56. Jg. (4), S. 592-621.
- Gottesman, Susan et al. (1998): The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. In: Genes & Development 12. Jg. (9), S. 1338-1347.
- Gottesman, Susan/Wu, Whi-Fin/Missiakas, Dominique (1997): *Escherichia coli* ClpY. In: Gething, Mary-Jane (Hrsg.): Guidebook to Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts. Oxford: Oxford University Press, S. 242-243.
- Grant, Seth G. N. et al. (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87. Jg. (12), S. 4645-4649.
- Green, Michael R./Sambrook, Joseph (2012): Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 4. Auflage. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Griffith, Kevin L./Shah, Ishita M./Wolf Jr, Richard E. (2004): Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons. In: Molecular Microbiology, 51. Jg. (6), S. 1801-1816.
- Grimaud, Regis et al. (1998): Enzymatic and Structural Similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent Proteases, ClpXP and ClpAP. In: Journal of Biological Chemistry, 273. Jg. (20), S. 12476-12481.
- Grkovic, Steve/Brown, Melissa H./Skurray, Ronald A. (2002): Regulation of Bacterial Drug Export Systems. In: Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66. Jg. (4), S. 671-701.
- Gross, C. A. et al. (1998): The Functional and Regulatory Roles of Sigma Factors in Transcription. In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 63. Jg. (1), S. 141-155.
- Gruber, Tanja M./Gross, Carol A. (2003): Multiple Sigma Subunits and the Partitioning of Bacterial Transcription Space. In: Annual Review of Microbiology, 57. Jg. (1), S. 441-466.
- Gruer, Megan J./Bradbury, Alan J./Guest, John R. (1997): Construction and properties of aconitase mutants of *Escherichia coli*. In: Microbiology, 143. Jg. (6), S. 1837-1846.
- Guillard, Thomas et al. (2010): Rapid Detection of *aac(6')-Ib-cr* Quinolone Resistance Gene by Pyrosequencing. In: Journal of Clinical Microbiology 48. Jg. (1), S. 286-289.
- Guillard, Thomas et al. (2013): A simplified and cost-effective method combining real-time PCR and pyrosequencing for detection of *aac(6')-Ib-cr* gene. In: Journal of Microbiological Methods, 95. Jg. (2), S. 268-271.
- Guo, Fusheng et al. (2002a): Crystal Structure of the Heterodimeric Complex of the Adaptor, ClpS, with the N-domain of the AAA⁺ Chaperone, ClpA. In: Journal of Biological Chemistry, 277. Jg. (48), S. 46753-46762.
- Guo, Fusheng et al. (2002b): Crystal Structure of ClpA, an Hsp100 Chaperone and Regulator of ClpAP Protease. In: Journal of Biological Chemistry, 277. Jg. (48), S. 46743-46752.
- Guzman, Luz-Maria et al. (1995): Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose P_{BAD} Promoter. In: Journal of Bacteriology, 177. Jg. (14), S. 4121-4130.
- Haanperä, Marjo/Huovinen, Pentti/Jalava, Jari (2005): Detection and Quantification of Macrolide Resistance Mutations at Positions 2058 and 2059 of the 23S rRNA Gene by Pyrosequencing. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49. Jg. (1), S. 457-460.

- Haber, Fritz/Weiss, Joseph (1934): The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts. In: Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences, 147. Jg. (861), S. 332-351.
- Hackl, Mathias W. et al. (2015): Phenyl Esters Are Potent Inhibitors of Caseinolytic Protease P and Reveal a Stereogenic Switch for Deoligomerization. In: Journal of the American Chemical Society, 137. Jg. (26), S. 8475-8483.
- Hanahan, Douglas (1983): Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. In: Journal of Molecular Biology, 166. Jg. (4), S. 557-580.
- Hane, Michael W./Wood, Thomas H. (1969): *Escherichia coli* K-12 Mutants Resistant to Nalidixic Acid: Genetic Mapping and Dominance Studies. In: Journal of Bacteriology, 99. Jg. (1), S. 238-241.
- Hansen, Lars Hestbjerg et al. (2007): Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60. Jg. (1), S. 145-147.
- Hansen, Lars Hestbjerg et al. (2004): Plasmid-Encoded Multidrug Efflux Pump Conferring Resistance to Olaquinox in *Escherichia coli*. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48. Jg. (9), S. 3332-3337.
- Hanson, Phyllis I./Whiteheart, Sidney W. (2005): AAA+ Proteins: Have Engine, Will Work. In: Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6. Jg. (7), S. 519-529.
- Hartmann, Guido et al. (1967): The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. In: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis, 145. Jg. (3), S. 843-844.
- Hauschild, H.-J./Schneider, D./Bronsch, K. (1977): Olaquinox - ein neuer Wachstumspromotor in der Tierernährung. In: Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde, 38. Jg. (1-6), S. 241-248.
- Hawley, Diane K./McClure, William R. (1983): Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. In: Nucleic Acids Research 11. Jg. (8), S. 2237-2255.
- Hazan, Ronen/Sat, Boaz/Engelberg-Kulka, Hanna (2004): *Escherichia coli* *mazEF*-Mediated Cell Death Is Triggered by Various Stressful Conditions. In: Journal of Bacteriology 186. Jg. (11), S. 3663-3669.
- Hegde, Subray S. et al. (2005): A Fluoroquinolone Resistance Protein from *Mycobacterium tuberculosis* That Mimics DNA. In: Science, 308. Jg. (5727), S. 1480-1483.
- Heid, Christian A. et al. (1996): Real Time Quantitative PCR. In: Genome Research, 6. Jg. (10), S. 986-994.
- Heisig, Peter (1996): Genetic Evidence for a Role of *parC* Mutations in Development of High-Level Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli*. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40. Jg. (4), S. 879-885.
- Heisig, Peter (2001): Inhibitors of Bacterial Topoisomerases: Mechanisms of Action and Resistance and Clinical Aspects. In: Planta Medica, 67. Jg. (1), S. 3-12.
- Heisig, Peter (2019): Antibiotikaresistenz - Mechanismen der Entstehung und Ausbreitung. In: Heisig, Peter (Hrsg.): Update Pharmazie Antibiotikaresistenz. Entstehungsmechanismen, Epidemiologie, Wirkstoffentwicklung. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, S. 1-17.
- Heisig, Peter/Schedletzky, Holger/Falkenstein-Paul, Hildegard (1993): Mutations in the *gyrA* Gene of a Highly Fluoroquinolone-Resistant Clinical Isolate of *Escherichia coli*. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37. Jg. (4), S. 696-701.
- Heisig, Peter/Tschorny, Regina (1994): Characterization of Fluoroquinolone-Resistant Mutants of *Escherichia coli* Selected In Vitro. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 38. Jg. (6), S. 1284-1291.
- Helling, Robert B./Goodman, Howard M./Boyer, Herbert W. (1974): Analysis of Endonuclease R-*EcoRI* Fragments of DNA from Lambdoid Bacteriophages and Other Viruses by Agarose-Gel Electrophoresis. In: Journal of Virology, 14. Jg. (5), S. 1235-1244.
- Helmann, John D./Chamberlin, Michael J. (1988): Structure and Function of Bacterial Sigma Factors. In: Annual Review of Biochemistry, 57. Jg. (1), S. 839-872.

- Henikoff, Steven et al. (1988): A large family of bacterial activator proteins. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 85. Jg. (18), S. 6602-6606.
- Herman, Christophe et al. (1998): Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the *Escherichia coli* protease HflB (FtsH). In: Genes & Development, 12. Jg. (9), S. 1348-1355.
- Herman, Christophe et al. (1995): Degradation of σ^{32} , the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92. Jg. (8), S. 3516-3520.
- Hiasa, Hiroshi (2002): The Glu-84 of the ParC Subunit Plays Critical Roles in Both Topoisomerase IV–Quinolone and Topoisomerase IV–DNA Interactions. In: Biochemistry, 41. Jg. (39), S. 11779-11785.
- Higuchi, Russell et al. (1992): Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. In: Bio/Technology, 10. Jg. (4), S. 413-417.
- Higuchi, Russell et al. (1993): Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. In: Bio/Technology, 11. Jg. (9), S. 1026-1030.
- Hilgarth, Roland S./Lanigan, Thomas M. (2020): Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction. In: MethodsX, 7. Jg., S. 1-8 (100759).
- Hinnerwisch, Jörg et al. (2005): Loops in the Central Channel of ClpA Chaperone Mediate Protein Binding, Unfolding, and Translocation. In: Cell, 121. Jg. (7), S. 1029-1041.
- Hinz, Aaron et al. (2011): Membrane Proteases and Aminoglycoside Antibiotic Resistance. In: Journal of Bacteriology, 193. Jg. (18), S. 4790-4797.
- Hochschule Neu-Ulm (HNU) (o. J.): Zitierstile an der HNU. Downloads für EndNote. HNU Basic (Harvard). Version 1.0. URL: <https://www.hnu.de/studium/im-studium/bibliothek/wissenschaftliches-arbeiten/zitiersoftware/zitierstile-an-der-hnu> (03.03.2021).
- Hollingshead, Susan/Vapnek, Daniel (1985): Nucleotide Sequence Analysis of a Gene Encoding a Streptomycin/Spectinomycin Adenyltransferase. In: Plasmid, 13. Jg. (1), S. 17-30.
- Hong, Yuzhi et al. (2019): Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 116. Jg. (20), S. 10064-10071.
- Hooper, David C./Jacoby, George A. (2016): Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. In: Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 6. Jg. (9), S. 1-21 (a025320).
- Hopkins, Katie L./Arnold, Catherine/Threlfall, E. John (2007): Rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* using Pyrosequencing® technology. In: Journal of Microbiological Methods, 68. Jg. (1), S. 163-171.
- Hopkins, Katie L./Davies, Robert H./Threlfall, E. John (2005): Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. In: International Journal of Antimicrobial Agents, 25. Jg. (5), S. 358-373.
- Horton, Robert M. et al. (1989): Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. In: Gene, 77. Jg. (1), S. 61-68.
- Horzempa, Joseph et al. (2010): *Francisella tularensis* Δ *pyrF* Mutants Show that Replication in Nonmacrophages Is Sufficient for Pathogenesis *In Vivo*. In: Infection and Immunity 78. Jg. (6), S. 2607-2619.
- Hoskins, Joel R./Kim, Soon-Young/Wickner, Sue (2000): Substrate Recognition by the ClpA Chaperone Component of ClpAP Protease. In: Journal of Biological Chemistry, 275. Jg. (45), S. 35361-35367.
- Hoskins, Joel R. et al. (2000): Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97. Jg. (16), S. 8892-8897.
- Hsu, Patrick D. et al. (2013): DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. In: Nature Biotechnology, 31. Jg. (9), S. 827-832.
- Huang, Hsin-Hui et al. (2018): ClpA and HtpX Proteases Are Involved in Intrinsic Aminoglycoside Resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* and Are Potential Aminoglycoside Adjuvant Targets. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 62. Jg. (8), S. 1-6 (e00554-18).

- Huang, Mei-Mei/Arnheim, Norman/Goodman, Myron F. (1992): Extension of base mispairs by *Taq* DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. In: *Nucleic Acids Research* 20. Jg. (17), S. 4567-4573.
- Huen, Michael S. Y. et al. (2006): The involvement of replication in single stranded oligonucleotide-mediated gene repair. In: *Nucleic Acids Research* 34. Jg. (21), S. 6183-6194.
- Hwang, Byung Joon et al. (1987): *Escherichia coli* contains a soluble ATP-dependent protease (Ti) distinct from protease La. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84. Jg. (16), S. 5550-5554.
- Hyman, Edward David (1988): A New Method of Sequencing DNA. In: *Analytical Biochemistry*, 174. Jg. (2), S. 423-436.
- Illigmann, Astrid et al. (2021): Contribution of the Clp Protease to Bacterial Survival and Mitochondrial Homeostasis. In: *Microbial Physiology*, 31. Jg. (3), S. 260-279.
- Illumina Inc. (2017): An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. URL: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf (25.03.2022).
- Illumina Inc. (2018): Illumina CMOS Chip and One-Channel SBS Chemistry. URL: <https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/techspotlights/cmos-tech-note-770-2013-054.pdf> (29.03.2022).
- Illumina Inc. (2020a): NovaSeq 6000. Handbuch zum Sequenziersystem. September 2020. URL: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/translations/novaseq-6000-system-guide-1000000019358-deu.pdf (25.03.2022).
- Illumina Inc. (2020b): NovaSeq™ 6000-Sequenziersystem. URL: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/novaseq-6000-system-specification-sheet-770-2016-025-translations/novaseq-6000-system-specification-sheet-770-2016-025-deu.pdf> (25.03.2022).
- Imlay, James A. (2008): Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. In: *Annual Review of Biochemistry*, 77. Jg. (1), S. 755-776.
- Imlay, James A. (2013): The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. In: *Nature Reviews Microbiology*, 11. Jg. (7), S. 443-454.
- Imlay, James A. (2015): Transcription Factors That Defend Bacteria Against Reactive Oxygen Species. In: *Annual Review of Microbiology*, 69. Jg. (1), S. 93-108.
- Imlay, James A./Fridovich, Irwin (1991): Assay of Metabolic Superoxide Production in *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry*, 266. Jg. (11), S. 6957-6965.
- Institut für Arbeitsschutz (IFA) der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV) (2022): Liste der krebserzeugenden, keimzellmutagenen und reproduktionstoxischen Stoffe (KMR-Stoffe). Stand: August 2022. URL: <https://publikationen.dguv.de/forschung/ifa/allgemeine-informationen/3517/liste-der-krebserzeugenden-keimzellmutagenen-und-reproduktionstoxischen-stoffe-kmr-stoffe> und <https://publikationen.dguv.de/widgets/pdf/download/article/3517> (08.05.2023).
- Iuchi, S./Lin, E. C. C. (1988): *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85. Jg. (6), S. 1888-1892.
- Iyer, Lakshminarayan M. et al. (2004): Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. In: *Journal of Structural Biology*, 146. Jg. (1-2), S. 11-31.
- Jacoby, George A./Strahilevitz, Jacob/Hooper, David C. (2014): Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. In: *Microbiology Spectrum*, 2. Jg. (5), S. 1-24.
- Jacques, Samuel et al. (2020): Imipridone Anticancer Compounds Ectopically Activate the ClpP Protease and Represent a New Scaffold for Antibiotic Development. In: *Genetics*, 214. Jg. (4), S. 1103-1120.

- Jair, Kam-Wing et al. (1995): Purification and Regulatory Properties of MarA Protein, a Transcriptional Activator of *Escherichia coli* Multiple Antibiotic and Superoxide Resistance Promoters. In: Journal of Bacteriology, 177. Jg. (24), S. 7100-7104.
- Jang, J. et al. (2017): Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications - a review. In: Journal of Applied Microbiology, 123. Jg. (3), S. 570-581.
- Jensen, Kaj Frank (1993): The *Escherichia coli* K-12 "Wild Types" W3110 and MG1655 Have an *rph* Frameshift Mutation That Leads to Pyrimidine Starvation Due to Low *pyrE* Expression Levels. In: Journal of Bacteriology 175. Jg. (11), S. 3401-3407.
- Jinek, Martin et al. (2012): A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. In: Science, 337. Jg. (6096), S. 816-821.
- Johnsen, M. et al. (1982): Autogenous control: ribosomal protein L10-L12 complex binds to the leader sequence of its mRNA. In: The EMBO Journal 1. Jg. (8), S. 999-1004.
- Kamada, Katsuhiko/Hanaoka, Fumio/Burley, Stephen K. (2003): Crystal Structure of the MazE/MazF Complex: Molecular Bases of Antidote-Toxin Recognition. In: Molecular Cell, 11. Jg. (4), S. 875-884.
- Katayama-Fujimura, Yoko/Gottesman, Susan/Maurizi, Michael R. (1987): A Multiple-component, ATP-dependent Protease from *Escherichia coli*. In: Journal of Biological Chemistry, 262. Jg. (10), S. 4477-4485.
- Katayama, Yoko et al. (1988): The Two-component, ATP-dependent Clp Protease of *Escherichia coli*. Purification, Cloning, and Mutational Analysis of the ATP-binding Component. In: Journal of Biological Chemistry, 263. Jg. (29), S. 15226-15236.
- Katayama, Yoko et al. (1990): Regulation of Activity of an ATP-Dependent Protease, Clp, by the Amount of a Subunit, ClpA, in the Growth of *Escherichia coli* Cells. In: The Journal of Biochemistry, 108. Jg. (1), S. 37-41.
- Keren, Iris et al. (2013): Killing by Bactericidal Antibiotics Does Not Depend on Reactive Oxygen Species. In: Science, 339. Jg. (6124), S. 1213-1216.
- Kern, Winfried V. (2021): Antibiotika und Antiinfektiva. In: Ludwig, Wolf-Dieter/Mühlbauer, Bernd/Seifert, Roland (Hrsg.): Arzneiverordnungs-Report 2021. Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare. Berlin: Springer-Verlag, S. 207-229.
- Kessel, Martin et al. (1995): Homology in Structural Organization Between *E. coli* ClpAP Protease and the Eukaryotic 26 S Proteasome. In: Journal of Molecular Biology, 250. Jg. (5), S. 587-594.
- Kessel, Martin et al. (1996): Six-fold rotational symmetry of ClpQ, the *E. coli* homolog of the 20S proteasome, and its ATP-dependent activator, ClpY. In: FEBS Letters, 398. Jg. (2-3), S. 274-278.
- Kihara, Akio/Akiyama, Yoshinori/Ito, Koreaki (1995): FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92. Jg. (10), S. 4532-4536.
- Kihara, Akio/Akiyama, Yoshinori/Ito, Koreaki (1996): A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. In: The EMBO Journal 15. Jg. (22), S. 6122-6131.
- Kihara, Akio/Akiyama, Yoshinori/Ito, Koreaki (1999): Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. In: The EMBO Journal 18. Jg. (11), S. 2970-2981.
- Kim, Donghyuk et al. (2018): Systems assessment of transcriptional regulation on central carbon metabolism by Cra and CRP. In: Nucleic Acids Research 46. Jg. (6), S. 2901-2917.
- Kim, Hong Bin et al. (2009): *oqxAB* Encoding a Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae*. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53. Jg. (8), S. 3582-3584.
- Kim, Sora et al. (2020): ClpAP proteolysis does not require rotation of the ClpA unfoldase relative to ClpP. In: eLife, 9. Jg., S. 1-12 (e61451).
- Kim, Yong-In et al. (2001): Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. In: Nature Structural Biology, 8. Jg. (3), S. 230-233.
- Kirstein, Janine et al. (2009): The antibiotic ADEP reprogrammes ClpP, switching it from a regulated to an uncontrolled protease. In: EMBO Molecular Medicine 1. Jg. (1), S. 37-49.

- Klett, R. P./Cerami, A./Reich, E. (1968): Exonuclease VI, a new nuclease activity associated with *E. coli* DNA polymerase. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 60. Jg. (3), S. 943-950.
- Klugman, Keith P./Levin, Bruce R. (2006): One enzyme inactivates two antibiotics. In: Nature Medicine, 12. Jg. (1), S. 19-20.
- Kohanski, Michael A. et al. (2007): A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. In: Cell, 130. Jg. (5), S. 797-810.
- Komp Lindgren, Patricia/Karlsson, Åsa/Hughes, Diarmaid (2003): Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47. Jg. (10), S. 3222-3232.
- Kosicki, Michael/Tomberg, Kärt/Bradley, Allan (2018): Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. In: Nature Biotechnology, 36. Jg. (8), S. 765-771.
- Kotamarthi, Hema Chandra/Sauer, Robert T./Baker, Tania A. (2020): The Non-dominant AAA+ Ring in the ClpAP Protease Functions as an Anti-stalling Motor to Accelerate Protein Unfolding and Translocation. In: Cell Reports, 30. Jg. (8), S. 2644-2654.
- Kress, Wolfgang/Mutschler, Hannes/Weber-Ban, Eilika (2007): Assembly Pathway of an AAA+ Protein: Tracking ClpA and ClpAP Complex Formation in Real Time. In: Biochemistry, 46. Jg. (21), S. 6183-6193.
- Kress, Wolfgang/Mutschler, Hannes/Weber-Ban, Eilika (2009): Both ATPase Domains of ClpA Are Critical for Processing of Stable Protein Structures. In: Journal of Biological Chemistry, 284. Jg. (45), S. 31441-31452.
- Krzywda, Szymon et al. (2002a): Crystallization of the AAA domain of the ATP--dependent protease FtsH of *Escherichia coli*. In: Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 58. Jg. (6-2), S. 1066-1067.
- Krzywda, Szymon et al. (2002b): The Crystal Structure of the AAA Domain of the ATP-Dependent Protease FtsH of *Escherichia coli* at 1.5 Å Resolution. In: Structure, 10. Jg. (8), S. 1073-1083.
- Kurth, Isabel/O'Donnell, Mike (2009): Replisome Dynamics during Chromosome Duplication. In: EcoSal Plus, 3. Jg. (2), S. 1-25.
- Lam, P.-L. et al. (2020): The role of reactive oxygen species in the biological activity of antimicrobial agents: An updated mini review. In: Chemico-Biological Interactions, 320. Jg., S. 1-13 (109023).
- Lambden, P. R./Guest, J. R. (1976): Mutants of *Escherichia coli* K12 Unable to use Fumarate as an Anaerobic Electron Acceptor. In: Microbiology, 97. Jg. (2), S. 145-160.
- Laponogov, Ivan et al. (2009): Structural insight into the quinolone–DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. In: Nature Structural & Molecular Biology, 16. Jg. (6), S. 667-669.
- Lee, Byung-Gil et al. (2010): Structures of ClpP in complex with acyldepsipeptide antibiotics reveal its activation mechanism. In: Nature Structural & Molecular Biology, 17. Jg. (4), S. 471-478.
- Lee, Hyunji/Kim, Jin-Soo (2018): Unexpected CRISPR on-target effects. In: Nature Biotechnology, 36. Jg. (8), S. 703-704.
- Lee, Ki-Young/Lee, Bong-Jin (2016): Structure, Biology, and Therapeutic Application of Toxin–Antitoxin Systems in Pathogenic Bacteria. In: Toxins, 8. Jg. (10), S. 1-33 (305).
- Lehnherr, Hansjörg/Yarmolinsky, Michael B. (1995): Addiction protein Phd of plasmid prophage P1 is a substrate of the ClpXP serine protease of *Escherichia coli*. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92. Jg. (8), S. 3274-3277.
- Leshner, George Y. et al. (1962): 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. In: Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 5. Jg. (5), S. 1063-1065.
- Levchenko, Igor et al. (2000): A Specificity-Enhancing Factor for the ClpXP Degradation Machine. In: Science, 289. Jg. (5488), S. 2354-2356.
- Levene, Howard (1960): Robust Tests for Equality of Variances. In: Olkin, Ingram et al. (Hrsg.): Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling. Palo Alto, Kalifornien, USA: Stanford University Press, S. 278-292.

- Levine, Myron M. (1987): *Escherichia coli* that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. In: The Journal of Infectious Diseases, 155. Jg. (3), S. 377-389.
- Li, Dominic Him Shun et al. (2010): Acyldepsipeptide Antibiotics Induce the Formation of a Structured Axial Channel in ClpP: A Model for the ClpX/ClpA-bound State of ClpP. In: Chemistry & Biology 17. Jg. (9), S. 959-969.
- Lichtinger, U./Greifengberg, V./Gessner, A. (2020): „Antibiotic-stewardship“ (ABS)-Strategien in der urologischen Praxis und Klinik. In: Der Urologe, 59. Jg. (12), S. 1472-1479.
- Lies, Mark/Maurizi, Michael R. (2008): Turnover of Endogenous SsrA-tagged Proteins Mediated by ATP-dependent Proteases in *Escherichia coli*. In: The Journal of Biological Chemistry, 283. Jg. (34), S. 22918-22929.
- Lin, Yanni et al. (2014): CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. In: Nucleic Acids Research 42. Jg. (11), S. 7473-7485.
- Lindahl, Lasse et al. (1975): Cluster of genes in *Escherichia coli* for ribosomal proteins, ribosomal RNA, and RNA polymerase subunits. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 72. Jg. (7), S. 2743-2747.
- Linde, Hans-Jörg et al. (2000): In Vivo Increase in Resistance to Ciprofloxacin in *Escherichia coli* Associated with Deletion of the C-Terminal Part of MarR. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44. Jg. (7), S. 1865-1868.
- Little, Stephen (1995): Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) Analysis of Point Mutations. In: Current Protocols in Human Genetics, 7. Jg. (1), S. 9.8.1-9.8.12.
- Liu, Xiaoxi et al. (2016): Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. In: Scientific Reports, 6. Jg. (19675), S. 1-9.
- Liu, Yuanyuan/Imlay, James A. (2013): Cell Death from Antibiotics Without the Involvement of Reactive Oxygen Species. In: Science, 339. Jg. (6124), S. 1210-1213.
- Livak, Kenneth J./Schmittgen, Thomas D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. In: Methods, 25. Jg. (4), S. 402-408.
- Loewen, Peter C. (1984): Isolation of Catalase-Deficient *Escherichia coli* Mutants and Genetic Mapping of *katE*, a Locus That Affects Catalase Activity. In: Journal of Bacteriology, 157. Jg. (2), S. 622-626.
- Loewen, Peter C./Switala, Jacek (1986): Purification and characterization of catalase HPII from *Escherichia coli* K12. In: Biochemistry and Cell Biology, 64. Jg. (7), S. 638-646.
- Lomovskaya, O. L./Kidwell, J. P./Matin, A. (1994): Characterization of the σ^{38} -Dependent Expression of a Core *Escherichia coli* Starvation Gene, *pexB*. In: Journal of Bacteriology, 176. Jg. (13), S. 3928-3935.
- Lopez, Kyle E. et al. (2020): Conformational plasticity of the ClpAP AAA+ protease couples protein unfolding and proteolysis. In: Nature Structural & Molecular Biology, 27. Jg. (5), S. 406-416.
- Lou, Hubing et al. (2011): Altered Antibiotic Transport in OmpC Mutants Isolated from a Series of Clinical Strains of Multi-Drug Resistant *E. coli*. In: PLoS One, 6. Jg. (10), S. 1-15 (e25825).
- Lovett, Susan T. (2011): The DNA Exonucleases of *Escherichia coli*. In: EcoSal Plus, 4. Jg. (2), S. 1-30.
- Luhachack, Lyly et al. (2019): Transcription factor YcjW controls the emergency H₂S production in *E. coli*. In: Nature Communications 10. Jg. (1), S. 1-8 (2868).
- Luo, Jianying et al. (1996): Molecular anatomy of the β' subunit of the *E. coli* RNA polymerase: identification of regions involved in polymerase assembly. In: Genes to Cells, 1. Jg. (9), S. 819-827.
- Lynch, A. Simon/Lin, Edmund C. C. (1996): Transcriptional Control Mediated by the ArcA Two-Component Response Regulator Protein of *Escherichia coli*: Characterization of DNA Binding at Target Promoters. In: Journal of Bacteriology, 178. Jg. (21), S. 6238-6249.
- Ma, Dzwokai et al. (1996): The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. In: Molecular Microbiology, 19. Jg. (1), S. 101-112.

- Ma, Dzwokai et al. (1993): Molecular Cloning and Characterization of *acrA* and *acrE* Genes of *Escherichia coli*. In: Journal of Bacteriology, 175. Jg. (19), S. 6299-6313.
- Ma, Dzwokai et al. (1995): Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. In: Molecular Microbiology, 16. Jg. (1), S. 45-55.
- Madhusudan, S. et al. (2005): Independent regulation of H-NS-mediated silencing of the *bgl* operon at two levels: upstream by BglJ and LeuO and downstream by DnaKJ. In: Microbiology, 151. Jg. (10), S. 3349-3359.
- Malik, Imran T./Brötz-Oesterhelt, Heike (2017): Conformational control of the bacterial Clp protease by natural product antibiotics. In: Natural Product Reports, 34. Jg. (7), S. 815-831.
- Malik, Muhammad/Zhao, Xilin/Drlica, Karl (2006): Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. In: Molecular Microbiology, 61. Jg. (3), S. 810-825.
- Malina, Abba et al. (2015): PAM multiplicity marks genomic target sites as inhibitory to CRISPR-Cas9 editing. In: Nature Communications, 6. Jg. (10124), S. 1-6.
- Mandel, M./Higa, A. (1970): Calcium-dependent Bacteriophage DNA Infection. In: Journal of Molecular Biology, 53. Jg. (1), S. 159-162.
- Marians, Kenneth J. et al. (1998): Role of the Core DNA Polymerase III Subunits at the Replication Fork. α is the only subunit required for processive replication. In: Journal of Biological Chemistry, 273. Jg. (4), S. 2452-2457.
- Martínez-Martínez, Luis/Pascual, Alvaro/Jacoby, George A. (1998): Quinolone resistance from a transferable plasmid. In: The Lancet, 351. Jg. (9105), S. 797-799.
- Martinez-Medina, Margarita (2021): Special Issue: Pathogenic *Escherichia coli*: Infections and Therapies. In: Antibiotics (Basel), 10. Jg. (2), S. 1-2 (112).
- Massé, Eric/Drolet, Marc (1999): Relaxation of Transcription-induced Negative Supercoiling Is an Essential Function of *Escherichia coli* DNA Topoisomerase I. In: Journal of Biological Chemistry, 274. Jg. (23), S. 16654-16658.
- Matthews, John C./Hori, Kazuo/Cormier, Milton J. (1977): Purification and Properties of *Renilla reniformis* Luciferase. In: Biochemistry, 16. Jg. (1), S. 85-91.
- Matthiessen, Nina (2007): Die Rolle der Expression und Regulation der AcrAB/- und AcrEF/TolC-Effluxpumpe bei der Entwicklung der Fluorchinolonresistenz in *Escherichia coli*. Dissertation. Universität Hamburg.
- Maurizi, Michael R. et al. (1998): Molecular Properties of ClpAP Protease of *Escherichia coli*: ATP-Dependent Association of ClpA and ClpP. In: Biochemistry, 37. Jg. (21), S. 7778-7786.
- McGinness, Kathleen E./Baker, Tania A./Sauer, Robert T. (2006): Engineering Controllable Protein Degradation. In: Molecular Cell, 22. Jg. (5), S. 701-707.
- Melamede, Robert J. (1989): Automatable Process for Sequencing Nucleotide. Patent Number: US 4863849. United States. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/42/be/85/5874c716207b87/US4863849.pdf> (27.05.2021).
- Menzel, Rolf/Gellert, Martin (1983): Regulation of the Genes for *E. coli* DNA Gyrase: Homeostatic Control of DNA Supercoiling. In: Cell, 34. Jg. (1), S. 105-113.
- Merck KGaA - Sigma-Aldrich® (o. J.): Phosphorothioate Oligonucleotides. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/en/technical-documents/technical-article/genomics/gene-expression-and-silencing/phosphorothioates> (01.07.2021).
- Mets, Toomas et al. (2019): Fragmentation of *Escherichia coli* mRNA by MazF and MqsR. In: Biochimie, 156. Jg., S. 79-91.
- Missiakas, Dominique et al. (1996): Identification and characterization of HslV HslU (ClpQ ClpY) proteins involved in overall proteolysis of misfolded proteins in *Escherichia coli*. In: The EMBO Journal 15. Jg. (24), S. 6899-6909.
- Mitscher, Lester A. (2005): Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. In: Chemical Reviews, 105. Jg. (2), S. 559-592.
- Molecular Genome Engineering Lab - Hanyang University Korea (2016): Cas-OFFinder. Version 2.4 vom 18.08.2016. URL: <http://www.rgenome.net/cas-offinder/> (30.06.2021).
- Moll, Isabella/Engelberg-Kulka, Hanna (2012): Selective translation during stress in *Escherichia coli*. In: Trends in Biochemical Sciences, 37. Jg. (11), S. 493-498.

- Moreno-Cinos, Carlos et al. (2019a): ClpP Protease, a Promising Antimicrobial Target. In: International journal of molecular sciences, 20. Jg. (9), S. 1-19 (2232).
- Moreno-Cinos, Carlos et al. (2019b): α -Amino Diphenyl Phosphonates as Novel Inhibitors of *Escherichia coli* ClpP Protease. In: Journal of Medicinal Chemistry, 62. Jg. (2), S. 774-797.
- Morgan-Linnell, Sonia K. et al. (2009): Mechanisms Accounting for Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Clinical Isolates. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53. Jg. (1), S. 235-241.
- Mukerji, Mitali/Mahadevan, S. (1997): Characterization of the negative elements involved in silencing the *bgl* operon of *Escherichia coli*: possible roles for DNA gyrase, H-NS, and CRP-cAMP in regulation. In: Molecular Microbiology, 24. Jg. (3), S. 617-627.
- Muñoz-Gómez, Ana J. et al. (2004): Insights into the specificity of RNA cleavage by the *Escherichia coli* MazF toxin. In: FEBS Letters, 567. Jg. (2-3), S. 316-320.
- Murphy, Kenan C. (2016): λ Recombination and Recombineering. In: EcoSal Plus, 7. Jg. (1), S. 1-70.
- Murray, Christopher J. L. et al. (2022): Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. In: The Lancet, 399. Jg. (10325), S. 629-655.
- Muse, Wilson B./Bender, Robert A. (1998): The *nac* (Nitrogen Assimilation Control) Gene from *Escherichia coli*. In: Journal of Bacteriology, 180. Jg. (5), S. 1166-1173.
- Naas, T./Poirel, L./Nordmann, P. (2006): Pyrosequencing for rapid identification of carbapenem-hydrolysing OXA-type β -lactamases in *Acinetobacter baumannii*. In: Clinical Microbiology and Infection, 12. Jg. (12), S. 1236-1240.
- Nawrot, Barbara et al. (2008): Significance of Stereochemistry of 3'-Terminal Phosphorothioate-modified Primer in DNA Polymerase-mediated Chain Extension. In: Molecular Biotechnology, 40. Jg. (2), S. 119-126.
- Neuwald, Andrew F. et al. (1999): AAA+: A Class of Chaperone-Like ATPases Associated with the Assembly, Operation, and Disassembly of Protein Complexes. In: Genome Research, 9. Jg. (1), S. 27-43.
- New England Biolabs Inc. (2020a): Instruction Manual. Luna[®]Universal qPCR Master Mix NEB #M3003S/L/X/E. Version 3.0_3/20. URL: <https://international.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manualm3003.pdf?rev=12bf5f6f65d1419abe87fc7dabd213a2&hash=5A1C0B7B2B88F4AF5488A385CB4A8D89> (15.06.2021).
- New England Biolabs Inc. (2020b): Instruction Manual. LunaScript[®]RT SuperMix Kit NEB #E3010S/L. Version 2.0_1/20. URL: <https://international.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manuale3010.pdf?rev=9ee3b8361a354dfaad920996add77cd4&hash=52150CFF97928513E952302AFCECE654> (11.06.2021).
- New England Biolabs Inc. (2020c): Instruction Manual. Monarch[®] Plasmid Miniprep Kit NEB #T1010S/L. Version 3.0_7/20. URL: <https://international.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manualt1010.pdf> (04.03.2021).
- New England Biolabs Inc. (2020d): Instruction Manual. Monarch[®]RNA Cleanup Kits NEB #T2030S/L, #T2040S/L, #T2050S/L. Version 3.0_04/20. URL: https://international.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manualt2030_t2040_t2050.pdf?rev=31bf7f3e409478dbee85ed4be1c905a&hash=88C78327DD2744C23C40DE6784370973 (09.06.2021).
- New England Biolabs Inc. (2020e): Instruction Manual. Monarch[®]Total RNA Miniprep Kit NEB #T2010S. Version 3.0_04/20. URL: <https://international.neb.com/-/media/nebus/files/manuals/manualt2010.pdf?rev=34f1f73e4b4745e092daffc595549c93&hash=975C85E66068BE342CC20A2E9304EEEE> (09.06.2021).
- New England BioLabs Inc. (2020f): Tm Calculator. Version 1.13.0. URL: <https://tmcalculator.neb.com/#!/main> (22.04.2021).
- New England Biolabs Inc. (2021): NEBioCalculator[®]. Version 1.13.1 vom 06.05.2021. Ligation Calculator. URL: <https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation> (17.05.2021).
- New England Biolabs Inc. (o. J.-a): Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase. Datasheet M0491. Datasheet-Lot 0041207. URL: <https://international.neb.com/-/media/catalog/datasheets-or-manuals/m0491-datasheet-lot0041207.pdf?rev=12bb5a983af2431ea62a3620ab33d1df> (22.04.2021).

- New England Biolabs Inc. (o. J.-b): Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder. URL: <https://international.neb.com/products/n0550-quick-load-purple-1-kb-plus-dna-ladder#Product%20Information> (28.09.2022).
- New England Biolabs Inc. (o. J.-c): Restriktionsenzyme. URL: <https://www.neb-online.de/klonierung-synthetische-biologie/restriktionsenzyme/> (17.05.2021).
- Newton, C. R. et al. (1989): Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). In: *Nucleic acids research*, 17. Jg. (7), S. 2503-2516.
- Nicoloff, Hervé/Andersson, Dan I. (2013): Lon protease inactivation, or translocation of the *lon* gene, potentiates bacterial evolution to antibiotic resistance. In: *Molecular Microbiology*, 90. Jg. (6), S. 1233-1248.
- Nigam, Akanksha et al. (2019): Stress-Induced MazF-Mediated Proteins in *Escherichia coli*. In: *mBio*, 10. Jg. (2), S. 1-9 (e00340-19).
- Nikaido, Hiroshi (1976): Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: Transmembrane diffusion of some hydrophobic substances. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 433. Jg. (1), S. 118-132.
- Nikaido, Hiroshi (1992): Porins and specific channels of bacterial outer membranes. In: *Molecular Microbiology*, 6. Jg. (4), S. 435-442.
- Nishino, Kunihiko/Nikaido, Eiji/Yamaguchi, Akihito (2009): Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794. Jg. (5), S. 834-843.
- Norton, I. T. et al. (1986): Dynamics of Molecular Organization in Agarose Sulphate. In: *Biopolymers*, 25. Jg. (6), S. 1009-1029.
- Novick, Richard P. (1987): Plasmid Incompatibility. In: *Microbiological Reviews*, 51. Jg. (4), S. 381-395.
- O'Neill, Jim (2016): Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. In: *The Review on Antimicrobial Resistance*, S. 1-84.
- Ochman, Howard/Gerber, Anne S./Hartl, Daniel L. (1988): Genetic Applications of an Inverse Polymerase Chain Reaction. In: *Genetics*, 120. Jg. (3), S. 621-623.
- Ogura, Teru et al. (1991): Structure and Function of the *ftsH* Gene in *Escherichia coli*. In: *Research in Microbiology*, 142. Jg. (2-3), S. 279-282.
- Olivares, Adrian O. et al. (2014): Mechanochemical basis of protein degradation by a double-ring AAA+ machine. In: *Nature Structural & Molecular Biology*, 21. Jg. (10), S. 871-875.
- Oram, Mark/Fisher, L. Mark (1991): 4-Quinolone Resistance Mutations in the DNA Gyrase of *Escherichia coli* Clinical Isolates Identified by Using the Polymerase Chain Reaction. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35. Jg. (2), S. 387-389.
- Oron-Gottesman, Adi et al. (2016): A Stress-Induced Bias in the Reading of the Genetic Code in *Escherichia coli*. In: *mBio*, 7. Jg. (6), S. 1-11 (e01855-16).
- Ow, David W. et al. (1986): Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants. In: *Science*, 234. Jg. (4778), S. 856-859.
- Palleroni, Norberto J./Bradbury, John F. (1993): *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. In: *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43. Jg. (3), S. 606-609.
- Park, Dan M. et al. (2013): The Bacterial Response Regulator ArcA Uses a Diverse Binding Site Architecture to Regulate Carbon Oxidation Globally. In: *PLoS genetics*, 9. Jg. (10), S. 1-18 (e1003839).
- Park, Seong-Cheol et al. (2006): Oligomeric Structure of the ATP-dependent Protease La (Lon) of *Escherichia coli*. In: *Molecules and Cells*, 21. Jg. (1), S. 129-134.
- Park, Soon-Jung/Tseng, Ching-Ping/Gunsalus, Robert P. (1995): Regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) operon expression in *Escherichia coli* in response to carbon supply and anaerobiosis: role of ArcA and Fnr. In: *Molecular Microbiology*, 15. Jg. (3), S. 473-482.
- Peng, Hong/Marians, Kenneth J. (1993): *Escherichia coli* Topoisomerase IV. Purification, Characterization, Subunit Structure, and Subunit Interactions. In: *Journal of Biological Chemistry*, 268. Jg. (32), S. 24481-24490.

- Peng, Hong/Marians, Kenneth J. (1995): The Interaction of *Escherichia coli* Topoisomerase IV with DNA. In: Journal of Biological Chemistry, 270. Jg. (42), S. 25286-25290.
- Peracchi, Alessio et al. (2017): Nit1 is a metabolite repair enzyme that hydrolyzes deaminated glutathione. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114. Jg. (16), S. E3233-E3242.
- Périchon, Bruno/Courvalin, Patrice/Galimand, Marc (2007): Transferable Resistance to Aminoglycosides by Methylation of G1405 in 16S rRNA and to Hydrophilic Fluoroquinolones by QepA-Mediated Efflux in *Escherichia coli*. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51. Jg. (7), S. 2464-2469.
- Petersen, Uwe (2001): Die Evolution der Chinolone: Von der Nalidixinsäure zu den Chinolonen der dritten Generation. In: Pharmazie in unserer Zeit, 30. Jg. (5), S. 376-381.
- Pettersson, I./Hardy, S. J. S./Liljas, A. (1976): The ribosomal protein L8 is a complex of L7/L12 and L10. In: FEBS Letters, 64. Jg. (1), S. 135-138.
- Pfaffl, Michael W. (2004): Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin, S. A. (Hrsg.): A-Z of quantitative PCR. La Jolla, CA, USA International University Line (IUL), S. 87-112.
- Pham, Thu D. M./Ziora, Zyta M./Blaskovich, Mark A. T. (2019): Quinolone antibiotics. In: MedChemComm, 10. Jg. (10), S. 1719-1739.
- Poolman, Jan T./Wacker, Michael (2016): Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. In: The Journal of Infectious Diseases, 213. Jg. (1), S. 6-13.
- Poteete, Anthony R. (2001): What makes the bacteriophage λ Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. In: FEMS Microbiology Letters, 201. Jg. (1), S. 9-14.
- Potter, Barry V. L./Eckstein, Fritz (1984): Cleavage of Phosphorothioate-substituted DNA by Restriction Endonucleases. In: Journal of Biological Chemistry, 259. Jg. (23), S. 14243-14248.
- Promega Corporation (2010): Technical Reference. Genetic Markers in *E. coli* and EndA+ versus EndA- Strains. URL: https://www.promega.de/~media/Files/Resources/Technical%20References/Genetic%20Markers%20of%20E%20Coli.pdf?utm_source=promega&utm_medium=Vanity&utm_campaign=promega_germany (12.01.2022).
- Promega Corporation (2015a): Technical Bulletin. Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System. Instructions for use of Products E1910 and E1960. Version 6/15. URL: <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf?rev=f0acb9ea85df40e3b3c9a6ec6152a844&la=en> (20.01.2022).
- Promega Corporation (2015b): Technical Bulletin. Luciferase Assay System. Instructions for Use of Products E1483, E1500, E1501, E1531, E4030, E4530 and E4550. Version 8/15. URL: https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/luciferase-assay-system-protocol.pdf?rev=b73c835cb028486a899d4eac5deda74b&sc_lang=en (05.01.2022).
- Promega Corporation (2017): Technical Bulletin. pGEM[®]-*luc* Vector. Instructions for Use of Product. E1541. Version 6/17. URL: <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/pgem-luc-vector-protocol.pdf?rev=f94ce8054ac7408398e01d8430f03f66&la=en> (05.01.2022).
- Pruss, Gail J./Drlica, Karl (1989): DNA Supercoiling and Prokaryotic Transcription. In: Cell, 56. Jg. (4), S. 521-523.
- Putney, Scott D./Benkovic, Stephen J./Schimmel, Paul R. (1981): A DNA fragment with an α -phosphorothioate nucleotide at one end is asymmetrically blocked from digestion by exonuclease III and can be replicated *in vivo*. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 78. Jg. (12), S. 7350-7354.
- Pyrosequencing[®] AB (2002): The Principle of Pyrosequencing[™] Technology. Technical Note 101. URL: <https://www.cragenomica.es/sites/default/files/pyrosequencingtechnology.pdf> (02.06.2021).

- Pyrosequencing® AB (2003): Getting Started Guide. PSQ™ 96MA System. Code number 50-0145. S. 1-33.
- QIAGEN GmbH (2020a): DNeasy® Blood & Tissue Handbook. URL: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=68f29296-5a9f-40fa-8b3d-1c148d0b3030&lang=en> (22.03.2022).
- QIAGEN GmbH (2020b): RNAprotect® Bacteria Reagent Handbook. URL: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=420ecb63-edb0-4cc6-8f40-22a5b3d20bad&lang=en> (03.06.2021).
- Rabold, Denise et al. (2022): Strategien zum rationalen Antibiotikaeinsatz im ambulanten Sektor – Ergebnisse eines Workshops mit wichtigen Akteuren des Gesundheitswesens. In: Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 65. Jg. (6), S. 725-728.
- Radecke, Sarah et al. (2006): Physical incorporation of a single-stranded oligodeoxynucleotide during targeted repair of a human chromosomal locus. In: The Journal of Gene Medicine, 8. Jg. (2), S. 217-228.
- Rajendar, Burki/Lucius, Aaron L. (2010): Molecular Mechanism of Polypeptide Translocation Catalyzed by the *Escherichia coli* ClpA Protein Translocase. In: Journal of Molecular Biology, 399. Jg. (5), S. 665-679.
- REACH Compliance GmbH (o. J.): Neue Gefahrenpiktogramme. Gefahrenpiktogramme zum Download. URL: <https://www.reach-compliance.ch/ghsclp/neuegefahrenpiktogramme/> bzw. einzeln https://www.reach-compliance.ch/downloads/GHS01_explos.png, https://www.reach-compliance.ch/downloads/GHS02_flamme.png, https://www.reach-compliance.ch/downloads/GHS03_rondflam.png, https://www.reach-compliance.ch/downloads/GHS04_bottle.png, https://www.reach-compliance.ch/downloads/GHS05_acid_red.png, https://www.reach-compliance.ch/downloads/GHS06_skull.png, https://www.reach-compliance.ch/downloads/GHS07_exclam.png, https://www.reach-compliance.ch/downloads/GHS08_silhouete.png und https://www.reach-compliance.ch/downloads/GHS09_aq-pollut.png (14.10.2021).
- Redgrave, Liam S. et al. (2014): Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. In: Trends in Microbiology, 22. Jg. (8), S. 438-445.
- Reisch, Christopher R./Prather, Kristala L. J. (2015): The no-SCAR (Scarless Cas9 Assisted Recombineering) system for genome editing in *Escherichia coli*. In: Scientific Reports, 5. Jg. (15096), S. 1-12.
- Reisch, Christopher R./Prather, Kristala L. J. (2017): Scarless Cas9 Assisted Recombineering (no-SCAR) in *Escherichia coli*, an Easy-to-Use System for Genome Editing. In: Current Protocols in Molecular Biology, 117. Jg., S. 31.8.1-31.8.20.
- Ren, Xingjie et al. (2014): Enhanced Specificity and Efficiency of the CRISPR/Cas9 System with Optimized sgRNA Parameters in *Drosophila*. In: Cell Reports, 9. Jg. (3), S. 1151-1162.
- Rice, Louis B. (2008): Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. In: The Journal of Infectious Diseases, 197. Jg. (8), S. 1079-1081.
- Ripstein, Zev A. et al. (2020): A processive rotary mechanism couples substrate unfolding and proteolysis in the ClpXP degradation machinery. In: eLife, 9. Jg., S. 1-25 (e52158).
- Robert Koch-Institut (RKI) (2012): Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. In: Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 55. Jg. (10), S. 1311-1354.
- Robert Koch-Institut (RKI) (2019a): Antibiotika und One Health. URL: <https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Antibiotikaresistenz/One-Health/Antibiotika.html> (11.10.2022).
- Robert Koch-Institut (RKI) (2019b): Das One-Health-Konzept. URL: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Antibiotikaresistenz/One-Health/One_Health-Konzept.html (10.10.2022).
- Robert Koch-Institut (RKI) (2019c): Ergänzung zur Empfehlung der KRINKO „Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen“ (2012) im Zusammenhang mit der von EUCAST neu definierten Kategorie „I“ bei der Antibiotika-

- Resistenzbestimmung: Konsequenzen für die Definition von MRGN. In: Epidemiologisches Bulletin, 9. Jg., S. 82-83.
- Robert Koch-Institut (RKI) (2022): Neue Daten aus Antibiotika-Resistenz-Surveillance (ARS) und Antibiotika-Verbrauchs-Surveillance (AVS) des Robert Koch-Instituts. URL: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Antibiotikaresistenz/RKI-Aktivitaeten/ARS_AVS.html (11.10.2022).
- Robert Koch-Institut (RKI) (o. J.): Antibiotika-Resistenz-Surveillance (ARS). Datenbank. Resistenzstatistik. URL: <https://ars.rki.de/Content/Database/ResistanceOverview.aspx> (11.10.2022).
- Robert Koch-Institut (RKI) (o. J.): Antibiotika-Verbrauchs-Surveillance (AVS). Datenbank. Antiinfektiva-Report. URL: <https://avs.rki.de/Content/ReferenceData/AIReport.aspx> (11.10.2022).
- Robicsek, Ari et al. (2006): Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. In: Nature Medicine, 12. Jg. (1), S. 83-88.
- Robinson, James T. et al. (2011): Integrative genomics viewer. In: Nature Biotechnology, 29. Jg. (1), S. 24-26.
- Robinson, Jonathan L./Brynildsen, Mark P. (2015): An ensemble-guided approach identifies ClpP as a major regulator of transcript levels in nitric oxide-stressed *Escherichia coli*. In: Metabolic Engineering, 31. Jg., S. 22-34.
- Rohrwild, Markus et al. (1996): HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93. Jg. (12), S. 5808-5813.
- Rohrwild, Markus et al. (1997): The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. In: Nature Structural Biology, 4. Jg. (2), S. 133-139.
- Ronaghi, Mostafa (2001): Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. In: Genome Research, 11. Jg. (1), S. 3-11.
- Rosario, Christopher J./Frisch, Ryan L./Bender, Robert A. (2010): The LysR-Type Nitrogen Assimilation Control Protein Forms Complexes with Both Long and Short DNA Binding Sites in the Absence of Coeffectors. In: Journal of Bacteriology, 192. Jg. (19), S. 4827-4833.
- Rotanova, Tatyana V. et al. (2006): Slicing a protease: Structural features of the ATP-dependent Lon proteases gleaned from investigations of isolated domains. In: Protein Science, 15. Jg. (8), S. 1815-1828.
- Rotanova, Tatyana V. et al. (2004): Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains. In: European Journal of Biochemistry, 271. Jg. (23-24), S. 4865-4871.
- Ruiz, Joaquim et al. (1995): High frequency of mutations at codon 83 of the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 36. Jg. (4), S. 737-738.
- Rusk, Nicole (2011): Torrents of sequence. In: Nature Methods, 8. Jg. (1), S. 44.
- Russo, Thomas A./Johnson, James R. (2000): Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. In: The Journal of Infectious Diseases, 181. Jg. (5), S. 1753-1754.
- Saier Jr., Milton H. (1998): Multiple Mechanisms Controlling Carbon Metabolism in Bacteria. In: Biotechnology and Bioengineering, 58. Jg. (2-3), S. 170-174.
- Saiki, Randall K. et al. (1988): Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. In: Science, 239. Jg. (4839), S. 487-491.
- Sak, Bart D./Eisenstark, A./Touati, D. (1989): Exonuclease III and the catalase hydroperoxidase II in *Escherichia coli* are both regulated by the *katF* gene product. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86. Jg. (9), S. 3271-3275.
- Sanchez, Joseph P. et al. (1988): Quinolone Antibacterial Agents. Synthesis and Structure-Activity Relationships of 8-Substituted Quinoline-3-carboxylic Acids and 1,8-Naphthyridine-3-carboxylic Acids. In: Journal of Medicinal Chemistry, 31. Jg. (5), S. 983-991.

- Sánchez, María B. (2015): Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. In: *Frontiers in Microbiology*, 6. Jg. (658), S. 1-7.
- Sanger, F./Nicklen, S./Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74. Jg. (12), S. 5463-5467.
- Sat, Boaz et al. (2001): Programmed Cell Death in *Escherichia coli*: Some Antibiotics Can Trigger *mazEF* Lethality. In: *Journal of Bacteriology*, 183. Jg. (6), S. 2041-2045.
- Sat, Boaz/Reches, Myriam/Engelberg-Kulka, Hanna (2003): The *Escherichia coli mazEF* Suicide Module Mediates Thymineless Death. In: *Journal of Bacteriology* 185. Jg. (6), S. 1803-1807.
- Sauert, Martina et al. (2016): The MazF-regulon: a toolbox for the post-transcriptional stress response in *Escherichia coli*. In: *Nucleic Acids Research* 44. Jg. (14), S. 6660-6675.
- Sawai, Tetsuo et al. (1992): OmpF channel permeability of quinolones and their comparison with β -lactams. In: *FEMS Microbiology Letters*, 95. Jg. (1), S. 105-108.
- Schmidt, Matthew/Zheng, Ping/Delilhas, Nicholas (1995): Secondary Structures of *Escherichia coli* Antisense *micF* RNA, the 5'-End of the Target *ompF* mRNA, and the RNA/RNA Duplex. In: *Biochemistry*, 34. Jg. (11), S. 3621-3631.
- Schmidt, Ronny et al. (2009): ClpS is the recognition component for *Escherichia coli* substrates of the N-end rule degradation pathway. In: *Molecular Microbiology*, 72. Jg. (2), S. 506-517.
- Schnetz, Karin/Rak, Bodo (1988): Regulation of the *bgl* operon of *Escherichia coli* by transcriptional antitermination. In: *The EMBO Journal* 7. Jg. (10), S. 3271-3277.
- Schnetz, Karin/Wang, James C. (1996): Silencing of the *Escherichia coli bgl* promoter: effects of template supercoiling and cell extracts on promoter activity *in vitro*. In: *Nucleic Acids Research* 24. Jg. (12), S. 2422-2428.
- Schulte, Ansgar (2001): Stabilität hoher Fluorchinolonresistenz bei Enterobakterien ohne Selektionsdruck. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Schweder, Thomas et al. (1996): Regulation of *Escherichia coli* Starvation Sigma Factor (σ^S) by ClpXP Protease. In: *Journal of Bacteriology*, 178. Jg. (2), S. 470-476.
- Seaver, Lauren Costa/Imlay, James A. (2001): Alkyl Hydroperoxide Reductase Is the Primary Scavenger of Endogenous Hydrogen Peroxide in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology*, 183. Jg. (24), S. 7173-7181.
- Sen, Ananya/Zhou, Yidan/Imlay, James A. (2020): During Oxidative Stress the Clp Proteins of *Escherichia coli* Ensure that Iron Pools Remain Sufficient To Reactivate Oxidized Metalloenzymes. In: *Journal of Bacteriology*, 202. Jg. (18), S. 1-17.
- Seol, Jae Hong et al. (1995): Requirement of ATP Hydrolysis for Assembly of ClpA/ClpP Complex, the ATP-Dependent Protease Ti in *Escherichia coli*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 217. Jg. (1), S. 41-51.
- Seong, Ihn Sik et al. (1999): ATP-dependent degradation of Sula, a cell division inhibitor, by the HslVU protease in *Escherichia coli*. In: *FEBS Letters*, 456. Jg. (1), S. 211-214.
- Sfeir, Hans-Peter (2018): Der Einfluss Plasmid-vermittelter Chinolon-Resistenzmechanismen (PMQR) auf die Entstehung klinischer Fluorchinolon-Resistenz. Dissertation. Universität Hamburg.
- Shah, Ishita M./Wolf Jr, Richard E. (2006): Sequence Requirements for Lon-dependent Degradation of the *Escherichia coli* Transcription Activator SoxS: Identification of the SoxS Residues Critical to Proteolysis and Specific Inhibition of *in vitro* Degradation by a Peptide Comprised of the N-terminal 21 Amino Acid Residues. In: *Journal of Molecular Biology*, 357. Jg. (3), S. 718-731.
- Sharan, Shyam K. et al. (2009): Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. In: *Nature Protocols*, 4. Jg. (2), S. 206-223.
- Shen, Joan/Gunsalus, Robert P. (1997): Role of multiple ArcA recognition sites in anaerobic regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) gene expression in *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology*, 26. Jg. (2), S. 223-236.
- Sherf, Bruce A. et al. (1996): Dual-Luciferase[®] Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and *Renilla* Luciferase Assays. In: *Promega Notes*, 57. Jg., S. 2-9.
- Shigehisa, Megumi et al. (2017): Stabilization of luciferase from *Renilla reniformis* using random mutations. In: *Protein Engineering, Design and Selection*, 30. Jg. (1), S. 7-13.

- Shimada, Tomohiro et al. (2011a): Novel roles of LeuO in transcription regulation of *E. coli* genome: antagonistic interplay with the universal silencer H-NS. In: *Molecular Microbiology*, 82. Jg. (2), S. 378-397.
- Shimada, Tomohiro et al. (2011b): Novel Roles of cAMP Receptor Protein (CRP) in Regulation of Transport and Metabolism of Carbon Sources. In: *PLoS One*, 6. Jg. (6), S. 1-11 (e20081).
- Shimada, Tomohiro/Yamazaki, Kaoru/Ishihama, Akira (2013): Novel regulator PgrR for switch control of peptidoglycan recycling in *Escherichia coli*. In: *Genes to Cells*, 18. Jg. (2), S. 123-134.
- Shimada, Tomohiro et al. (2014): The Whole Set of Constitutive Promoters Recognized by RNA Polymerase RpoD Holoenzyme of *Escherichia coli*. In: *PLoS One*, 9. Jg. (3), S. 1-22 (e90447).
- Shin, Sooran et al. (1997): Involvement of *iclR* and *rpoS* in the induction of *acs*, the gene for acetyl coenzyme A synthetase of *Escherichia coli* K-12. In: *FEMS Microbiology Letters*, 146. Jg. (1), S. 103-108.
- Shokri, Atefeh/Veide, Andres/Larsson, Gen (2006): *RelA1* gene control of *Escherichia coli* lipid structure and cell performance during glucose limited fed-batch conditions. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73. Jg. (2), S. 464-473.
- Shotland, Yoram et al. (2000): Characterization of a Conserved α -Helical, Coiled-coil Motif at the C-terminal Domain of the ATP-dependent FtsH (HflB) Protease of *Escherichia coli*. In: *Journal of Molecular Biology*, 299. Jg. (4), S. 953-964.
- Sinclair, Alistair/Arnold, Catherine/Woodford, Neil (2003): Rapid Detection and Estimation by Pyrosequencing of 23S rRNA Genes with a Single Nucleotide Polymorphism Conferring Linezolid Resistance in Enterococci. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47. Jg. (11), S. 3620-3622.
- Sinden, Richard R. (1994): *DNA Structure and Function*. San Diego: Academic Press, Inc.
- Singh, Satyendra K./Guo, Fusheng/Maurizi, Michael R. (1999): ClpA and ClpP Remain Associated during Multiple Rounds of ATP-Dependent Protein Degradation by ClpAP Protease. In: *Biochemistry*, 38. Jg. (45), S. 14906-14915.
- Singh, Satyendra K./Maurizi, Michael R. (1994): Mutational Analysis Demonstrates Different Functional Roles for the Two ATP-binding Sites in ClpAP Protease from *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry*, 269. Jg. (47), S. 29537-29545.
- Singh, Satyendra K. et al. (2001): Functional Domains of the ClpA and ClpX Molecular Chaperones Identified by Limited Proteolysis and Deletion Analysis. In: *Journal of Biological Chemistry*, 276. Jg. (31), S. 29420-29429.
- Skerra, Arne (1992): Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. In: *Nucleic Acids Research* 20. Jg. (14), S. 3551-3554.
- Snider, Jamie/Houry, Walid A. (2006): MoxR AAA+ ATPases: A novel family of molecular chaperones? In: *Journal of Structural Biology*, 156. Jg. (1), S. 200-209.
- Sørensen, Anders Hay et al. (2003): Conjugative Plasmid Conferring Resistance to Olaquinox. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47. Jg. (2), S. 798-799.
- Staudenbauer, Walter L./Orr, Elisha (1981): DNA gyrase: affinity chromatography on novobiocin-Sepharose and catalytic properties. In: *Nucleic Acids Research* 9. Jg. (15), S. 3589-3603.
- Stec, Wojciech J./Zon, Gerald/Uznanski, Bogdan (1985): Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of diastereomeric phosphorothioate analogues of oligodeoxyribonucleotides and other backbone-modified congeners of DNA. In: *Journal of Chromatography*, 326. Jg., S. 263-280.
- Stephani, Kunigunde/Weichart, Dieter/Hengge, Regine (2003): Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology*, 49. Jg. (6), S. 1605-1614.
- Sternglanz, Rolf et al. (1981): Mutations in the gene coding for *Escherichia coli* DNA topoisomerase I affect transcription and transposition. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78. Jg. (5), S. 2747-2751.
- Strahilevitz, Jacob et al. (2009): Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat. In: *Clinical Microbiology Reviews*, 22. Jg. (4), S. 664-689.

- Sugino, Akio et al. (1977): Mechanism of action of nalidixic acid: Purification of *Escherichia coli* *nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74. Jg. (11), S. 4767-4771.
- Suter, W./Rosselet, A./Knüsel, F. (1978): Mode of Action of Quindoxin and Substituted Quinoxaline-di-N-Oxides on *Escherichia coli*. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 13. Jg. (5), S. 770-783.
- Swanberg, Stephen L./Wang, James C. (1987): Cloning and Sequencing of the *Escherichia coli* *gyrA* Gene Coding for the A Subunit of DNA Gyrase. In: Journal of Molecular Biology, 197. Jg. (4), S. 729-736.
- Tang, Yue et al. (2005): Switching aconitase B between catalytic and regulatory modes involves iron-dependent dimer formation. In: Molecular Microbiology, 56. Jg. (5), S. 1149-1158.
- Telschow, Carsten et al. (2021): Der Arzneimittelmarkt 2020 im Überblick. In: Schröder, Helmut et al. (Hrsg.): Arzneimittel-Kompass 2021. Hochpreisige Arzneimittel - Herausforderung und Perspektiven. Berlin: Springer-Verlag, S. 241-271.
- Thermo Fisher Scientific (2019): PCR Primer Design Tips. URL: <https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/> (02.02.2022).
- Thermo Fisher Scientific (o. J.): Oligo Configuration Options. Modifications options: Internal Modifications. URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/oligo-nucleotides-primers-probes-genes/custom-dna-oligos/oligo-configuration-options.html#internal> (24.02.2021).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2009): NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer. V1.0 User Manual. URL: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf> (12.05.2021).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2011): NanoDrop 1000 Spectrophotometer. V3.8 User's Manual. URL: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf> (12.05.2021).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2012): Protocol. PCR Product Clean-Up Prior to Sequencing. MAN0012741. URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012741_PCR_Product_CleanUp_Prior2Sequencing_UG.pdf (19.05.2021).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2014): Product Information. T4 DNA Ligase, 5 Weiss U/μL. #EL0011. Rev. 10. Pub. No. MAN0011987. URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011987_T4_DNA_Ligase_5_Weiss_1000_Weiss_U_UG.pdf (17.05.2021).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2015): Product Information. Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit. #K0691, #K0692. Rev. 12. Pub. No. MAN0012661. URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012661_GeneJET_Gel_Extraction_UG.pdf (10.05.2021).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2016a): Product Information. Thermo Scientific. DreamTaq DNA Polymerase. Pub. No. MAN0012036. URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012036_DreamTaqDNAPolymerase_500U_UG.pdf (22.04.2021).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2016b): Product Information. Thermo Scientific. Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. Pub. No. MAN0012393. URL: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012393_Phusion_HighFidelity_DNAPolymerase_UG.pdf (22.04.2021).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2018): Product Information. GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use. Pub. No. MAN0013010. URL: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0013010_GeneRuler_100bp_Plus_DNALadder_RTU_50ug_UG.pdf (28.09.2022).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2019): User Guide. GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ready-to-use. Pub. No. MAN0013050. URL: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0013050_GeneRuler_1kb_Plus_DNALadder_RTU_50ug_UG.pdf (28.09.2022).
- Thermo Fisher Scientific Inc. (o. J.): PCR Basics. PCR. Figure 1. Three steps of PCR—denaturation, annealing, and extension – as shown in the first cycle, and the exponential amplification of

- target DNA with repeated cycling. URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html> (22.04.2021).
- Thomason, Lynn C. et al. (2014): Recombineering: Genetic Engineering in Bacteria Using Homologous Recombination. In: *Current Protocols in Molecular Biology*, 106. Jg., S. 1.16.1-1.16.39.
- Thorvaldsdóttir, Helga/Robinson, James T./Mesirov, Jill P. (2012): Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. In: *Briefings in Bioinformatics*, 14. Jg. (2), S. 178-192.
- Tobias, John W. et al. (1991): The N-End Rule in Bacteria. In: *Science*, 254. Jg. (5036), S. 1374-1377.
- Tomoyasu, Toshifumi et al. (1995): *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor σ^{32} . In: *The EMBO Journal* 14. Jg. (11), S. 2551-2560.
- Tomoyasu, Toshifumi et al. (1993a): Topology and Subcellular Localization of FtsH protein in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology*, 175. Jg. (5), S. 1352-1357.
- Tomoyasu, Toshifumi et al. (1993b): The *Escherichia coli* FtsH Protein Is a Prokaryotic Member of a Protein Family of Putative ATPases Involved in Membrane Functions, Cell Cycle Control, and Gene Expression. In: *Journal of Bacteriology*, 175. Jg. (5), S. 1344-1351.
- Tran, John H./Jacoby, George A./Hooper, David C. (2005a): Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA Gyrase. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49. Jg. (1), S. 118-125.
- Tran, John H./Jacoby, George A./Hooper, David C. (2005b): Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein QnrA with *Escherichia coli* Topoisomerase IV. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49. Jg. (7), S. 3050-3052.
- Tsai, Joshua T. et al. (2019): Crystal Structure of the YcjX Stress Protein Reveals a Ras-Like GTP-Binding Protein. In: *Journal of Molecular Biology* 431. Jg. (17), S. 3179-3190.
- Tsaneva, Irina R./Weiss, Bernard (1990): *soxR*, a Locus Governing a Superoxide Response Regulon in *Escherichia coli* K-12. In: *Journal of Bacteriology*, 172. Jg. (8), S. 4197-4205.
- Tse-Dinh, Y. C. (1985): Regulation of the *Escherichia coli* DNA topoisomerase I gene by DNA supercoiling. In: *Nucleic Acids Research* 13. Jg. (13), S. 4751-4763.
- Tu, Anh-Hue Thi/Turnbough, Charles L., Jr. (1997): Regulation of *upp* Expression in *Escherichia coli* by UTP-Sensitive Selection of Transcriptional Start Sites Coupled with UTP-Dependent Reiterative Transcription. In: *Journal of Bacteriology* 179. Jg. (21), S. 6665-6673.
- Tuntufye, Huruma Nelwike et al. (2012): Identification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Genes That Are Induced *In Vivo* during Infection in Chickens. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 78. Jg. (9), S. 3343-3351.
- Ueguchi, Chiharu et al. (1998): The *leuO* Gene Product Has a Latent Ability To Relieve *bgl* Silencing in *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology*, 180. Jg. (1), S. 190-193.
- Unden, Gottfried/Schirawski, Jan (1997): The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: the search for signals and reactions. In: *Molecular Microbiology*, 25. Jg. (2), S. 205-210.
- Van Melderen, Laurence et al. (1996): ATP-dependent Degradation of CcdA by Lon Protease. Effects of secondary structure and heterologous subunit interactions. In: *Journal of Biological Chemistry*, 271. Jg. (44), S. 27730-27738.
- van Workum, Marielle et al. (1996): DNA supercoiling depends on the phosphorylation potential in *Escherichia coli*. In: *Molecular Microbiology*, 20. Jg. (2), S. 351-360.
- VanOrsdel, Caitlin E. et al. (2018): Identifying New Small Proteins in *Escherichia coli*. In: *Proteomics* 18. Jg. (10), S. 1-8 (1700064).
- Vesper, Oliver et al. (2011): Selective Translation of Leaderless mRNAs by Specialized Ribosomes Generated by MazF in *Escherichia coli*. In: *Cell*, 147. Jg. (1), S. 147-157.
- Vetting, Matthew W. et al. (2006): Pentapeptide Repeat Proteins. In: *Biochemistry*, 45. Jg. (1), S. 1-10.
- Vetting, Matthew W. et al. (2008): Mechanistic and Structural Analysis of Aminoglycoside *N*-Acetyltransferase AAC(6')-Ib and Its Bifunctional, Fluoroquinolone-Active AAC(6')-Ib-cr Variant. In: *Biochemistry*, 47. Jg. (37), S. 9825-9835.

- Vieux, Ellen F. et al. (2013): Distinct quaternary structures of the AAA+ Lon protease control substrate degradation. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110. Jg. (22), S. E2002-E2008.
- Volkert, Michael R. et al. (1994): The $\Delta(\text{argF-lacZ})205(\text{U169})$ Deletion Greatly Enhances Resistance to Hydrogen Peroxide in Stationary-Phase *Escherichia coli*. In: Journal of Bacteriology, 176. Jg. (3), S. 1297-1302.
- Voytas, Daniel (2000): Agarose Gel Electrophoresis. In: Current Protocols in Molecular Biology, 51. Jg. (1), S. 2.5A.1-2.5A.9.
- Wang, Hui et al. (2001): Genetic Characterization of Highly Fluoroquinolone-Resistant Clinical *Escherichia coli* Strains from China: Role of *acrR* Mutations. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45. Jg. (5), S. 1515-1521.
- Wang, James C. (1974): Interactions between Twisted DNAs and Enzymes: The Effects of Superhelical Turns. In: Journal of Molecular Biology, 87. Jg. (4), S. 797-816.
- Wang, Jian-Ying/Syvanen, Michael (1992): DNA twist as a transcriptional sensor for environmental changes. In: Molecular Microbiology, 6. Jg. (14), S. 1861-1866.
- Wang, Jimin/Hartling, James A./Flanagan, John M. (1997): The Structure of ClpP at 2.3 Å Resolution Suggests a Model for ATP-Dependent Proteolysis. In: Cell, 91. Jg. (4), S. 447-456.
- Wang, Kevin H./Sauer, Robert T./Baker, Tania A. (2007): ClpS modulates but is not essential for bacterial N-end rule degradation. In: Genes & Development, 21. Jg. (4), S. 403-408.
- Wang, Lianrong et al. (2007): Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes. In: Nature Chemical Biology, 3. Jg. (11), S. 709-710.
- Wang, Tim et al. (2014): Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System. In: Science, 343. Jg. (6166), S. 80-84.
- Wang, Xiuhong/Zhao, Xilin (2009): Contribution of Oxidative Damage to Antimicrobial Lethality. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53. Jg. (4), S. 1395-1402.
- Watson, James Dewey/Crick, Francis Harry Compton (1953): Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. In: Nature, 171. Jg. (4356), S. 737-738.
- Webber, Mark A./Pidcock, Laura J. V. (2001): Absence of Mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-Overexpressing Fluoroquinolone-Resistant Clinical and Veterinary Isolates of *Escherichia coli*. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45. Jg. (5), S. 1550-1552.
- Webber, Mark A./Talukder, Ashraf/Pidcock, Laura J. V. (2005): Contribution of Mutation at Amino Acid 45 of AcrR to *acrB* Expression and Ciprofloxacin Resistance in Clinical and Veterinary *Escherichia coli* Isolates. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49. Jg. (10), S. 4390-4392.
- Weichart, Dieter et al. (2003): Global Role for ClpP-Containing Proteases in Stationary-Phase Adaptation of *Escherichia coli*. In: Journal of Bacteriology, 185. Jg. (1), S. 115-125.
- Wentzell, Lois M./Maxwell, Anthony (2000): The Complex of DNA Gyrase and Quinolone Drugs on DNA Forms a Barrier to the T7 DNA Polymerase Replication Complex. In: Journal of Molecular Biology, 304. Jg. (5), S. 779-791.
- Wickner, Sue et al. (1994): A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91. Jg. (25), S. 12218-12222.
- Wiedemann, Bernd/Heisig, Peter (1994): Mechanisms of Quinolone Resistance. In: Infection, 22. Jg. (Supplement 2), S. S 73-S 79.
- Willmott, Christopher J. R. et al. (1994): The Complex of DNA Gyrase and Quinolone Drugs with DNA Forms a Barrier to Transcription by RNA Polymerase. In: Journal of Molecular Biology, 242. Jg. (4), S. 351-363.
- Wilson, Daniel N. (2009): The A-Z of bacterial translation inhibitors. In: Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 44. Jg. (6), S. 393-433.
- Witkin, Evelyn M. (1976): Ultraviolet Mutagenesis and Inducible DNA Repair in *Escherichia coli*. In: Bacteriological reviews, 40. Jg. (4), S. 869-907.

- Wohlever, Matthew L./Baker, Tania A./Sauer, Robert T. (2013): A Mutation in the N Domain of *Escherichia coli* Lon Stabilizes Dodecamers and Selectively Alters Degradation of Model Substrates. In: *Journal of Bacteriology*, 195. Jg. (24), S. 5622-5628.
- Wojtkowiak, Diana/Georgopoulos, Costa/Zylicz, Maciej (1993): Isolation and Characterization of ClpX, a New ATP-dependent Specificity Component of the Clp Protease of *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry*, 268. Jg. (30), S. 22609-22617.
- Wojtyra, Urszula A. et al. (2003): The N-terminal Zinc Binding Domain of ClpX Is a Dimerization Domain That Modulates the Chaperone Function. In: *Journal of Biological Chemistry*, 278. Jg. (49), S. 48981-48990.
- Wong, Keith S. et al. (2014): The MoxR ATPase RavA and Its Cofactor ViaA Interact with the NADH:Ubiquinone Oxidoreductase I in *Escherichia coli*. In: *PLoS One*, 9. Jg. (1), S. 1-15 (e85529).
- Woo, Jongchan/von Arnim, Albrecht G. (2008): Mutational optimization of the coelenterazine-dependent luciferase from *Renilla*. In: *Plant methods*, 4. Jg. (23), S. 1-10.
- Wood, Keith V. (1990): Firefly Luciferase: A New Tool for Molecular Biologists. In: *Promega Notes*, 28. Jg., S. 1-3.
- World Health Organization (2015): Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. URL: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/864486/retrieve> (10.10.2022).
- World Health Organization (2021): 2020 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. Genf.
- Wurpts, Gerda et al. (2019): Guideline on diagnostic procedures for suspected hypersensitivity to beta-lactam antibiotics. In: *Allergo Journal International*, 28. Jg. (5), S. 121-151.
- Yamada-Inagawa, Tomoko et al. (2003): Conserved Pore Residues in the AAA Protease FtsH Are Important for Proteolysis and Its Coupling to ATP Hydrolysis. In: *Journal of Biological Chemistry*, 278. Jg. (50), S. 50182-50187.
- Yamaguchi, Yoshihiro/Inouye, Masayori (2011): Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. In: *Nature Reviews Microbiology*, 9. Jg. (11), S. 779-790.
- Yamane, Kunikazu et al. (2008): Plasmid-Mediated *qepA* Gene among *Escherichia coli* Clinical Isolates from Japan. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52. Jg. (4), S. 1564-1566.
- Yamane, Kunikazu et al. (2007): New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51. Jg. (9), S. 3354-3360.
- Yanisch-Perron, Celeste/Vieira, Jeffrey/Messing, Joachim (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. In: *Gene*, 33. Jg. (1), S. 103-119.
- Yoshida, Hiroaki et al. (1990): Quinolone Resistance-Determining Region in the DNA Gyrase *gyrA* Gene of *Escherichia coli*. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34. Jg. (6), S. 1271-1272.
- Zechiedrich, E. Lynn/Cozzarelli, Nicholas R. (1995): Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. In: *Genes & Development*, 9. Jg. (22), S. 2859-2869.
- Zechiedrich, E. Lynn et al. (2000): Roles of Topoisomerases in Maintaining Steady-state DNA Supercoiling in *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry*, 275. Jg. (11), S. 8103-8113.
- Zeth, Kornelius et al. (2002): Structural analysis of the adaptor protein ClpS in complex with the N-terminal domain of ClpA. In: *Nature Structural Biology*, 9. Jg. (12), S. 906-911.
- Zhang, Aixia et al. (1996): *Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. In: *The EMBO Journal* 15. Jg. (6), S. 1340-1349.
- Zhang, Jia/Li, Kai (2003): Single-Base Discrimination Mediated by Proofreading 3' Phosphorothioate-Modified Primers. In: *Molecular Biotechnology*, 25. Jg. (3), S. 223-227.
- Zhang, Junjie/Zhang, Yonglong/Inouye, Masayori (2003): Characterization of the Interactions within the *mazEF* Addiction Module of *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry*, 278. Jg. (34), S. 32300-32306.

- Zhang, Xiao-Hui et al. (2015): Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. In: *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4. Jg., S. 1-8 (e264).
- Zhang, Yonglong et al. (2003): MazF Cleaves Cellular mRNAs Specifically at ACA to Block Protein Synthesis in *Escherichia coli*. In: *Molecular Cell*, 12. Jg. (4), S. 913-923.
- Zhao, Guanghua et al. (2002): Iron and Hydrogen Peroxide Detoxification Properties of DNA-binding Protein from Starved Cells. A Ferritin-like DNA-binding Protein of *Escherichia coli*. In: *Journal of Biological Chemistry*, 277. Jg. (31), S. 27689-27696.
- Zhao, Jingjing et al. (2010): Prevalence and Dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* Isolates from Animals, Farmworkers, and the Environment. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54. Jg. (10), S. 4219-4224.
- Zheng, Ming et al. (2001): DNA Microarray-Mediated Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Response to Hydrogen Peroxide. In: *Journal of Bacteriology*, 183. Jg. (15), S. 4562-4570.
- Zolkiewski, Michal (2006): A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. In: *Molecular Microbiology*, 61. Jg. (5), S. 1094-1100.
- Zuker, Michael (2003): Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. In: *Nucleic acids research*, 31. Jg. (13), S. 3406-3415.
- Zuker, Michael (o. J.): mFold. DNA Folding Form Application. URL: <http://www.unafold.org/mfold/applications/dna-folding-form.php> (01.07.2021).
- Zuromski, Kristin L./Sauer, Robert T./Baker, Tania A. (2020): Modular and coordinated activity of AAA+ active sites in the double-ring ClpA unfoldase of the ClpAP protease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117. Jg. (41), S. 25455-25463.

10 Anhang

10.1 Gefahrenstoffhinweise

In der Tabelle 10.1–1 sind die in dieser Arbeit verwendeten KMR-Stoffe der Kategorien I und II gemäß der CLP-Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 aufgeführt. Entnommen ist die Zuordnung aus der KMR-Liste des Instituts für Arbeitsschutz (IFA) der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV) (Stand: August 2022) (Institut für Arbeitsschutz (IFA) der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV) 2022). Des Weiteren sind in der Tabelle 10.1–2 sämtliche verwendete Gefahrstoffe nach GHS mit ihrem zugehörigen Gefahrensymbol und den H- und P-Sätzen aufgelistet. Dabei beschreiben die H-Sätze die Gefahrenhinweise (engl.: *hazard*) und die P-Sätze die Sicherheitshinweise zu Vorkehrungs- bzw. Schutzmaßnahmen (engl.: *precautionary*). Entnommen sind diese Daten den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern der Substanzen.

Tabelle 10.1–1: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten KMR-Stoffe der Kategorien I und II gemäß der CLP-Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 (nach: Institut für Arbeitsschutz (IFA) der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV) 2022)

Cas-Nr.	IUPAC-Bezeichnung (Stoffname)	Einsatz bzw. Methode mit jeweils maximal eingesetzter Menge	Kategorie			
			K	M	R _D	R _F
1239-45-8	3,8-Diamino-1-ethyl-6-phenylphenantridinium-bromid (Ethidiumbromid)	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren (Agarose-Gelelektrophorese); 4 µL einer 1 %-igen Lösung		2		
75-12-7	Formamid	Sanger-Sequenzierung, Formamid-haltige SLS (<i>sample loading solution</i>); 30 µL Isolierung von Gesamt-RNA, Formamid-haltiger Loading Dye; 25 µL			1B	
108-95-2	Phenol	Aufreinigung und Konzentrierung von DNA, Phenol/Chloroform-Extraktion; 525 µL	--	2	--	--
67-66-3	Trichlormethan (Chloroform)	Aufreinigung und Konzentrierung von DNA, Phenol/Chloroform-Extraktion; 515 µL	1B* 2	2*	2	--

Legende:

CAS-Nr.: Registriernummer des Chemical Abstract Service

IUPAC-Bezeichnung: Nomenklatur der International Union of Pure and Applied Chemistry

K: Karzinogen bzw. krebserzeugend

M: Keimzellmutagen (früher erbgutverändernd)

R: Reproduktionstoxisch (früher fortpflanzungsgefährdend)

R_D: Entwicklungsschädigend (fruchtschädigend)

R_F: Fruchtbarkeitsgefährdend (Beeinträchtigung der Fortpflanzungsfähigkeit)

1A, 1B, 2: Kategorien nach Anhang I der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008











1B ≙ Stoffe, die wahrscheinlich beim Menschen karzinogen sind

2 ≙ Verdacht auf karzinogene Wirkung beim Menschen












--: Eine Zuordnung nach Anhang I der CLP-Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 konnte aufgrund der Daten nicht vorgenommen werden oder eine Einstufung wurde von der EU aufgehoben.










*: Nationale Bewertungen durch den Ausschuss für Gefahrstoffe (AGS) aus der TRGS 905 (Technische Regeln für Gefahrstoffe). Eine EU-Legaleinstufung wird angestrebt, liegt jedoch noch nicht vor.

Tabelle 10.1–2: Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe nach GHS mit Gefahrensymbol, H- und P-Sätzen












Substanz	Gefahrensymbol Piktogramme + Signalwort	H-Sätze (<i>Hazard</i>) Gefahrenhinweise	P-Sätze (<i>Precautionary</i>) Sicherheitshinweise
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	 Achtung	H302, H319	P264, P270, P280, P301 + P312, P305 + P351 + P338, P337 + P313
Ampicillin-Natriumsalz (94,3 %)	 Gefahr	H317, H334	P261, P280, P342 + P311
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ x2H ₂ O)	 Achtung	H319	P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313
Chloramphenicol (98 %)	 Gefahr	H350	P201, P308 + P313
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	 Achtung	H302, H315, H319, H335	P280, P302 + P352, P304 + P340, P305 + P351 + P338, P312
DNeasy® Blood & Tissue Kit (# 69504), Buffer AL (Guanidinhydrochlorid 30-50 %, Maleinsäure 0,1-1 %)	 Achtung	H315, H317, H319	P280
DNeasy® Blood & Tissue Kit (# 69504), Buffer AW1 (Guanidinhydrochlorid 50-70 %)	 Achtung	H302 + H332, H315, H319	P280
DNeasy® Blood & Tissue Kit (# 69504), Proteinase K	 Gefahr	H334	P261, P280, P304 + P340, P342 + P311
Essigsäure (Eisessig)	 Gefahr	H226, H314	P210, P243, P280, P301 + P330 + P331, P304 + P340, P308 + P310
Ethanol absolut	 Gefahr	H225, H319	P210, P243, P280, P305 + P351 + P338, P403 + P235

Anhang

Ethidiumbromidlösung (EtBr), 1 % (10 mg/mL) in H ₂ O	 Achtung	H341	P201, P280, P308 + P131
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	 Achtung	H332, H373	P260, P314
GeneJET Gel Extraction Kit (# K0691), Binding Buffer	 Gefahr	H302, H314, H412	P273, P264, P280, P270, P303 + P361 + P353, P301 + P310, P305 + P351 + P338, P330
GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit, DTCS Quick Start Master Mix (Methanol < 10 %, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan < 5 %)	 Gefahr	H303, H316, H370	P260, P264, P270, P308 + P311, P312, P332 + P313, P405, P501
GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit, Sample Loading Solution (SLS) (Formamid > 90 %)	 Gefahr	H360	P201, P280, P308 + P313
Gentamicin-Sulfat (59 %)	 Gefahr	H317, H334	P261, P272, P280, P284, P302 + P352, P333 + P313
Kanamycin-Sulfat aus <i>Streptomyces kanamyceticus</i> (83,3 %)	 Gefahr	H360D	P201, P202, P280, P308 + P313, P405, P501
Lysozym, ≈ 20000 U/mg, 3x krist, lyophilisiert	 Gefahr	H334	P260, P342 + P311
Monarch® Plasmid Miniprep Kit, Monarch® Plasmid Lysis Buffer (B2) (Natriumhydroxid 1-5 %)	 Gefahr	H315, H319, H412, H290	P264, P273, P280, P337 + P313, P501, P201, P234, P406
Monarch® Plasmid Miniprep Kit, Monarch® Plasmid Neutralization Buffer (B3) (Kaliumhydroxid 1-5 %)	 Achtung	H302, H315, H319	P260, P280, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338, P310
Monarch® Plasmid Miniprep Kit, Monarch® Plasmid Wash Buffer 1 (Guanidinhydrochlorid 15-40 %, Propan-2-ol 15-40 %)	 Achtung	H302, H315, H319, H226	P210, P264, P370 + P378, P501, P370 + P378, P403 + P235

Monarch® RNA Cleanup Kit, Monarch® RNA Cleanup Binding Buffer (Guanidinthiocyanat 40-70 %, Ethylendiamintetraessigsäure 1-5 %)	 Achtung	H302, H315, H412	P260, P280, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338, P310
Monarch® Total RNA Miniprep Kit, Monarch® RNA Lysis Buffer (Guanidinthiocyanat 60-100 %, Triton X-100 1-5 %)	 Achtung	H302, H315, H320, H412	P260, P280, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338, P310, P331
Monarch® Total RNA Miniprep Kit, Monarch® RNA Priming Buffer (Ethanol 40-70 %, Guanidinhydrochlorid 30-60 %)	 Achtung	H302, H315, H319, H411, H225	P210, P273, P280, P370 + P378, P391, P403 + P235, P370 + P378
Nalidixinsäure-Natriumsalz (90,9 %)	 Achtung	H302, H351	P202, P264, P270, P280, P301 + P312, P308 + P313
Natriumhydroxid, 99 %, Pellets	 Gefahr	H290, H314	P280, P301 + P330 + P331, P305 + P351 + P338, P308 + P310
Natriumlaurylsulfat (SDS)	 Gefahr	H302 + H332, H315, H318, H335, H412	P273, P280, P301 + P312, P302 + P352, P304 + P340, P305 + P351 + P338
Natronlauge (NaOH) 10 mol/L	 Gefahr	H290, H314	P234, P280, P303 + P361 + P353, P304 + P310, P305 + P351 + P338, P363
ortho-Phosphorsäure (H ₃ PO ₄), 85 %	 Gefahr	H290, H302, H314	P234, P270, P280, P301 + P312, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 (Trichlormethan 50-<60 %, Phenol 32,4-<50 %, Isoamylalkohol 1-<5 %)	 Gefahr	H301 + H331, H312, H314, H341, H351, H361d, H372, H411	P201, P270, P280, P304 + P340, P305 + P351 + P338, P308 + P313

Anhang

PyroMark Gold Q96 Reagents (5x96) (Essigsäure 1-3 %, Kaliumhydroxid 0,5-1 %)	 Achtung	H315, H319	P280
Rifampicin (98,1 %)	 Achtung	H302, H315, H319, H335, H362	P260, P263, P301 + P312, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P308 + P313
RNA Gel Loading Dye (2x) (#R0641) (Formamid 95-100 %)	 Gefahr	H360, H351, H373	P201, P202, P260, P280, P308 + P313, P314, P501
RNAprotect® Bacteria Reagent (Tetradoniumbromid 3-10 %, Weinsäure 1-10 %, Natriumhydroxid 1-2 %)	 Gefahr	H315, H318	P280, P305 + P351 + P338 + P310
<i>RNase A</i> (Ribonuklease A)	 Gefahr	H317, H334	P261, P280, P304 + P340, P342 + P311
RNase AWAY™ (Natriumhydroxid)	 Achtung	H315, H319	P260, P264, P280, P301 + P330 + P331, P303 + P361 + P353, P304 + P340, P305 + P351 + P338, P310, P363, P405, P501b
Streptavidin-Sepharose-Beads	 Achtung	H226	P280, P210, P241, P303 + P361 + P353, P235, P501b
Tetracyclin (90,1 %)	   Achtung	H302, H361fd, H411	P202, P264, P270, P273, P301 + P312, P308 + P313
Xylencyanol	 Achtung	H319	P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313
Gefahrenpiktogramme GHS01 bis GHS09 als Download der REACH Compliance GmbH (REACH Compliance GmbH o. J.)			

10.2 Sekundärstrukturanalyse der langen Oligonukleotide der genomischen Mutagenese mit dem CRISPR/Cas9-System

Zur Analyse der beiden in dieser Arbeit verwendeten langen Oligonukleotide während der Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems wurde das Programm mFold verwendet (Zuker 2003; Zuker o. J.). Nachfolgend sind die, von dem Programm generierten, jeweils fünf wahrscheinlichsten Sekundärstrukturen mit ihren zugehörigen Faltungsentropien als ΔG in kcal/mol aufgeführt. Unterteilt wurde dabei nach den beiden verwendeten Oligonukleotiden clpA_1702delA_noSCAR und clpA_1702insA_noSCAR.

10.2.1 Oligonukleotid clpA_1702delA_noSCAR

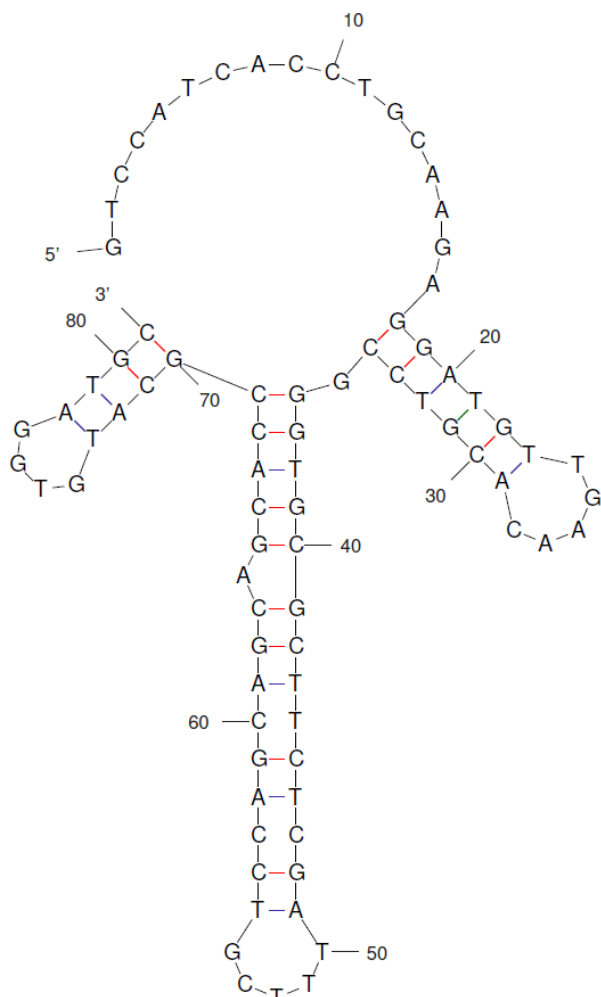


Abbildung 10.2-1: Sekundärstruktur 1 von Oligonukleotid clpA_1702delA_noSCAR mit einem ΔG von -9,91 kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.)

10.2.2 Oligonukleotid clpA_1702insA_noSCAR

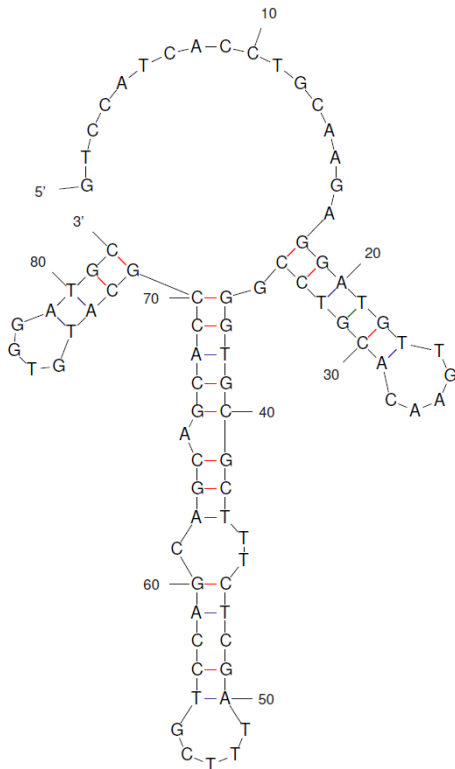


Abbildung 10.2–6: Sekundärstruktur 1 von Oligonukleotid clpA_1702insA_noSCAR mit einem ΔG von $-9,28$ kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.)

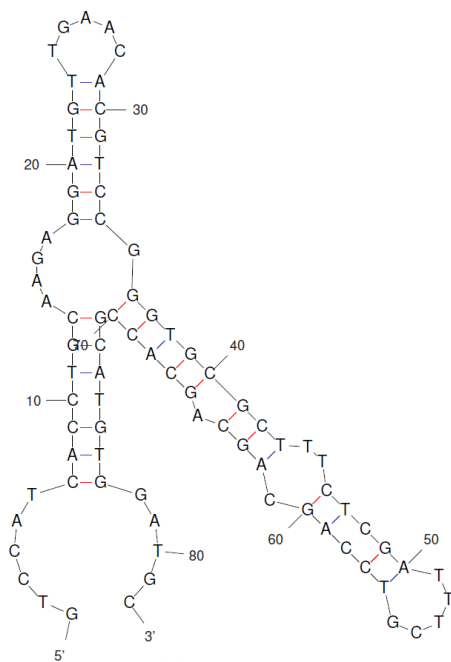


Abbildung 10.2–7: Sekundärstruktur 2 von Oligonukleotid clpA_1702insA_noSCAR mit einem ΔG von $-8,78$ kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.)

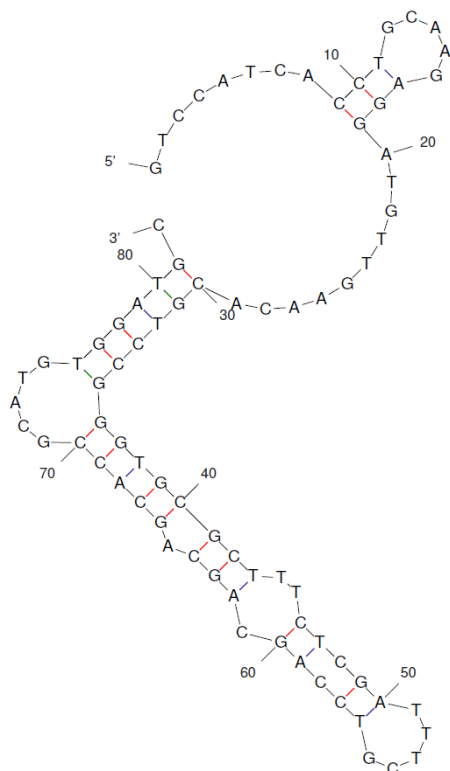


Abbildung 10.2–8: Sekundärstruktur 3 von Oligonukleotid *clpA_1702insA_noSCAR* mit einem ΔG von $-8,64$ kcal/mol (Zucker 2003; Zucker o. J.)

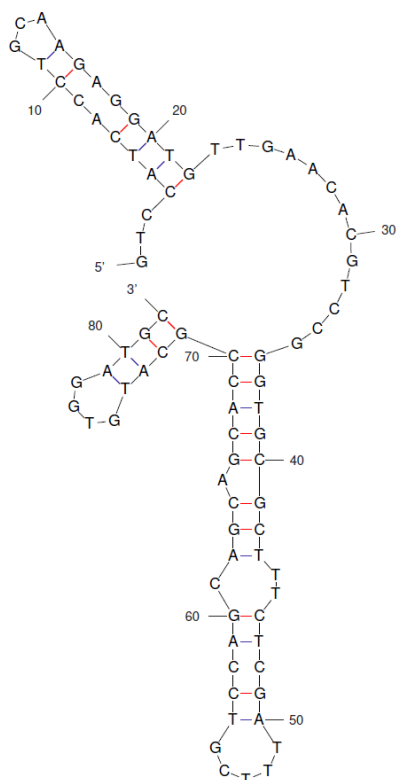


Abbildung 10.2–9: Sekundärstruktur 4 von Oligonukleotid *clpA_1702insA_noSCAR* mit einem ΔG von $-8,55$ kcal/mol (Zucker 2003; Zucker o. J.)

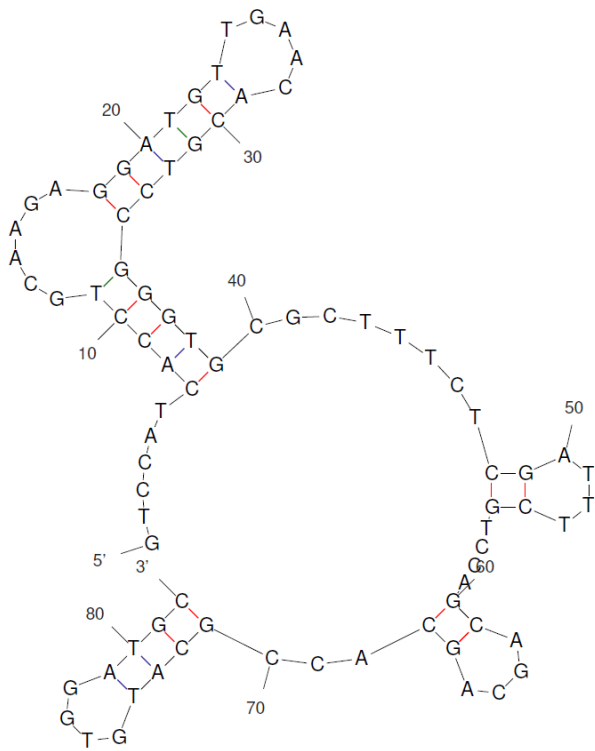


Abbildung 10.2–10: Sekundärstruktur 5 von Oligonukleotid *clpA_1702insA_noSCAR* mit einem ΔG von $-8,44$ kcal/mol (Zuker 2003; Zuker o. J.)

10.3 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung der genomischen *clpA*-Mutanten, konstruiert mit dem CRISPR/Cas9-System

10.3.1 Mutagenese von *E. coli* WT mit der *clpA*-Mutation aus *E. coli* MIVa

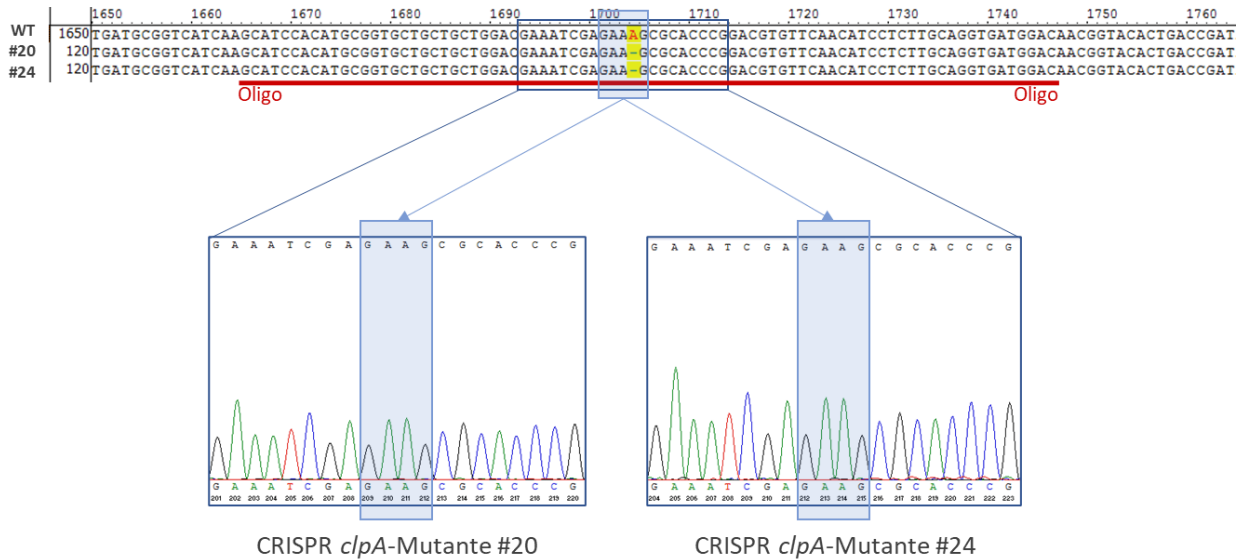


Abbildung 10.3–1: Ausschnitt der Sanger-Sequenzierung des Gens *clpA* (Bereich der Mutation)

Dargestellt ist ein Überblick der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung des Gens *clpA* der beiden CRISPR-Mutanten #20 und #24 zum einen als Ausschnitt der Nukleotidabfolge und zum anderen als Elektropherogramm. Dem Alignment wurde zum Vergleich der Stamm *E. coli* WT hinzugefügt. Gelb hinterlegt in der Nukleotidabfolge ist der Unterschied der Sequenzen zueinander markiert und damit die Position der Deletion, welche in beiden Mutanten erfolgreich nachweisbar ist, gekennzeichnet. Des Weiteren ist eingezeichnet, welchen Bereich das Oligonukleotid umspannt. Hellblau hinterlegt wurde jeweils der Bereich der *clpA*-Mutation.

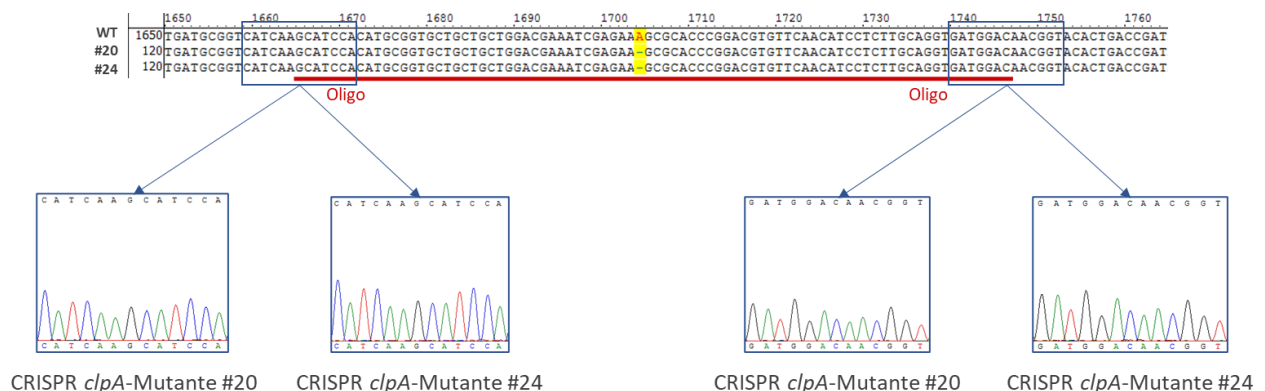
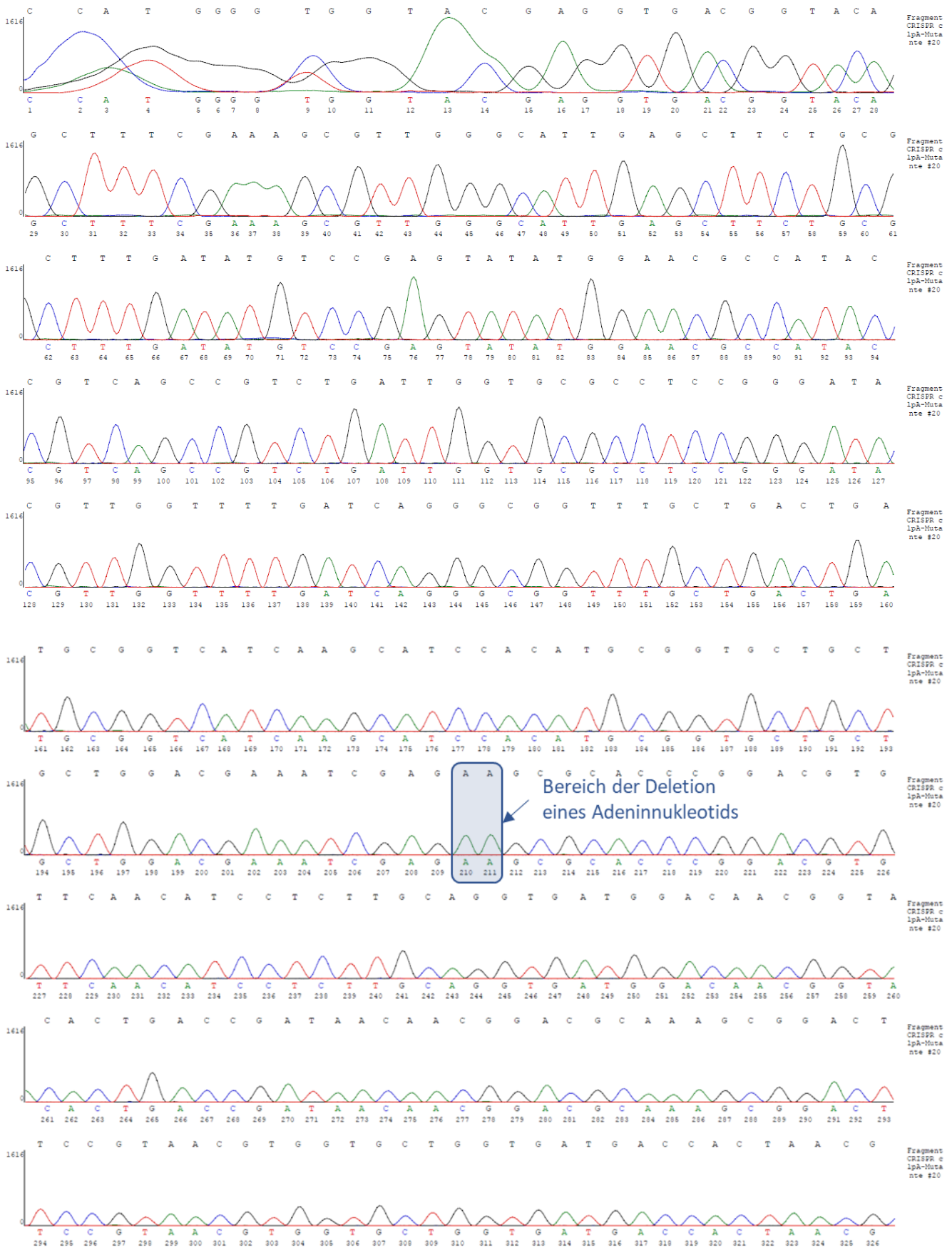
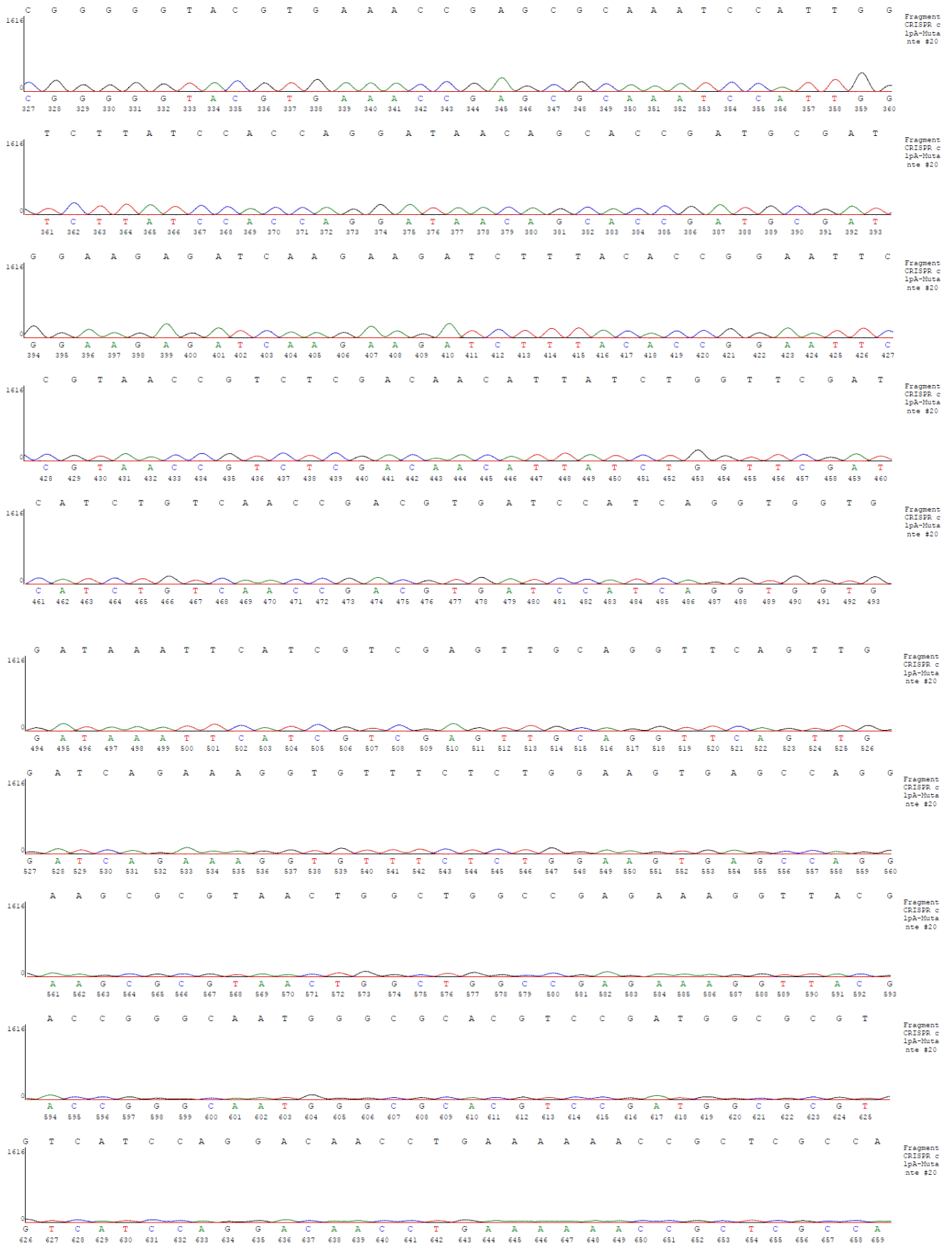


Abbildung 10.3–2: Ausschnitt der Sanger-Sequenzierung des Gens *clpA* (Übergänge des Oligonukleotids)

Dargestellt ist ein Überblick der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung des Gens *clpA* der beiden CRISPR-Mutanten #20 und #24 zum einen als Ausschnitt der Nukleotidabfolge und zum anderen als Elektropherogramm. Dem Alignment wurde zum Vergleich der Stamm *E. coli* WT hinzugefügt. Gelb hinterlegt in der Nukleotidabfolge ist der Unterschied der Sequenzen zueinander markiert und damit die Position der Deletion, welche in beiden Mutanten erfolgreich nachweisbar ist, gekennzeichnet. Des Weiteren ist eingezeichnet, welchen Bereich das Oligonukleotid umspannt. Blau eingerahmt wurden jeweils die Bereiche der Übergänge des Oligonukleotids, welches fehlerfrei integriert wurde.

Nachfolgend sind die kompletten Elektropherogramme der Sequenzierung der beiden CRISPR *clpA*-Mutanten #20 und #24 zum Nachweis der *clpA*-Deletion abgebildet (Rohdaten):





Anhang

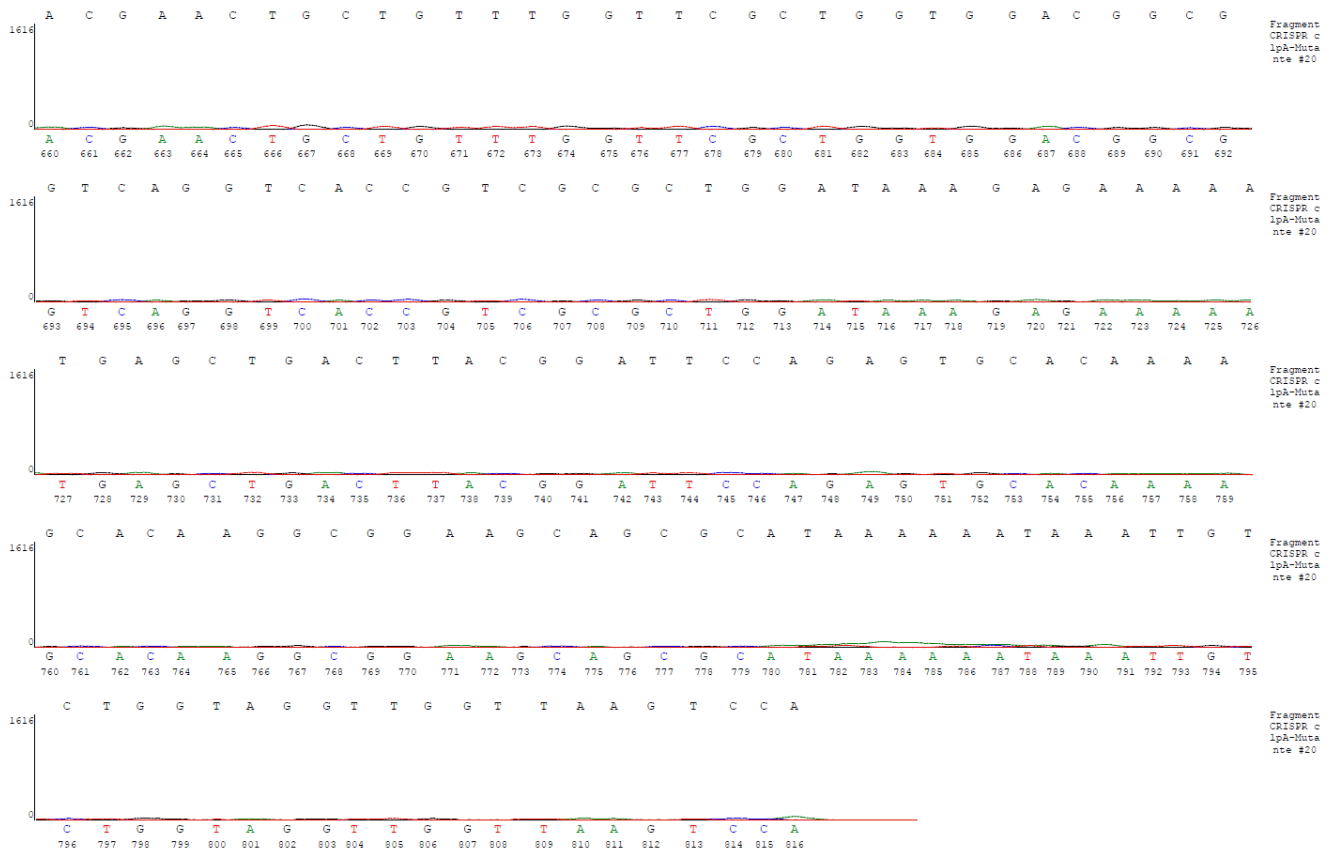
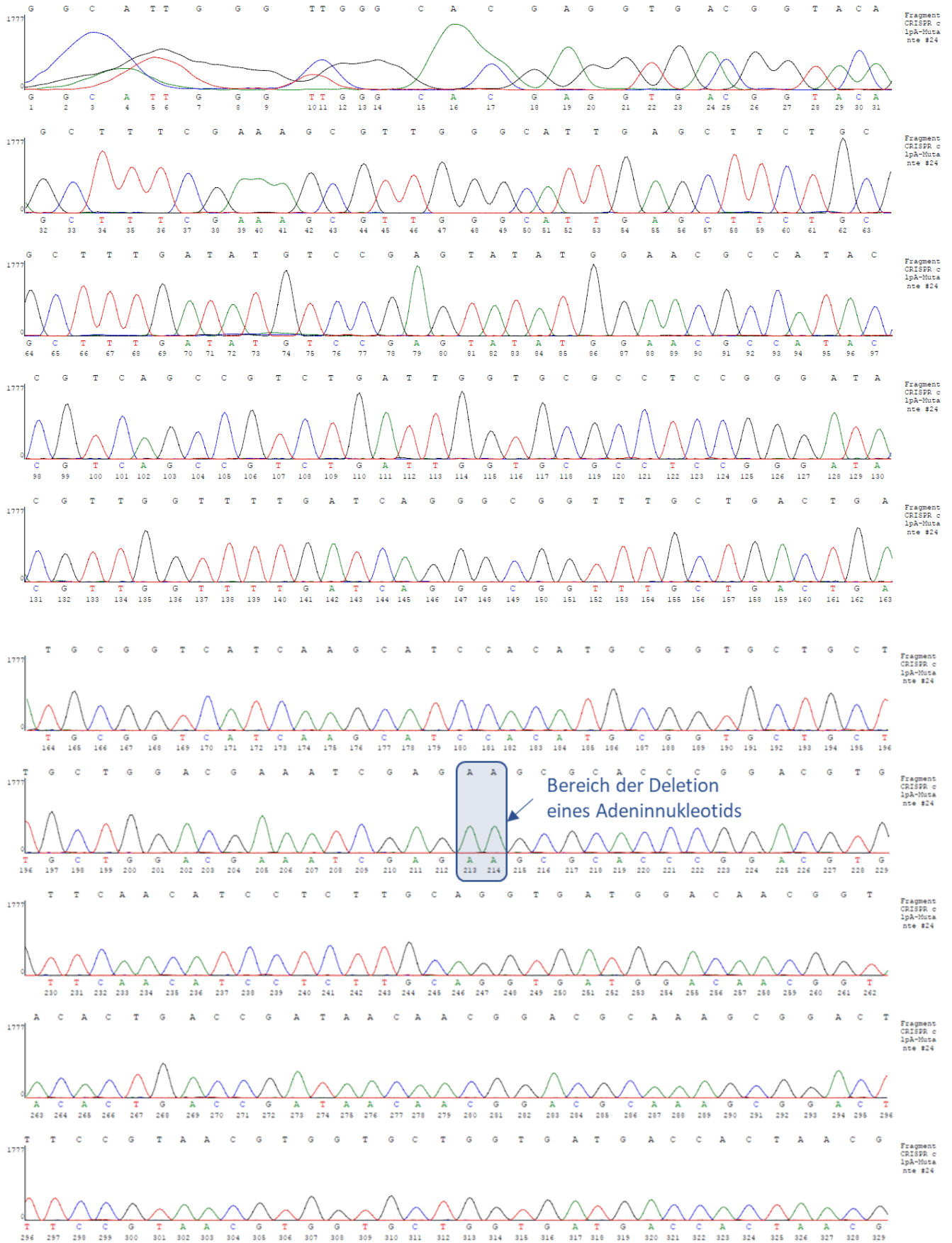
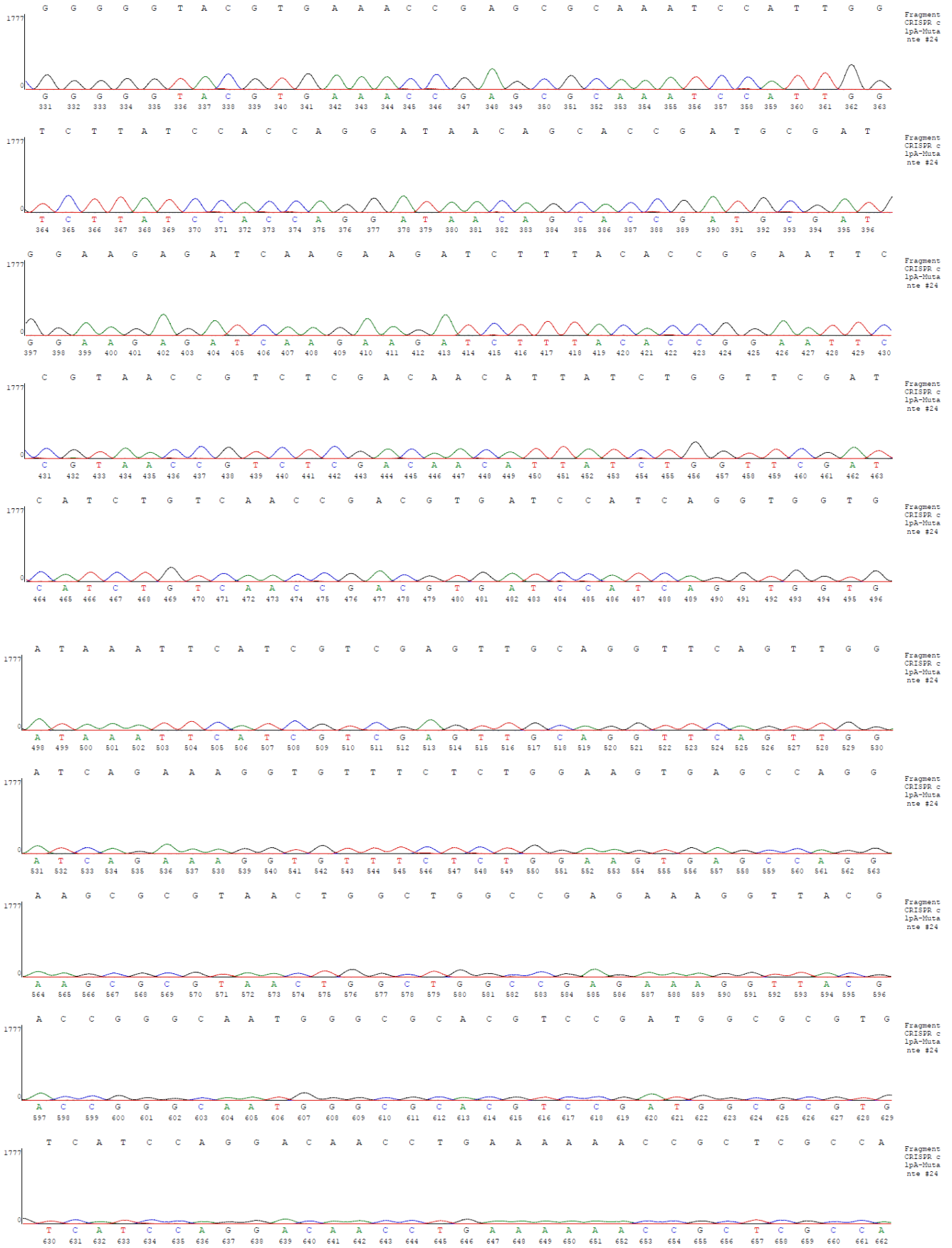


Abbildung 10.3–3: Elektropherogramm der CRISPR clpA-Mutante #20

Dargestellt sind die Rohdaten der Sanger-Sequenzierung eines 844 bp großen PCR-Fragmentes, amplifiziert mit den Oligonukleotiden clpA_5_1462_EcoWT und clpA_3_2306_EcoWT (vgl. Tabelle 8.1–3), als Chromatogramm. Für die Sequenzierung wurde der 5'-Primer der PCR genutzt. Die Sanger-Sequenzierung wurde als LightRun Tube Auftrag durch die Eurofins Genomics Germany GmbH, welche den Sequenzierservice der Firma GATC Biotech AG übernommen hat, ausgeführt. Mit einem blauen Rahmen wurde der Bereich der Deletion eines Adennukleotids markiert.



Anhang



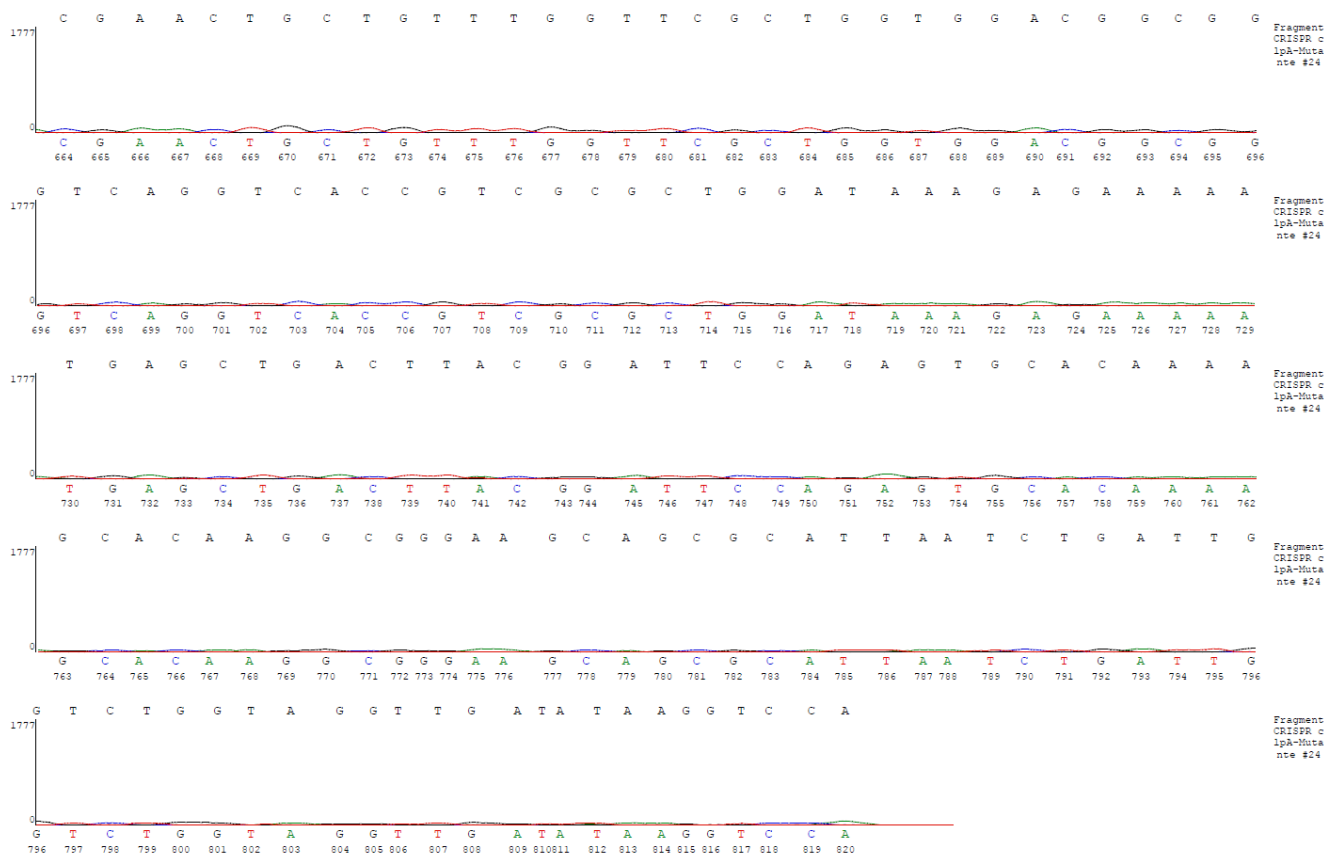
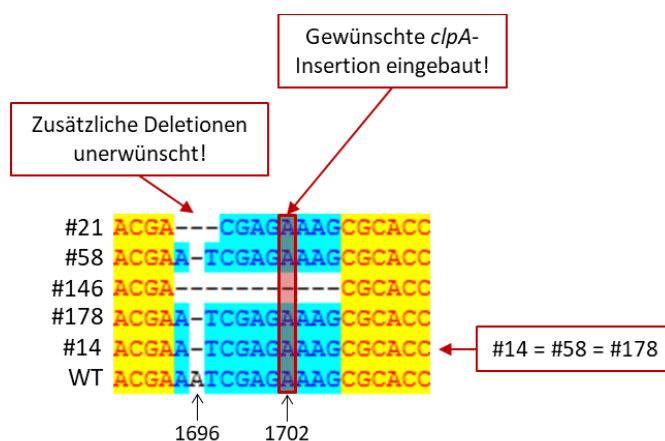


Abbildung 10.3–4: Elektropherogramm der CRISPR *clpA*-Mutante #24

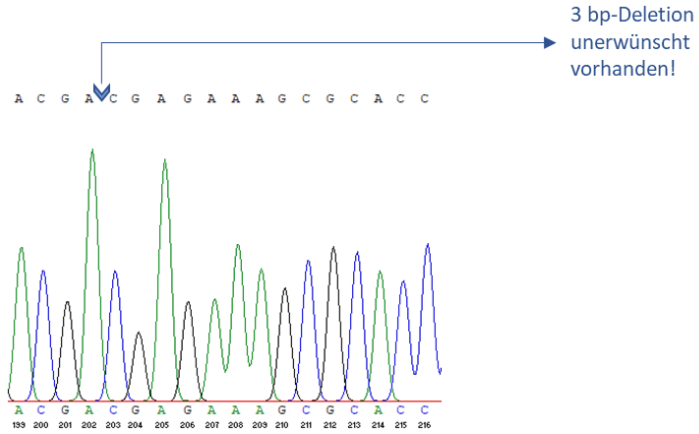
Dargestellt sind die Rohdaten der Sanger-Sequenzierung eines 844 bp großen PCR-Fragmentes, amplifiziert mit den Oligonukleotiden *clpA_5_1462_EcoWT* und *clpA_3_2306_EcoWT* (vgl. Tabelle 8.1–3), als Chromatogramm. Für die Sequenzierung wurde der 5'-Primer der PCR genutzt. Die Sanger-Sequenzierung wurde als LightRun Tube Auftrag durch die Eurofins Genomics Germany GmbH, welche den Sequenzierservice der Firma GATC Biotech AG übernommen hat, ausgeführt. Mit einem blauen Rahmen wurde der Bereich der Deletion eines Adennukleotids markiert.

10.3.2 Mutagenese von *E. coli* MIVa mit der *clpA*-Wildtypsequenz aus *E. coli* WT

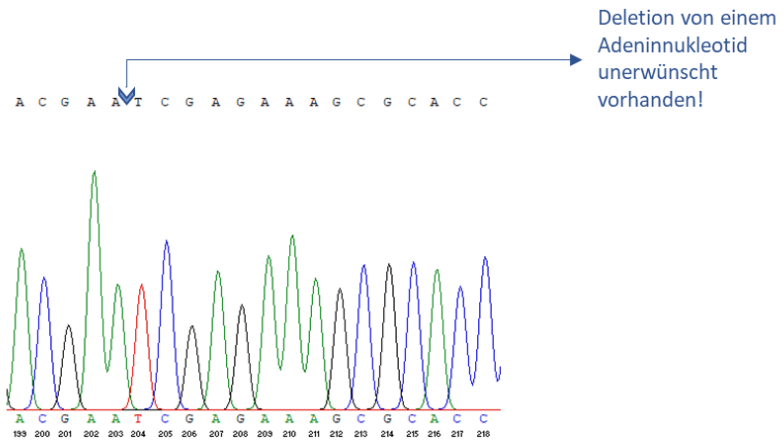
10.3.2.1 Direkte Mutagenese



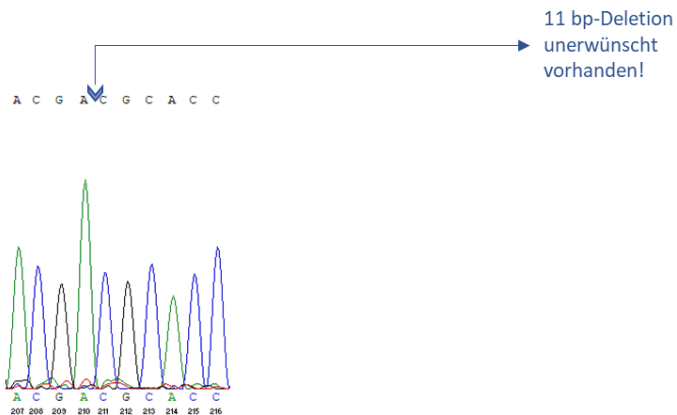
CRISPR *clpA*-Mutante #21:



CRISPR *clpA*-Mutante #58:



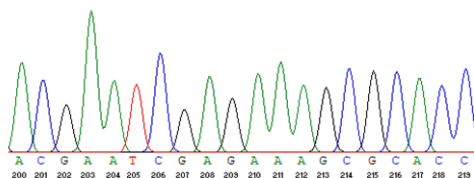
CRISPR *clpA*-Mutante #146:



CRISPR *clpA*-Mutante #178:

A C G A A T C G A G A A A G C G C A C C

Deletion von einem
Adeninnukleotid
unerwünscht
vorhanden!



CRISPR *clpA*-Mutante #14:

A C G A A T C G A G A A A G C G C A C C

Deletion von einem
Adeninnukleotid
unerwünscht
vorhanden!

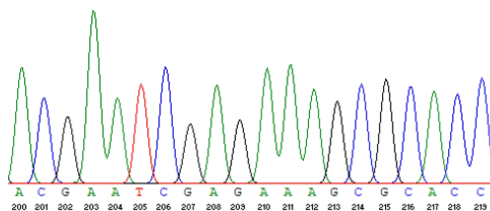
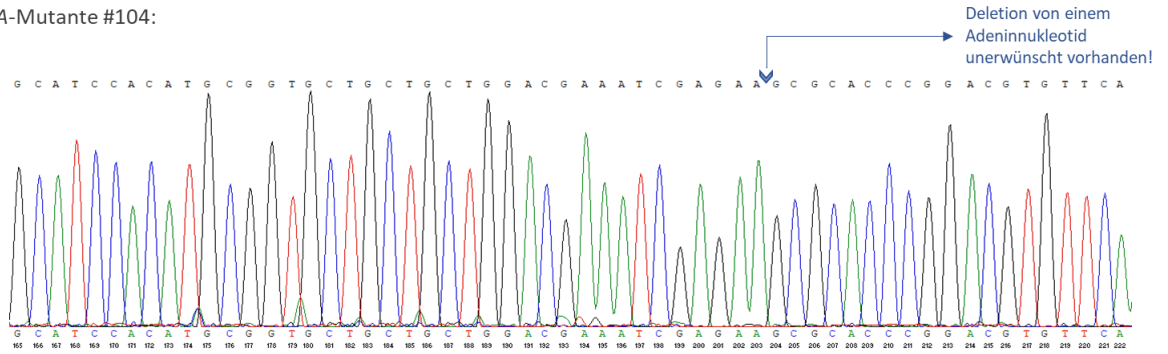


Abbildung 10.3–5: Ausschnitt der Sanger-Sequenzierung des Gens *clpA*

Dargestellt sind die Rohdaten der Sanger-Sequenzierung eines 845 bp großen PCR-Fragmentes, amplifiziert mit den Oligonukleotiden *clpA_5_1462_EcoWT* und *clpA_3_2306_EcoWT* (vgl. Tabelle 8.1–3), als Chromatogramm. Für die Sequenzierung wurde der 5'-Primer der PCR genutzt. Die Sanger-Sequenzierung wurde als LightRun Tube Auftrag durch die Eurofins Genomics Germany GmbH, welche den Sequenzierservice der Firma GATC Biotech AG übernommen hat, ausgeführt. Mit einem blauen Pfeil wurden die Positionen der zusätzlichen unerwünschten Deletionen der CRISPR *clpA*-Mutanten #21, #58, #146, #178 und #14 markiert. Ganz oben ist ein Überblick der Veränderungen der fünf Mutanten im Vergleich zum *E. coli* WT dargestellt.

CRISPR *clpA*-Mutante #104:



CRISPR *clpA*-Mutante #111:

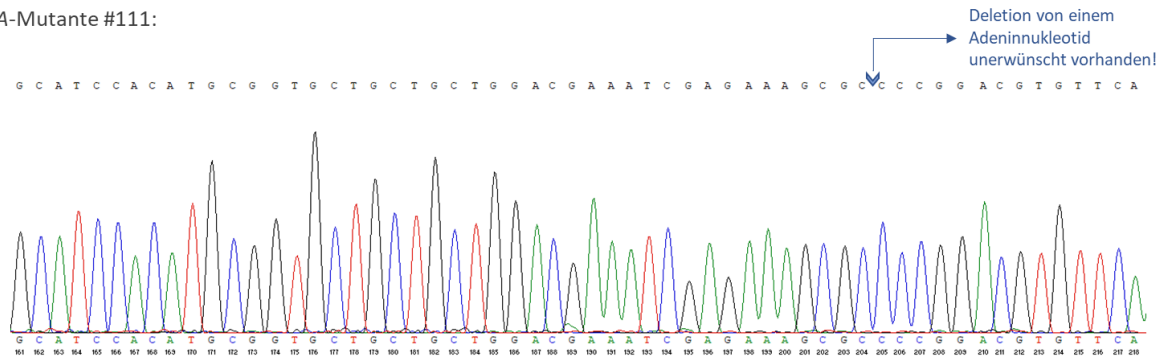


Abbildung 10.3–6: Ausschnitt der Sanger-Sequenzierung des Gens *clpA*

Dargestellt sind die Rohdaten der Sanger-Sequenzierung eines 845 bp großen PCR-Fragmentes, amplifiziert mit den Oligonukleotiden *clpA*_5_1462_EcoWT und *clpA*_3_2306_EcoWT (vgl. Tabelle 8.1–3), als Chromatogramm. Für die Sequenzierung wurde der 5'-Primer der PCR genutzt. Die Sanger-Sequenzierung wurde als Pre-mixed Tube Auftrag durch die GENEWIZ® Germany GmbH ausgeführt. Mit einem blauen Pfeil wurden die Positionen der zusätzlichen unerwünschten Deletionen der CRISPR *clpA*-Mutanten #10, #37, #104 und #111 markiert. Zusätzliche Punktmutationen sind an der betroffenen Position in Blau eingekreist. Ganz oben ist ein Überblick der Veränderungen der vier Mutanten im Vergleich zum *E. coli* WT dargestellt.

10.3.3 Mutagenese von *E. coli* MIII mit der *clpA*-Mutation aus *E. coli* MIVa

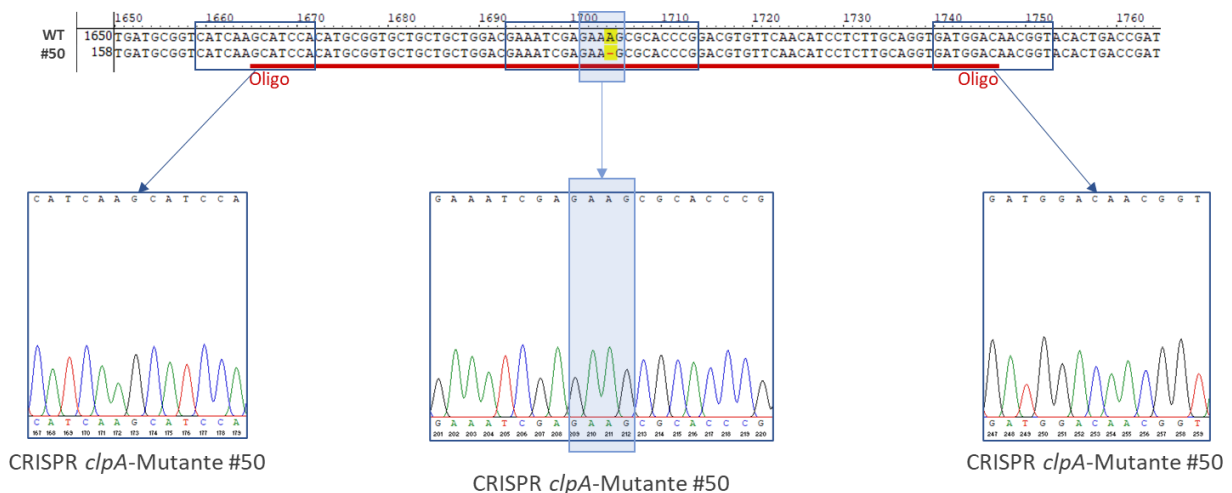
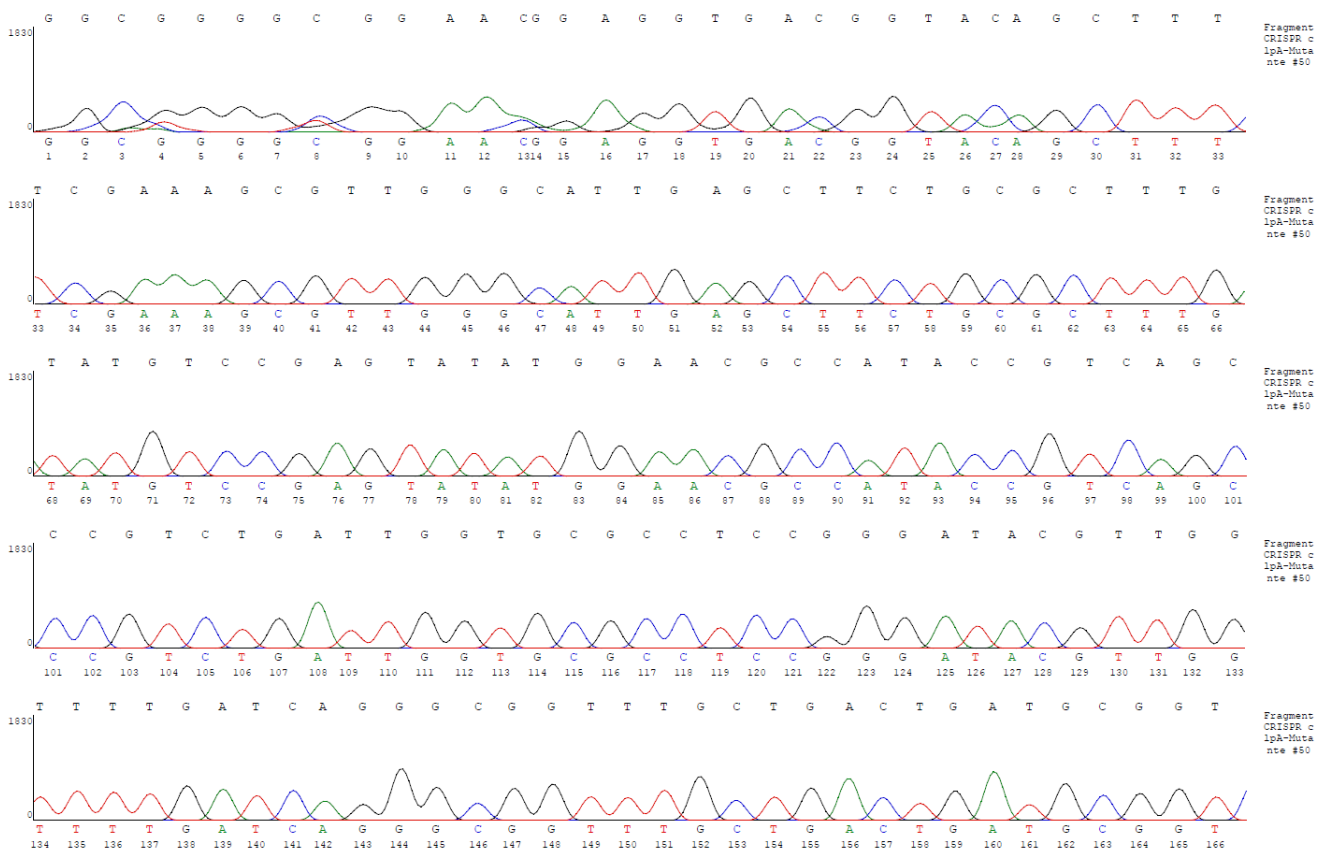


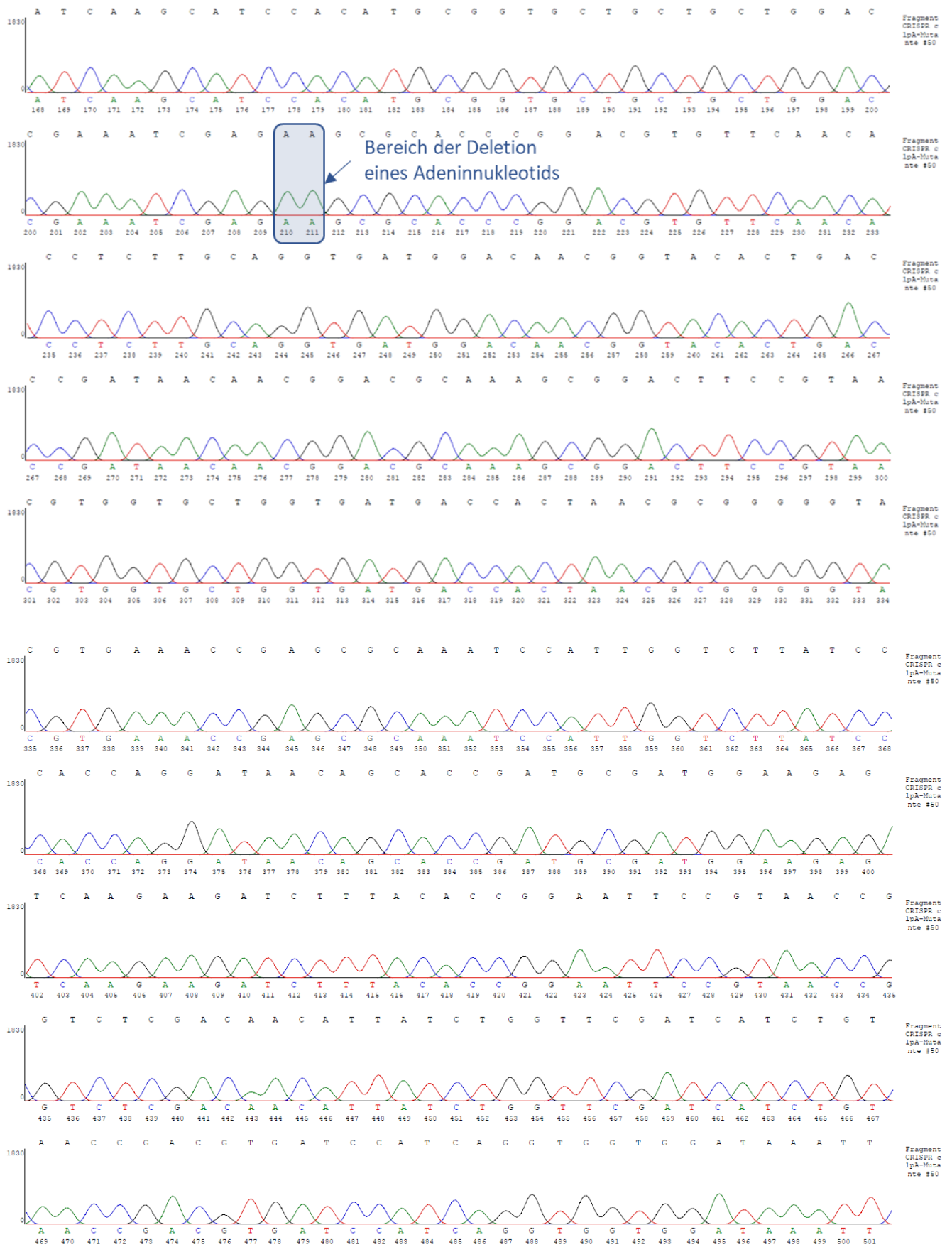
Abbildung 10.3–7: Ausschnitt der Sanger-Sequenzierung des Gens *clpA*

Dargestellt ist ein Überblick der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung des Gens *clpA* der CRISPR-Mutante #50 zum einen als Ausschnitt der Nukleotidabfolge und zum anderen als Elektropherogramm. Dem Alignment wurde zum Vergleich der Stamm *E. coli* WT hinzugefügt. Gelb hinterlegt in der Nukleotidabfolge ist der Unterschied der Sequenzen zueinander markiert und

damit die Position der Deletion, welche in der Mutante erfolgreich nachweisbar ist, gekennzeichnet. Des Weiteren ist eingezeichnet, welchen Bereich das Oligonukleotid umspannt. Hellblau hinterlegt wurde der Bereich der *clpA*-Mutation. Dunkelblau eingerahmt, jeweils rechts und links außen, wurden die Bereiche der Übergänge des Oligonukleotids, welches fehlerfrei integriert wurde.

Nachfolgend ist das komplette Elektropherogramm der Sequenzierung der CRISPR *clpA*-Mutante #50 zum Nachweis der *clpA*-Deletion abgebildet (Rohdaten):





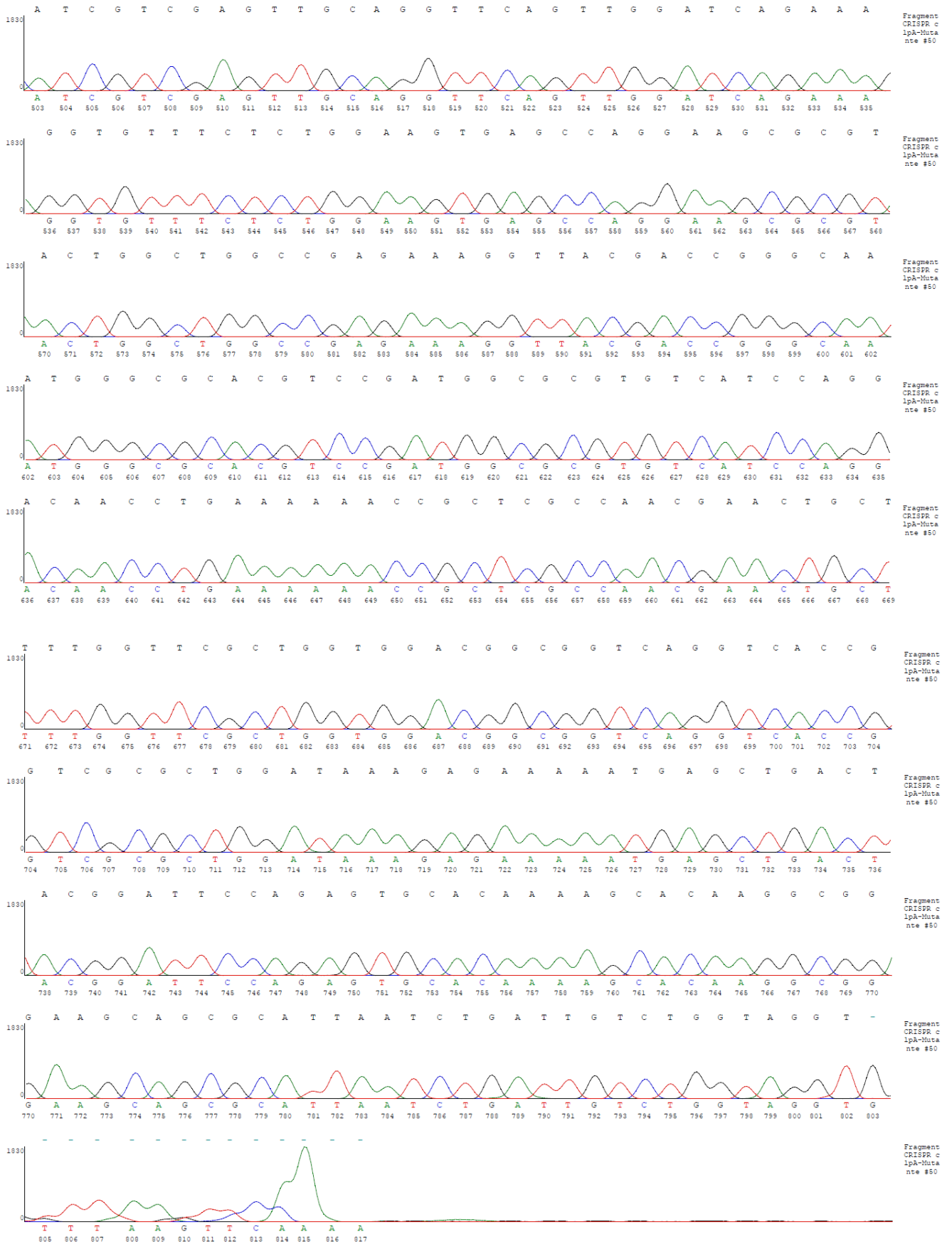


Abbildung 10.3–8: Elektropherogramm der CRISPR clpA-Mutante #50
 Dargestellt sind die Rohdaten der Sanger-Sequenzierung eines 844 bp großen PCR-Fragmentes, amplifiziert mit den Oligonukleotiden clpA_5_1462_EcoWT und clpA_3_2306_EcoWT (vgl. Tabelle 8.1–3), als Chromatogramm. Für die Sequenzierung

wurde der 5'-Primer der PCR genutzt. Die Sanger-Sequenzierung wurde als LightRun Tube Auftrag durch die Eurofins Genomics Germany GmbH, welche den Sequenzierservice der Firma GATC Biotech AG übernommen hat, ausgeführt. Mit einem blauen Rahmen wurde der Bereich der Deletion eines Adennukleotids markiert.

10.4 Ergebnisse der Genomsequenzierung

Die Mutante *E. coli* MIVa (GK 575) und die CRISPR *clpA*-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 (GK 4686) wurden für eine Genomsequenzierung ausgewählt. Die Isolierung der DNA und die Vorbereitungen der Proben erfolgte, wie in Kapitel 8.2.2.9.3 beschrieben. Die Sequenzierung wurde von der GENEWIZ® Germany GmbH an einem Next-Generation Sequencing (NGS) Gerät von Illumina®, dem NovaSeq™ 6000-Sequenziersystem, durchgeführt. Die von der Firma bereitgestellten Daten wurden im Anschluss mit dem Programm CLC Genomics Workbench 8.0.2 von QIAGEN N.V. analysiert. Nach dem durchgeführten Assembly der Daten erfolgte das Alignment gegen den bereits sequenzierten Referenzstamm *E. coli* WT (GK 571). Im Anschluss konnten sogenannte *Variants* herausgestellt werden, welche in *Track Lists* von dem Programm aufgeführt wurden. Nachfolgend sind die Ergebnisse dargestellt, die mit CLC Genomics Workbench 8.0.2 generiert und in zwei Tabellen exportiert wurden (Heisig, A., Groth, P., persönliche Mitteilung). Dabei zeigt die eine Tabelle 10.4–1 die Unterschiede in der Genomsequenz, welche nur bei *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 (GK 4686) auftreten und weder bei *E. coli* WT (GK 571) noch bei *E. coli* MIVa (GK 575). Die zweite Tabelle 10.4–2 zeigt dementsprechend die Unterschiede von *E. coli* MIVa (GK 575), die nicht bei *E. coli* WT (GK 571) und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 (GK 4686) vorliegen.

Tabelle 10.4–1: Track List Variants vs. GK 571 known vs. GK 575 known

Chromosome	Region	Type	Reference	Allele	Reference allele	Length	Linkage	Zygosity	Count	Coverage	Frequency	Probability	Forward read count	Reverse read count	Forward/reverse balance	Average quality	Overlap
gn ZB H GK571_contig000001	1129123	SNV	T	T	Yes	1		Heterozygous	704	851	82,726204	0,9999999	502	332	0,398082	36,44844	
gn ZB H GK571_contig000001	1129123	SNV	T	G	No	1		Heterozygous	145	851	17,038778	0,9999999	100	141	0,414938	36,74274	
gn ZB H GK571_contig000001	1734469^1734470	Insertion	-	-	Yes	0		Heterozygous	10	14	71,428571	0,9999235	1	10	0,090909	35,90909	
gn ZB H GK571_contig000001	1734469^1734470	Insertion	-	G	No	1		Heterozygous	4	14	28,571429	0,9999235	4	3	0,428571	37	
gn ZB H GK571_contig000001	2053518^2053519	Insertion	-	T	No	1		Homozygous	12	21	57,142857	0,6000434	11	11	0,5	36,45455	
gn ZB H GK571_contig000001	2183914	SNV	A	G	No	1		Homozygous	55	55	1,00	1	4	51	0,072727	36,09091	
gn ZB H GK571_contig000001	2184002	SNV	C	T	No	1		Homozygous	11	11	1,00	1	3	10	0,230769	36,07692	
gn ZB H GK571_contig000001	2424549^2424550	Insertion	-	-	Yes	0		Heterozygous	226	814	27,764128	1	82	144	0,362832	35,48673	R_2013_12
gn ZB H GK571_contig000001	2424549^2424550	Insertion	-	GC	No	2		Heterozygous	4	814	0,4914005	1	3	1	0,25	21	R_2013_12
gn ZB H GK571_contig000001	2822294	SNV	C	T	No	1		Homozygous	1013	1015	99,802956	1	650	572	0,468085	36,35843	
gn ZB H GK571_contig000001	3549754	SNV	C	G	No	1		Homozygous	168	168	1,00	1	11	163	0,063218	36,71264	R_2013_12
gn ZB H GK571_contig000001	3549755	SNV	T	G	No	1		Homozygous	168	168	1,00	1	11	163	0,063218	36,79311	R_2013_12
gn ZB H GK571_contig000001	3566493	SNV	C	G	No	1		Heterozygous	2	1148	0,174216	1	1	1	0,5	24,25	R_2013_12
gn ZB H GK571_contig000001	4950180	SNV	C	T	No	1		Homozygous	637	637	1,00	1	395	404	0,494368	36,53692	
gn ZB H GK571_contig000002	14410	SNV	T	T	Yes	1		Heterozygous	380	616	61,688312	1	198	220	0,473684	21,81818	
gn ZB H GK571_contig000002	14410	SNV	T	G	No	1		Heterozygous	140	616	22,727273	1	106	48	0,311688	13,19481	

Tabelle 10.4–2: Track List Variants vs. GK 571 known vs. GK 4686 known

Chromosome	Region	Type	Reference Allele	Allele	Reference allele	Length	Linkage	Zygosity	Count	Coverage	Frequency	Probability	Forward read count	Reverse read count	Forward/reverse balance	Average quality	Overlap
gklZBH GK571_contig000001	22881^22882	Insertion	-	-	Yes	0	0	Heterozygous	252	340	74,117647	0,9999989	147	148	0,489305	35,93559	
gklZBH GK571_contig000001	22881^22882	Insertion	-	C	No	1	1	Heterozygous	88	340	25,882353	0,9999989	70	18	0,204545	37	
gklZBH GK571_contig000001	435803	SNV	C	C	Yes	1	1	Heterozygous	516	661	78,06354	1	276	358	0,435331	36,45426	R_2013_11
gklZBH GK571_contig000001	435803	SNV	C	T	No	1	1	Heterozygous	144	661	21,785174	1	112	115	0,483392	36,24229	R_2013_11
gklZBH GK571_contig000001	435810	SNV	T	T	Yes	1	1	Heterozygous	502	649	77,349769	1	272	348	0,43871	36,3129	R_2013_11
gklZBH GK571_contig000001	435810	SNV	T	C	No	1	1	Heterozygous	147	649	22,650231	1	115	122	0,485232	36,79747	R_2013_11
gklZBH GK571_contig000001	435812	SNV	C	C	Yes	1	1	Heterozygous	484	642	76,94704	1	265	345	0,434426	35,87213	R_2013_11
gklZBH GK571_contig000001	435812	SNV	C	T	No	1	1	Heterozygous	147	642	22,897196	1	115	122	0,485232	36,8481	R_2013_11
gklZBH GK571_contig000001	1010272	SNV	A	T	No	1	1	Heterozygous	2	934	0,214328	1	1	1	0,5	24	R_2013_11
gklZBH GK571_contig000001	1027563	SNV	C	C	Yes	1	1	Heterozygous	424	627	67,623604	1	245	202	0,451902	28,82998	
gklZBH GK571_contig000001	1027563	SNV	C	A	No	1	1	Heterozygous	149	627	23,763955	1	65	96	0,40625	16,1375	
gklZBH GK571_contig000001	1614489^1614490	Insertion	-	-	TTGGCTGTTT	No	10	Heterozygous	184	657	28,008088	1	78	106	0,423913	36,51738	MiliclpA_5
gklZBH GK571_contig000001	1861669	Deletion	A	-	No	1	1	Homozygous	540	579	93,264249	1	318	332	0,489231	35,55692	
gklZBH GK571_contig000001	2780381^2780382	Insertion	-	G	No	1	1	Homozygous	61	86	70,930233	1	7	54	0,114754	36,60656	
gklZBH GK571_contig000001	2809299	SNV	C	T	No	1	1	Homozygous	30	46	65,217991	1	3	27	0,1	37	
gklZBH GK571_contig000001	3134392	SNV	C	A	No	1	1	Homozygous	866	682	97,653959	1	417	376	0,474149	35,86255	
gklZBH GK571_contig000001	3571081^3571082	Insertion	-	-	Yes	0	0	Heterozygous	286	409	69,92665	1	159	209	0,432065	36,05435	
gklZBH GK571_contig000001	3571081^3571082	Insertion	-	A	No	1	1	Heterozygous	123	409	30,07335	1	85	38	0,308943	36,08943	

Zur näheren Analyse der gefundenen Varianten wurden die einzelnen Alignments aus dem Programm CLC Genomics Workbench 8.0.2 mithilfe des Integrative Genomics Viewer (IGV) (Robinson et al. 2011; Thorvaldsdóttir/Robinson/Mesirov 2012) angesehen und miteinander verglichen. Hierbei konnte beispielsweise überprüft werden, wie gut die Abdeckung der Sequenzierung an bestimmten Stellen war, und beurteilt werden, wie wahrscheinlich die angezeigte Veränderung in der Genomsequenz auch wirklich vorhanden ist.

Die Abbildung 10.4–1 zeigt zur Bestätigung der bereits zuvor durchgeführten Sanger-Sequenzierung (vgl. Abbildung 10.3–8) die erfolgreiche Mutagenese von *E. coli* MIII mit der *clpA*-Mutation aus *E. coli* MIVa (vgl. Kapitel 5.3.3).

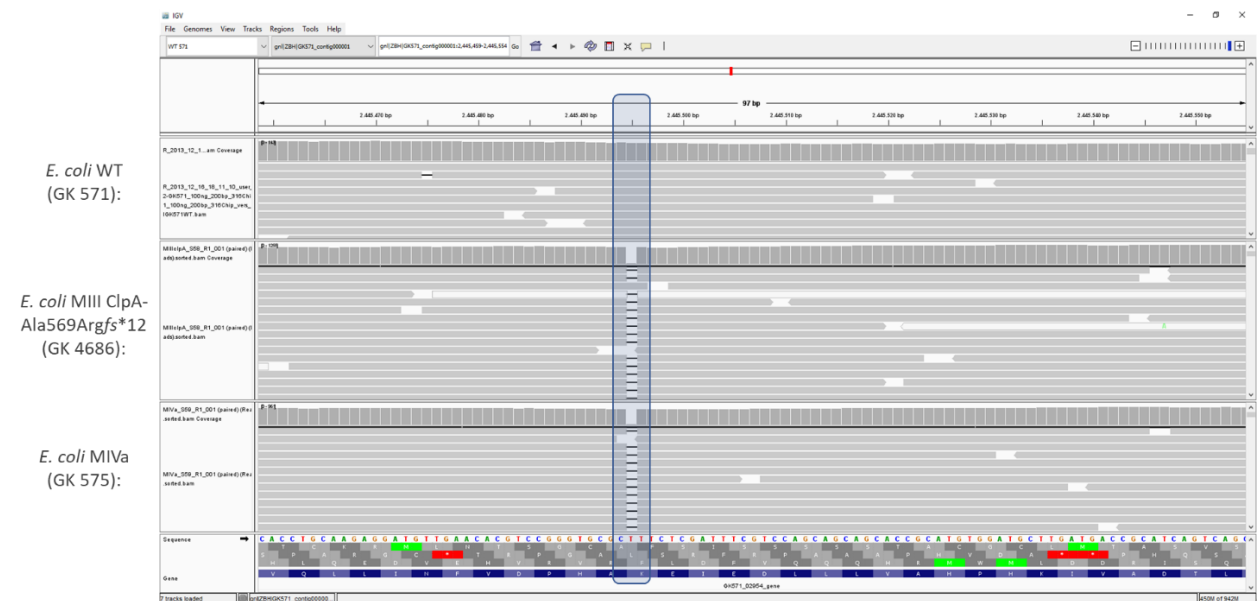


Abbildung 10.4–1: Ausschnitt der Genomsequenzierung von GK 4686 und GK 575 (*clpA*)
 Dargestellt ist ein Ausschnitt des Gens *clpA* im Integrative Genomics Viewer (IGV). In dem obersten der drei zu vergleichenden Alignments sind die bereits bekannten, im Arbeitskreis vorhandenen, Daten von *E. coli* WT (GK 571) aufgeführt. Es han-

delt sich um ein Alignment von Sequenzdaten des *E. coli* WT, welche mit der Ion Torrent™ Technologie sequenziert wurden (Rusk 2011), gegen die Daten einer Sequenzierung dieses Stammes von PacBio (Eid et al. 2009). In der mittleren Reihe wurden die NGS-Daten von der GENEWIZ® Germany GmbH der Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 (GK 4686) bzw. in der unteren Reihe der Mutante *E. coli* MIVa jeweils gegen die PacBio Daten von *E. coli* WT aligniert. Die Position der Deletion wurde mit einem blauen Rahmen markiert. Bei *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 wurde in 875 von 922 Reads (kurze sequenzierte DNA-Abschnitte) die Deletion detektiert, das entsprachen 94,9 % der Reads. Bei *E. coli* MIVa waren es 629 von 659 Reads (95,4 %).

Zunächst wurden im IGV alle Variants vs. GK 571 known vs. GK 575 known der Track List (vgl. Tabelle 10.4–1) betrachtet, um Abweichungen in der Sequenz von *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 (GK 4686) herauszustellen. Dabei stellten sich zwei Veränderungen heraus, die sich eindeutig von den Referenzen unterschieden. In den folgenden Abbildungen sind diese beiden Mutationen dargestellt.

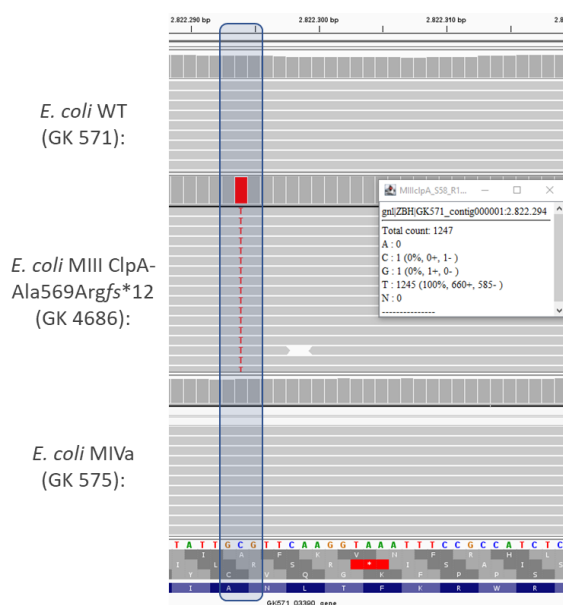


Abbildung 10.4–2: Ausschnitt der Genomsequenzierung von GK 4686 und GK 575 (*ylbE*)

Dargestellt ist ein Ausschnitt des Gens *ylbE* im Integrative Genomics Viewer (IGV). Vergleichbar mit den Angaben in Abbildung 10.4–1 sind die Alignments des Stammes *E. coli* WT (GK 571) und der Mutanten *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 (GK 4686) und *E. coli* MIVa (GK 575) gegenübergestellt. Die Position der Punktmutation und das davon betroffene Triplet wurden mit einem blauen Rahmen markiert. Bei *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 wurde in 1245 von 1247 Reads die Mutation detektiert, das entsprachen 99,8 % der Reads. Da die Leserichtung dieses Gens *ylbE*, dessen Genprodukt bislang keine bekannte Funktion aufweist, in dieser Abbildung von rechts nach links verläuft, bringt diese Punktmutation ein Wechsel von CCG zu CAC in der codierenden Sequenz mit sich. Für die codierende Aminosäure bedeutet dies einen Austausch von Arginin zu Histidin. Bei *E. coli* WT liegt zu 100 % und bei *E. coli* MIVa zu 99,9 % das Guaninnukleotid an dieser Position vor.

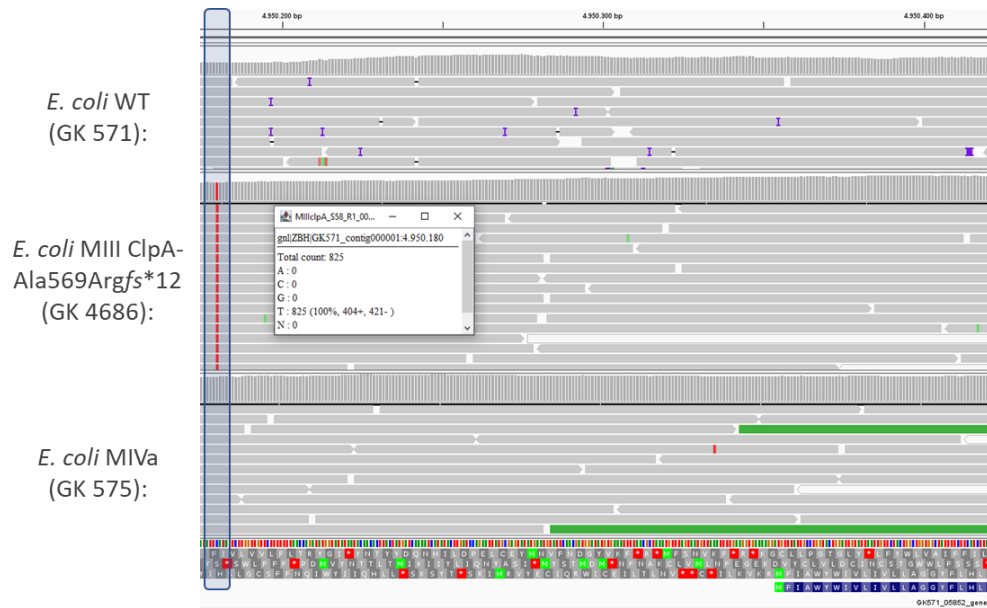


Abbildung 10.4–3: Ausschnitt der Genomsequenzierung von GK 4686 und GK 575 (upstream von *yqiD*)

Dargestellt ist ein Ausschnitt upstream des Gens *yqiD* im Integrative Genomics Viewer (IGV). Vergleichbar mit den Angaben in Abbildung 10.4–1 sind die Alignments des Stammes *E. coli* WT (GK 571) und der Mutanten *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 (GK 4686) und *E. coli* MIVa (GK 575) gegenübergestellt. Die Position der Punktmutation zu einem Thyminnukleotid wurde mit einem blauen Rahmen markiert. Bei *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 wurde in allen 825 der 825 Reads die Mutation detektiert. Bei *E. coli* WT liegt zu 100 % und bei *E. coli* MIVa zu 99,9 % ein Cytosinnukleotid an dieser Position vor. Die Punktmutation befindet sich 174 bp upstream des Gens *yqiD*, dessen Genprodukt bislang keine bekannte Funktion aufweist. Die Mutation könnte jedoch im regulatorischen Bereich des Gens liegen und somit die Expression beeinflussen.

Im Anschluss wurden im IGV alle *Variants vs. GK 571 known vs. GK 4686 known* der *Track List* (vgl. Tabelle 10.4–2) betrachtet, um die möglichen Abweichungen in der Sequenz von *E. coli* MIVa (GK 575) herauszustellen. Dabei stellten sich auch zwei Veränderungen heraus, die sich eindeutig von den Referenzen unterscheiden. In den folgenden Abbildungen sind diese beiden Mutationen dargestellt.

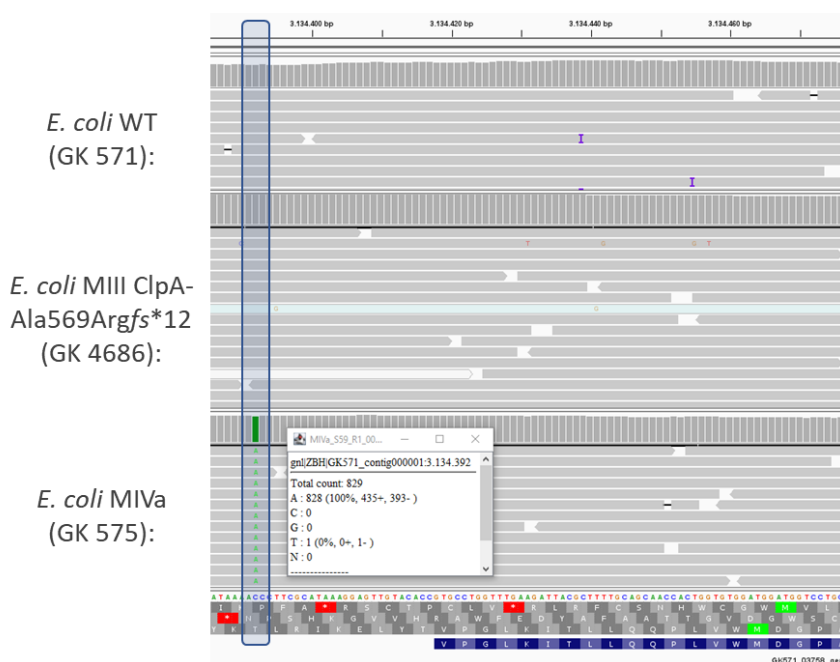


Abbildung 10.4–4: Ausschnitt der Genomsequenzierung von GK 4686 und GK 575 (upstream von *yafV*)

Dargestellt ist ein Ausschnitt upstream des Gens *yafV* im Integrative Genomics Viewer (IGV). Vergleichbar mit den Angaben in Abbildung 10.4–1 sind die Alignments des Stammes *E. coli* WT (GK 571) und der Mutanten *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 (GK 4686) und *E. coli* MIVa (GK 575) gegenübergestellt. Die Position der Punktmutation zu einem Adeninukleotid wurde mit einem blauen Rahmen markiert. Bei *E. coli* MIVa wurde in 828 der 829 Reads die Mutation detektiert, das entsprachen 99,9 % der Reads. Bei *E. coli* WT liegt zu 98,1 % und bei *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 zu 99,9 % ein Cytosinnukleotid an dieser Position vor. Die Punktmutation befindet sich 26 bp upstream des Gens *yafV*, dessen Genprodukt, eine ω -Amidase, als „metabolite repair enzyme“ beschrieben wird (Peracchi et al. 2017). Die Mutation liegt im regulatorischen Bereich des Gens und kann somit die Expression beeinflussen. In älteren Sequenzierungsdaten aus dem Arbeitskreis des Stammes *E. coli* MIVa-300 (GK 734) (Schulte 2001) wurde diese Mutation auch bereits detektiert (Heisig, A., persönliche Mitteilung).

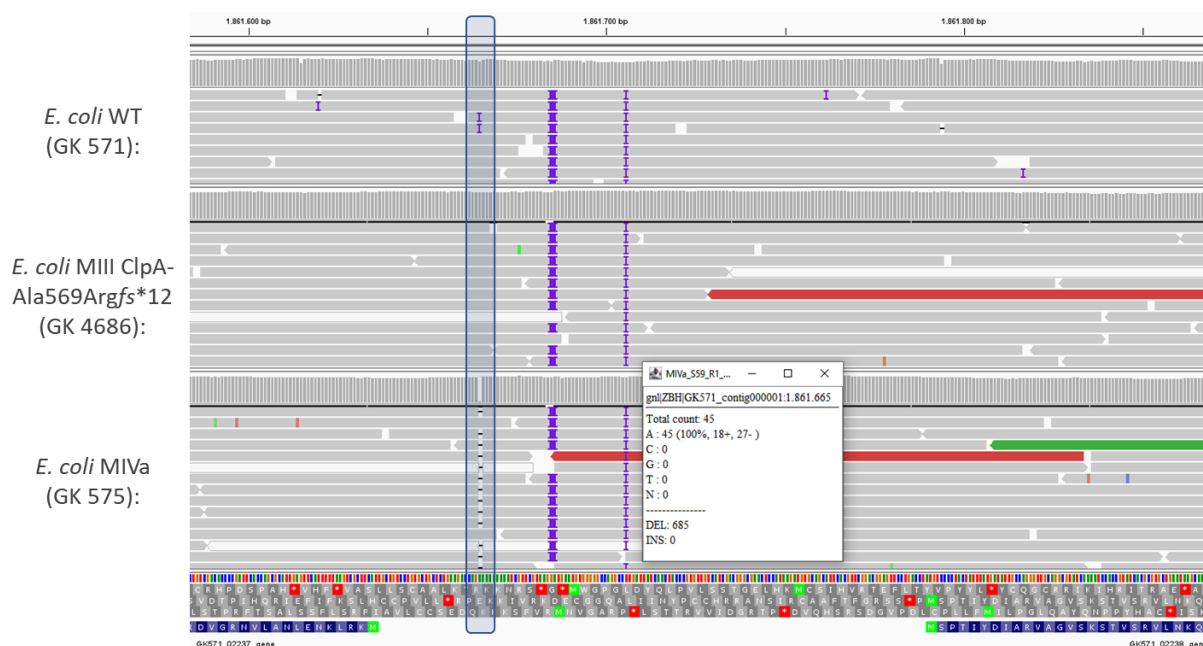
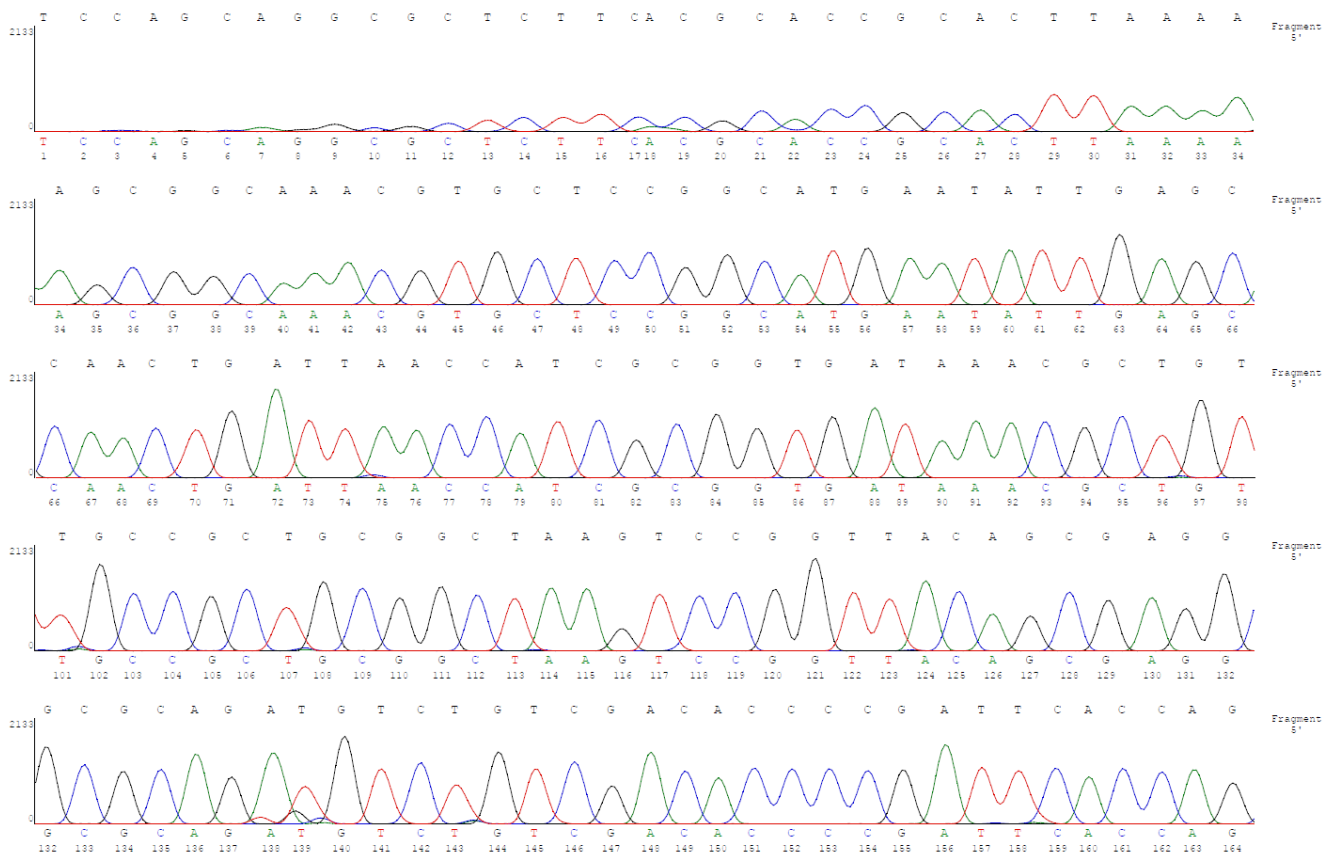


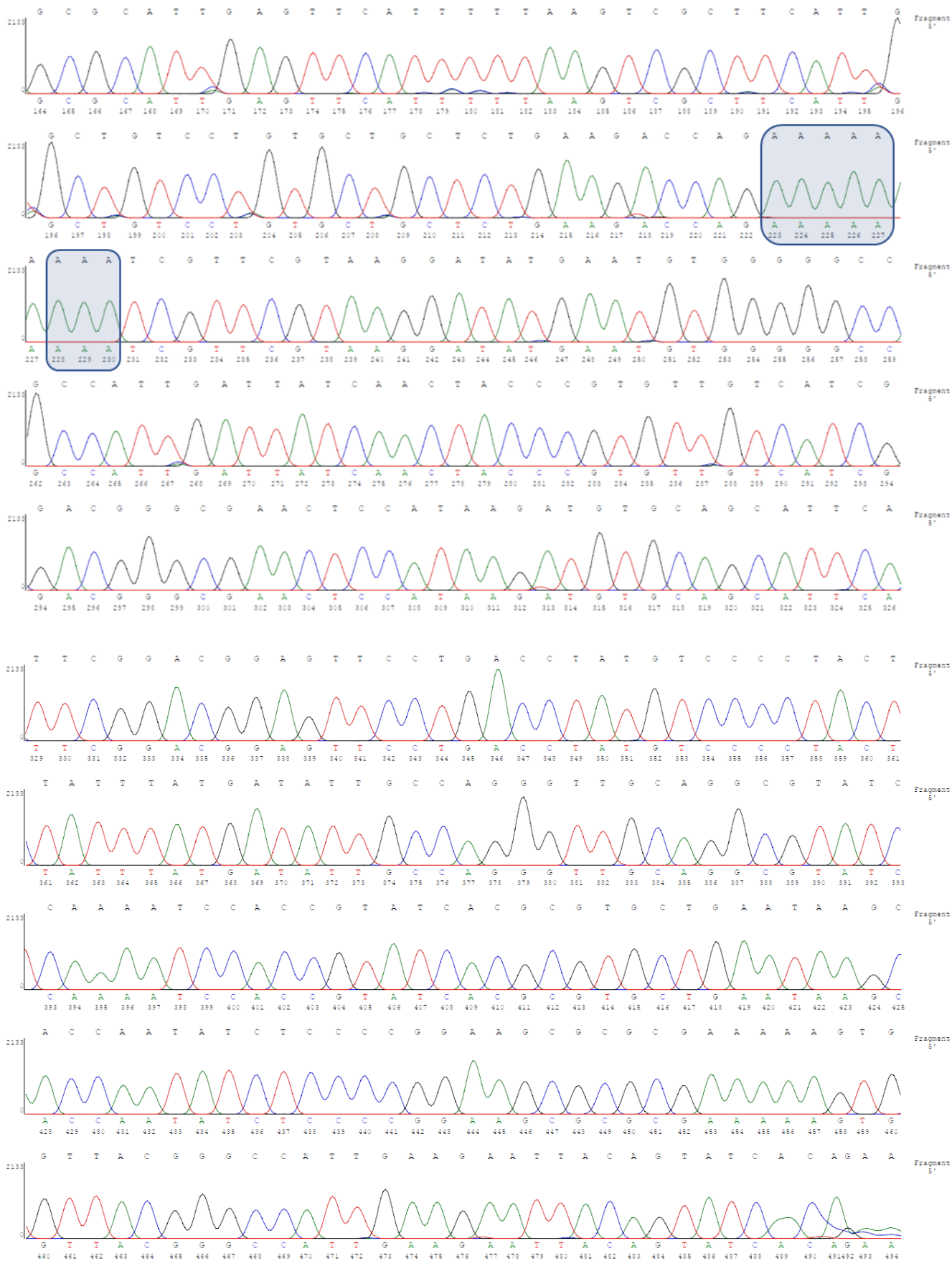
Abbildung 10.4–5: Ausschnitt der Genomsequenzierung von GK 4686 und GK 575 (upstream von *ycjX* bzw. *ccpA*)

Dargestellt ist ein Ausschnitt upstream des Gens *ycjX* bzw. upstream des Gens *ccpA* im Integrative Genomics Viewer (IGV). Vergleichbar mit den Angaben in Abbildung 10.4–1 sind die Alignments des Stammes *E. coli* WT (GK 571) und der Mutanten

E. coli MIII ClpA-Ala569Argfs*12 (GK 4686) und *E. coli* MIVa (GK 575) gegenübergestellt. Die Position der Deletion eines Adeninnukleotids wurde mit einem blauen Rahmen markiert. Bei *E. coli* MIVa wurde in 685 der 730 Reads die Mutation detektiert, das entsprachen 93,8% der Reads. Bei *E. coli* WT liegt zu 74,2% und bei *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 zu 99,7% ein Adeninnukleotid an dieser Position vor. Die Deletion befindet sich 29 bp upstream des Gens *ycjX*, dessen Genprodukt bislang keine bekannte Funktion aufweist, jedoch unter Stress aktiviert werden kann (Tsai et al. 2019). Des Weiteren liegt die Deletion auch 120 bp upstream des Gens *ccpA*, welches auch *ycjW* genannt wird und für einen Transkriptionsrepressor codiert (Luhachack et al. 2019). Die Mutation liegt im regulatorischen Bereich der Gene und kann somit die Expression beeinflussen.

Da es sich bei der Position der Deletion um einen Sequenzbereich handelt, bei dem mehrere gleiche Nukleotide in Folge vorkommen und dadurch die Sequenzierung schwieriger sein kann, wurde zusätzlich eine Sanger-Sequenzierung bei der Eurofins Genomics Germany GmbH, welche den Sequenzierservice der Firma GATC Biotech AG übernommen hat, in Auftrag gegeben. Sequenziert wurde von beiden Seiten, also sowohl mit dem 5'-Primer als auch mit dem 3'-Primer. Nachfolgend sind die kompletten Elektropherogramme dieser Sequenzierung dargestellt (Rohdaten):





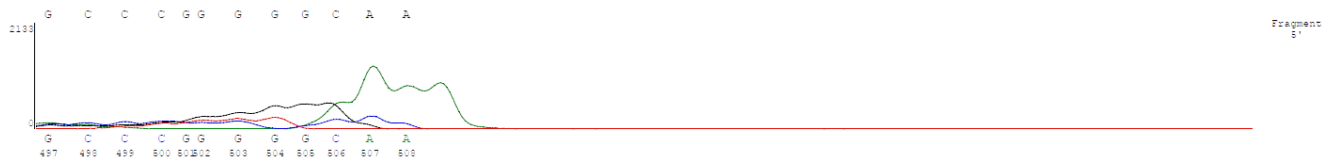


Abbildung 10.4–6: Elektropherogramm *E. coli* MIVa upstream des Gens *ccpA* (5′-Primer)

Dargestellt sind die Rohdaten der Sanger-Sequenzierung eines 541 bp großen PCR-Fragmentes, amplifiziert mit den Oligonukleotiden *ccpA*_5_-386_EcoWT und *ccpA*_3_155_EcoWT (vgl. Tabelle 8.1–3), als Chromatogramm. Für die Sequenzierung wurde der 5′-Primer der PCR genutzt. Die Sanger-Sequenzierung wurde als LightRun Tube Auftrag durch die Eurofins Genomics Germany GmbH, welche den Sequenzierservice der Firma GATC Biotech AG übernommen hat, ausgeführt. Mit den blauen Rahmen wurde der Bereich der Deletion eines Adeninnukleotids markiert.

Aufgrund des Zeilenumbruches der Position der Deletion im Elektropherogramm in Abbildung 10.4–6 ist im Folgenden zusätzlich nur ein Ausschnitt des Elektropherogramms dargestellt. Die Abfolge von ausschließlich acht Adeninnukleotiden in Folge ist deutlich erkennbar.

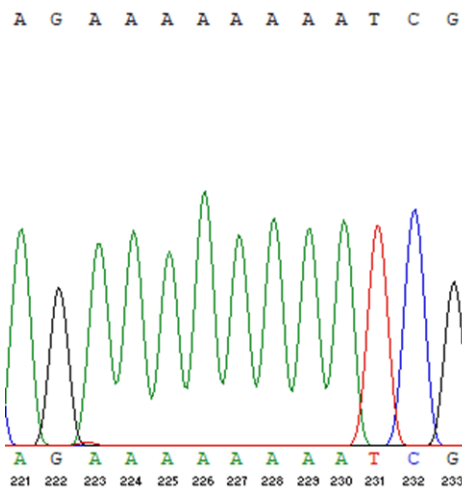
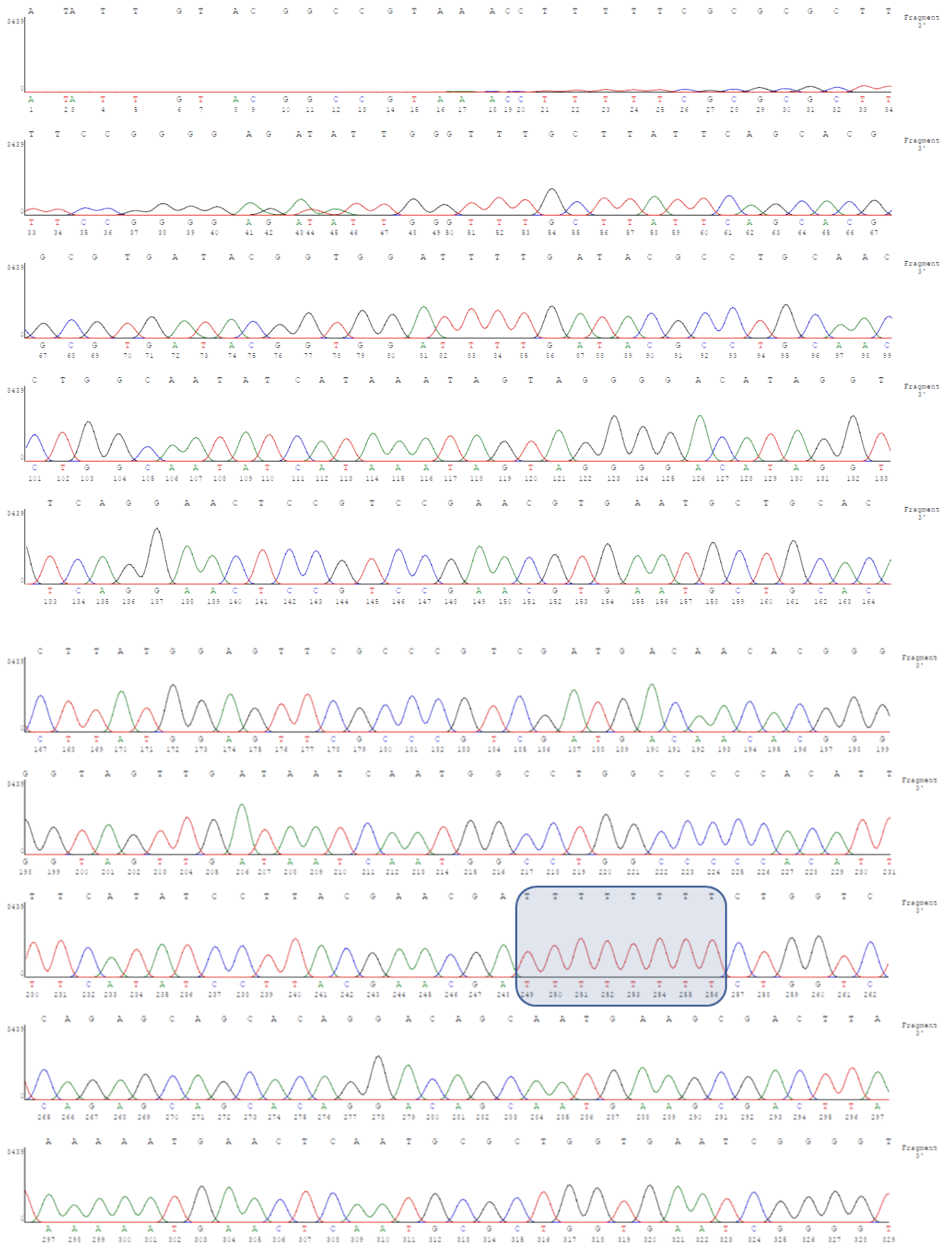


Abbildung 10.4–7: Ausschnitt des Elektropherogramms *E. coli* MIVa upstream des Gens *ccpA* (5′-Primer)

Vergleichbar mit der Bildunterschrift in Abbildung 10.4–6 wurde hier nur ein Ausschnitt des Elektropherogramms abgebildet, um den Sequenzbereich der Position der Deletion in einer Zeile darstellen zu können. Eindeutig sind ausschließlich acht Adeninnukleotide in Folge sequenziert worden.



Anhang

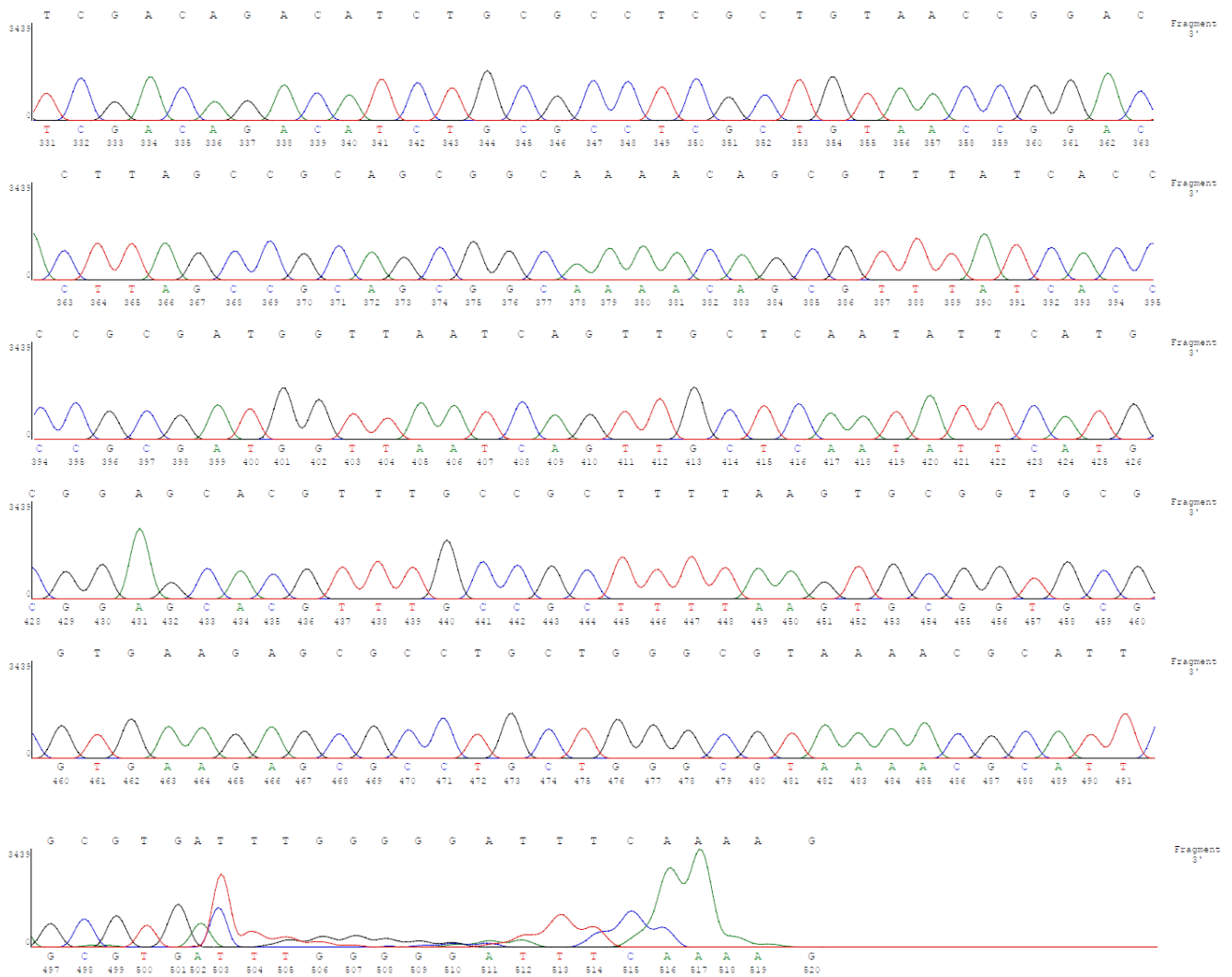


Abbildung 10.4–8: Elektropherogramm *E. coli* MIVa upstream des Gens *ccpA* (3'-Primer)

Dargestellt sind die Rohdaten der Sanger-Sequenzierung eines 541 bp großen PCR-Fragmentes, amplifiziert mit den Oligonukleotiden *ccpA*_5_-386_EcoWT und *ccpA*_3_155_EcoWT (vgl. Tabelle 8.1–3), als Chromatogramm. Für die Sequenzierung wurde der 3'-Primer der PCR genutzt. Die Sanger-Sequenzierung wurde als LightRun Tube Auftrag durch die Eurofins Genomics Germany GmbH, welche den Sequenzierservice der Firma GATC Biotech AG übernommen hat, ausgeführt. Mit einem blauen Rahmen wurde der Bereich der Deletion eines Adennukleotids bzw. in dieser Abbildung in reverser Darstellung eines Thyminnukleotids markiert.

10.5 Ergebnisse der sequenzspezifischen PCR: ARMS

Für einen ersten Nachweis, dass die Einführung einer gewünschten Mutation mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems erfolgreich war, wurden verschiedene ARMS-PCRs etabliert (vgl. Kapitel 8.2.2.2.4, 5.3.1.3, 5.3.2.1.3, 5.3.2.2.3 bzw. 5.3.3.1). Im Folgenden sind die Bilder der jeweiligen Gele aus der Agarose-Gelelektrophorese dargestellt.

10.5.1 Mutagenese von *E. coli* WT mit der *clpA*-Mutation aus *E. coli* MIVa

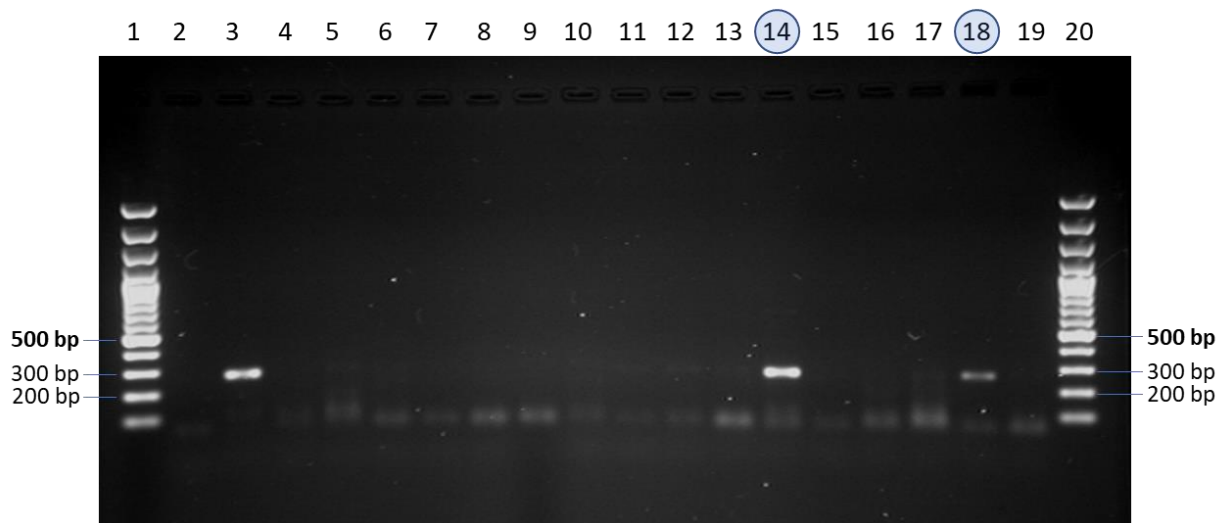


Abbildung 10.5–1: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der *clpA*-Mutation

Dargestellt ist ein 100 mL großes Agarosegel mit einer Agarosekonzentration von 1,2 %, welches für 280 ms mit UV-Licht belichtet und fotografiert wurde. Zur Herstellung des Agarosegels sowie als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 0,5-fach konzentrierter TAE-Puffer verwendet. Das Gel wurde direkt mit 1 μ L einer einprozentigen Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 15 Minuten bei 80 V (36 mA) und darauf für 30 Minuten bei 110 V (51 mA). Für die PCR wurden die Oligonukleotide *clpA_5_1462_EcoWT* und *clpA_3_1721_EcoMIVa_ARMS* genutzt (vgl. Tabelle 8.1–3). Wenn ein Amplifikat entsteht, wird eine Größe von 260 bp erwartet. Folgendes Auftragschema liegt dem Agarosegel zugrunde:

- Spur 1: 2 μ L Größenmarker (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder)
- Spur 2: 5 μ L Negativkontrolle der PCR (ohne Template)
- Spur 3: 3 μ L Positivkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* MIVa
- Spur 4: 3 μ L Negativkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* WT
- Spur 5: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #11
- Spur 6: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #12
- Spur 7: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #13
- Spur 8: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #14
- Spur 9: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #15
- Spur 10: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #16
- Spur 11: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #17
- Spur 12: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #18
- Spur 13: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #19
- Spur 14: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #20**
- Spur 15: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #21
- Spur 16: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #22
- Spur 17: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #23
- Spur 18: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #24**
- Spur 19: 3 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #25
- Spur 20: 2 μ L Größenmarker (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder)

Neben der Positivkontrolle mit der DNA von *E. coli* MIVa in Spur 3 zeigt die ARMS-PCR der CRISPR *clpA*-Mutante #20 in Spur 14 bzw. die ARMS-PCR der CRISPR *clpA*-Mutante #24 in Spur 18 ein Amplifikat (vgl. Markierung in Abbildung 10.5–1). Die Ergebnisse der im Anschluss erfolgten Sanger-Sequenzierung der beiden Mutanten sind in Kapitel 10.3.1 aufgezeigt.

10.5.2 Mutagenese von *E. coli* MIVa mit der *clpA*-Wildtypsequenz aus *E. coli* WT

10.5.2.1 Direkte Mutagenese

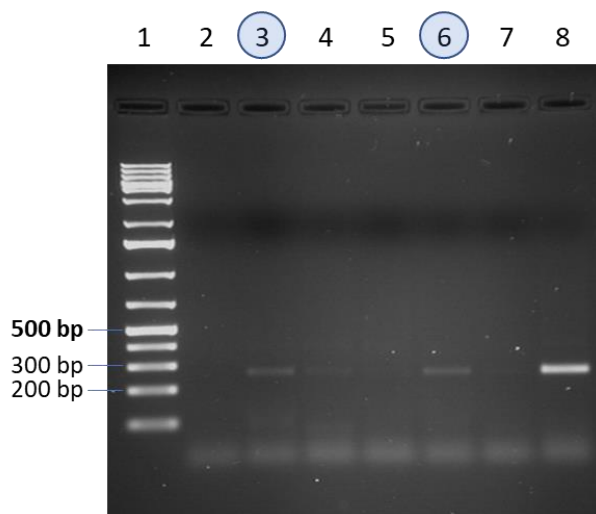


Abbildung 10.5–2: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der *clpA*-Mutation

Dargestellt ist ein 100 mL großes Agarosegel mit einer Agarosekonzentration von 1,2 %, welches für 600 ms mit UV-Licht belichtet und fotografiert wurde. Zur Herstellung des Agarosegels sowie als Lauffuffer für die Elektrophorese wurde 0,5-fach konzentrierter TAE-Puffer verwendet. Das Gel wurde direkt mit 1 μ L einer einprozentigen Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die Elektrophorese erfolgte für 70 Minuten bei 100 V (54 mA). Für die PCR wurden die Oligonukleotide *clpA*_5_1462_EcoWT und *clpA*_3_1722_EcoWT_ARMS genutzt (vgl. Tabelle 8.1–3). Wenn ein Amplifikat entsteht, wird eine Größe von 261 bp erwartet. Folgendes Auftragsschema liegt dem Agarosegel zugrunde:

Spur 1: 1,5 μ L Größenmarker (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder)

Spur 2: 10 μ L Negativkontrolle der PCR (ohne Template)

Spur 3: 10 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #21

Spur 4: 10 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #24

Spur 5: 10 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #52

Spur 6: 10 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #58

Spur 7: 10 μ L Negativkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* MIVa

Spur 8: 10 μ L Positivkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* WT

Neben der Positivkontrolle mit der DNA von *E. coli* WT in Spur 8 zeigt die ARMS-PCR der CRISPR *clpA*-Mutante #21 in Spur 3 bzw. die ARMS-PCR der CRISPR *clpA*-Mutante #58 in Spur 6 ein Amplifikat (vgl. Markierung in Abbildung 10.5–2). Die Ergebnisse der im Anschluss erfolgten Sanger-Sequenzierung der beiden Mutanten sind in Kapitel 10.3.2.1 aufgezeigt.

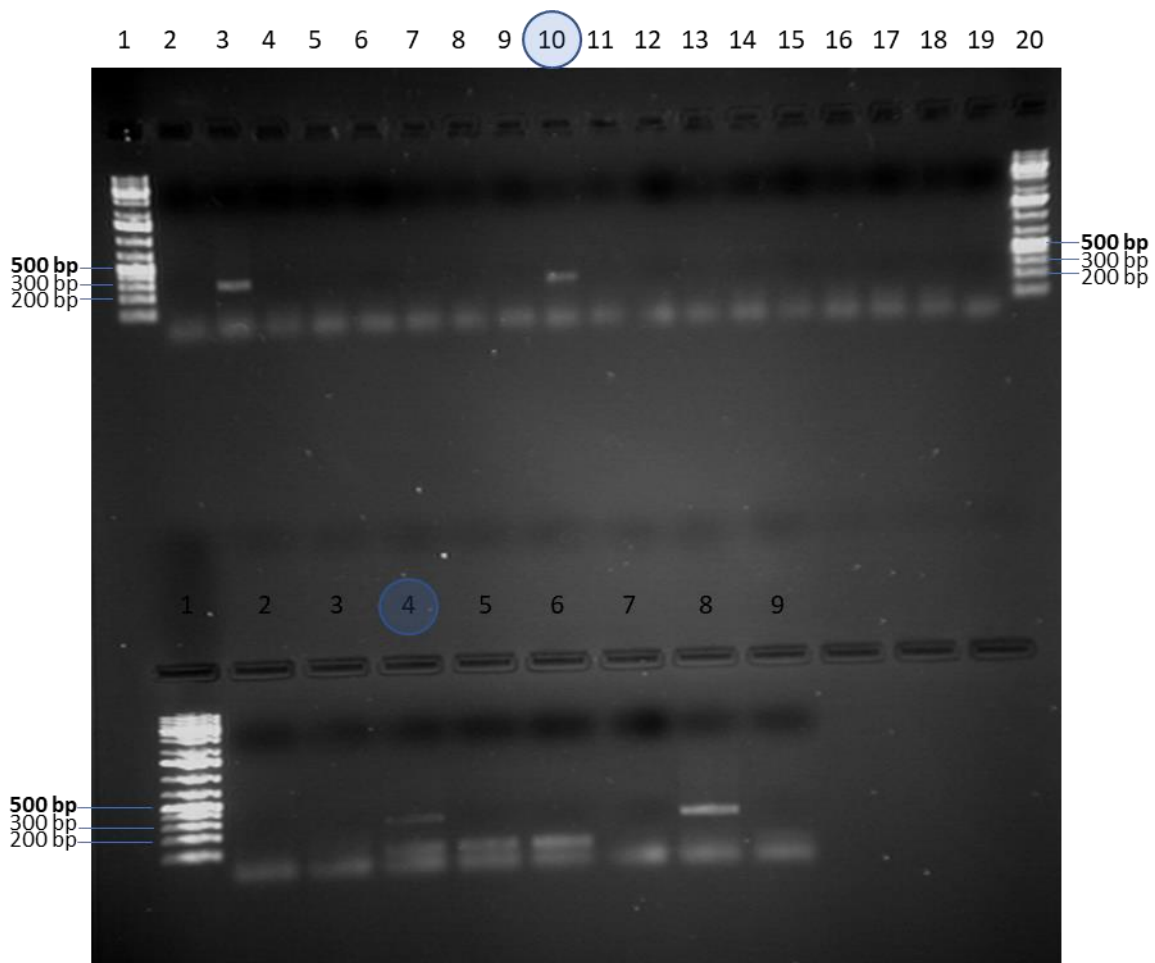


Abbildung 10.5–3: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der *clpA*-Mutation

Dargestellt ist ein 100 mL großes Agarosegel mit einer Agarosekonzentration von 1,2 %, welches für 680 ms mit UV-Licht belichtet und fotografiert wurde. Zur Herstellung des Agarosegels sowie als Lauffuffer für die Elektrophorese wurde 0,5-fach konzentrierter TAE-Puffer verwendet. Das Gel wurde direkt mit 1 μ L einer einprozentigen Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die Elektrophorese erfolgte für 25 Minuten bei 170 V (81 mA). Für die PCR wurden die Oligonukleotide *clpA_5_1462_EcoWT* und *clpA_3_1722_EcoWT_ARMS* genutzt (vgl. Tabelle 8.1–3). Wenn ein Amplifikat entsteht, wird eine Größe von 261 bp erwartet. Folgendes Auftragschema liegt dem Agarosegel zugrunde:

Obere Reihe:

Spur 1: 1 μ L Größenmarker (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder)

Spur 2: 6 μ L Negativkontrolle der PCR (ohne Template)

Spur 3: 6 μ L Positivkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* WT

Spur 4: 6 μ L Negativkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* MIVa

Spur 5: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #141

Spur 6: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #142

Spur 7: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #143

Spur 8: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #144

Spur 9: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #145

Spur 10: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #146

Spur 11: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #147

Spur 12: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #148

Spur 13: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #149

Spur 14: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #150

Spur 15: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #171

Spur 16: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #172

Spur 17: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #173

Spur 18: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #174
 Spur 19: 6 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #175
 Spur 20: 1 μ L Größenmarker (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder)

Untere Reihe:

Spur 1: 1,5 μ L Größenmarker (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder)
 Spur 2: 10 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #176
 Spur 3: 10 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #177
Spur 4: 10 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #178
 Spur 5: 10 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #179
 Spur 6: 10 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #180
 Spur 7: 10 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #149 (Wdh.)
 Spur 8: 10 μ L Positivkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* WT
 Spur 9: 10 μ L Negativkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* MIVa

Neben der Positivkontrolle mit der DNA von *E. coli* WT in Spur 3 in der oberen Reihe bzw. in Spur 8 in der unteren Reihe zeigt die ARMS-PCR der CRISPR *clpA*-Mutante #146 in Spur 10 in der oberen Reihe bzw. die ARMS-PCR der CRISPR *clpA*-Mutante #178 in Spur 4 in der unteren Reihe ein Amplifikat (vgl. Markierung in Abbildung 10.5–3). Die Ergebnisse der im Anschluss erfolgten Sanger-Sequenzierung der beiden Mutanten sind in Kapitel 10.3.2.1 aufgezeigt.

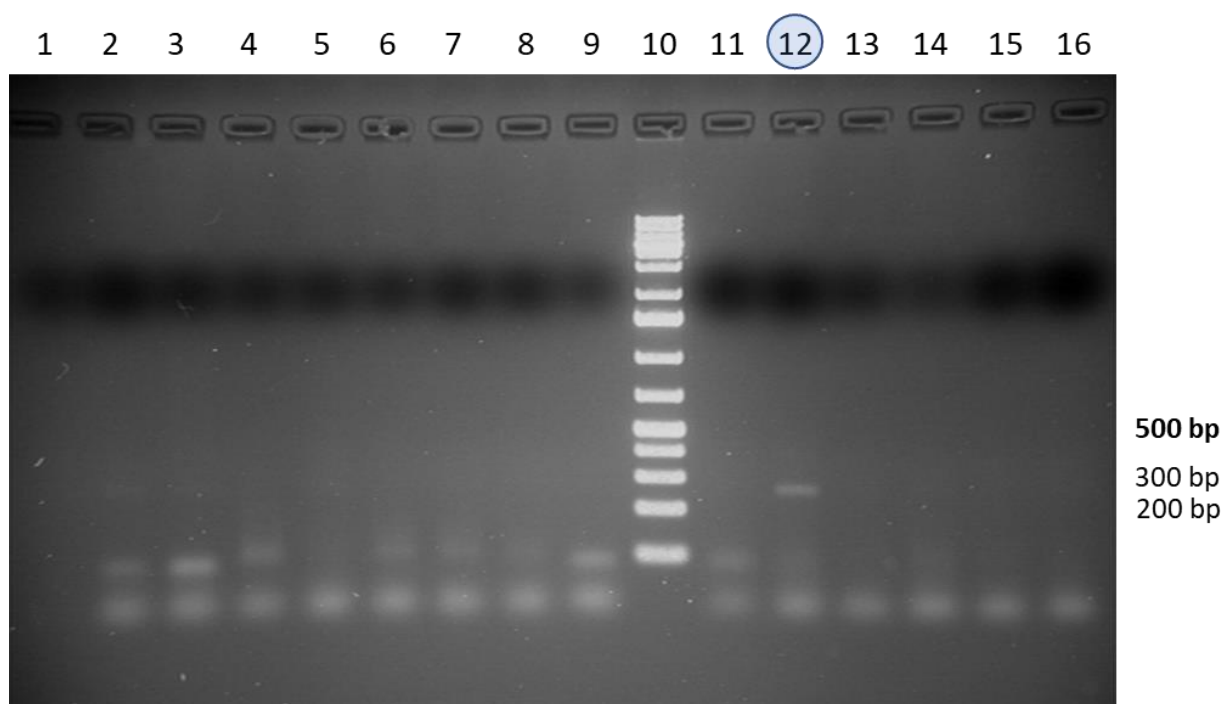


Abbildung 10.5–4: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der *clpA*-Mutation

Dargestellt ist ein 100 mL großes Agarosegel mit einer Agarosekonzentration von 1,3 %, welches für 1520 ms mit UV-Licht belichtet und fotografiert wurde. Zur Herstellung des Agarosegels sowie als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 0,5-fach konzentrierter TAE-Puffer verwendet. Das Gel wurde direkt mit 1 μ L einer einprozentigen Ethidumbromidlösung gefärbt. Die Elektrophorese erfolgte für 40 Minuten bei 140 V (79 mA). Für die PCR wurden die Oligonukleotide *clpA*_5_1462_EcoWT und *clpA*_3_1722_EcoWT_ARMS genutzt (vgl. Tabelle 8.1–3). Wenn ein Amplifikat entsteht, wird eine Größe von 261 bp erwartet. Folgendes Auftragschema liegt dem Agarosegel zugrunde:

- Spur 1: 5 µL Negativkontrolle der PCR (ohne Template)*
- Spur 2: 5 µL Positivkontrolle der ARMS-PCR von E. coli WT*
- Spur 3: 5 µL Negativkontrolle der ARMS-PCR von E. coli MIVa*
- Spur 4: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #1*
- Spur 5: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #2*
- Spur 6: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #3*
- Spur 7: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #4*
- Spur 8: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #5*
- Spur 9: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #6*
- Spur 10: 1 µL Größenmarker (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder)*
- Spur 11: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #13*
- Spur 12: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #14***
- Spur 13: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #15*
- Spur 14: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #16*
- Spur 15: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #17*
- Spur 16: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #18*

Neben der Positivkontrolle mit der DNA von *E. coli* WT in Spur 2, welche nur sehr schwach zu erkennen ist, zeigt die ARMS-PCR der CRISPR *clpA*-Mutante #14 in Spur 12 ein Amplifikat (vgl. Markierung in Abbildung 10.5–4). Die Ergebnisse der im Anschluss erfolgten Sanger-Sequenzierung dieser Mutante sind in Kapitel 10.3.2.1 aufgezeigt.

10.5.2.2 Indirekte Mutagenese über die Zwischenstufe der *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14

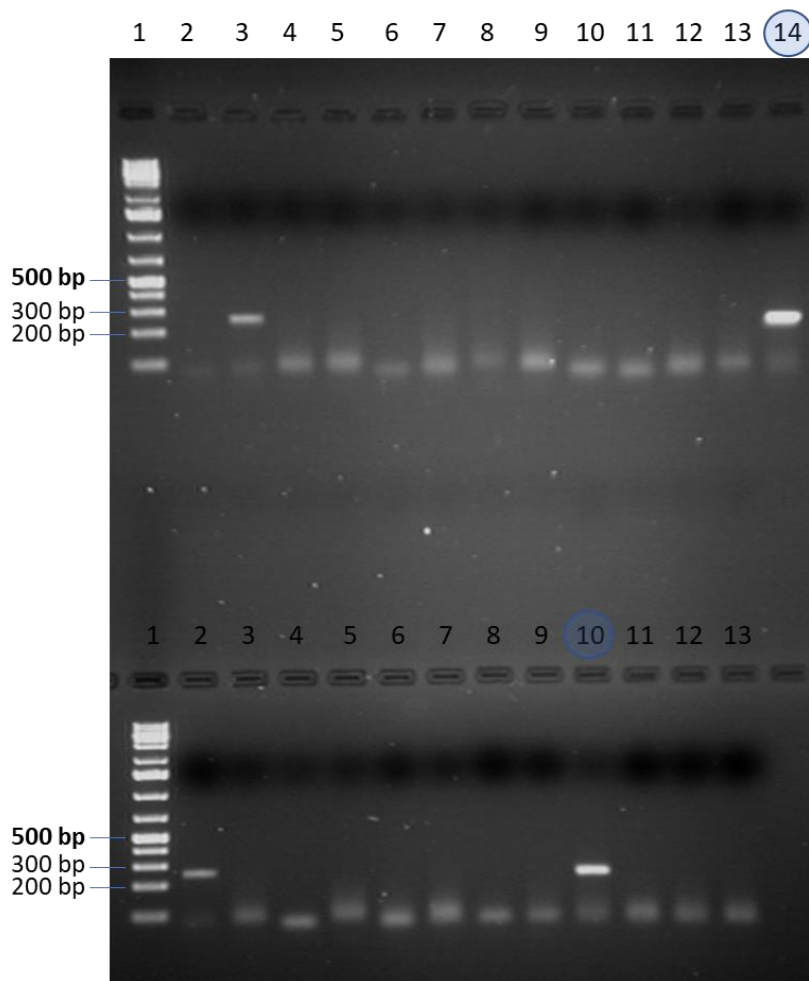


Abbildung 10.5–5: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der *clpA*-Mutation

Dargestellt ist ein 100 mL großes Agarosegel mit einer Agarosekonzentration von 1,6 %, welches für 600 ms mit UV-Licht belichtet und fotografiert wurde. Zur Herstellung des Agarosegels sowie als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 0,5-fach konzentrierter TAE-Puffer verwendet. Das Gel wurde direkt mit 1 μ L einer einprozentigen Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die Elektrophorese erfolgte für 35 Minuten bei 130 V (79 mA). Für die PCR wurden die Oligonukleotide *clpA*_5_1462_EcoWT und *clpA*_3_1713_EcoWT_ARMS_weak genutzt (vgl. Tabelle 8.1–3). Wenn ein Amplifikat entsteht, wird eine Größe von 252 bp erwartet. Folgendes Auftragsschema liegt dem Agarosegel zugrunde:

Obere Reihe:

Spur 1: 1 μ L Größenmarker (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder)

Spur 2: 5 μ L Negativkontrolle der PCR (ohne Template)

Spur 3: 5 μ L Positivkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* WT

Spur 4: 5 μ L Negativkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14

Spur 5: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #1

Spur 6: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #2

Spur 7: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #3

Spur 8: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #4

Spur 9: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #5

Spur 10: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #6

Spur 11: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #7

Spur 12: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #8

Spur 13: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #9

Spur 14: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #10

Untere Reihe:

Spur 1: 1 µL Größenmarker (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder)

Spur 2: 5 µL Positivkontrolle der ARMS-PCR von E. coli WT

Spur 3: 5 µL Negativkontrolle der ARMS-PCR von E. coli MIVa clpA (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14

Spur 4: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #31

Spur 5: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #32

Spur 6: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #33

Spur 7: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #34

Spur 8: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #35

Spur 9: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #36

Spur 10: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #37

Spur 11: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #38

Spur 12: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #39

Spur 13: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR clpA-Mutante #40

Neben der Positivkontrolle mit der DNA von *E. coli* WT in Spur 3 in der oberen Reihe bzw. in Spur 2 in der unteren Reihe zeigt die ARMS-PCR der CRISPR *clpA*-Mutante #10 in Spur 14 in der oberen Reihe bzw. die ARMS-PCR der CRISPR *clpA*-Mutante #37 in Spur 10 in der unteren Reihe ein Amplifikat (vgl. Markierung in Abbildung 10.5–5). Die Ergebnisse der im Anschluss erfolgten Sanger-Sequenzierung der beiden Mutanten sind in Kapitel 10.3.2.2 aufgezeigt.

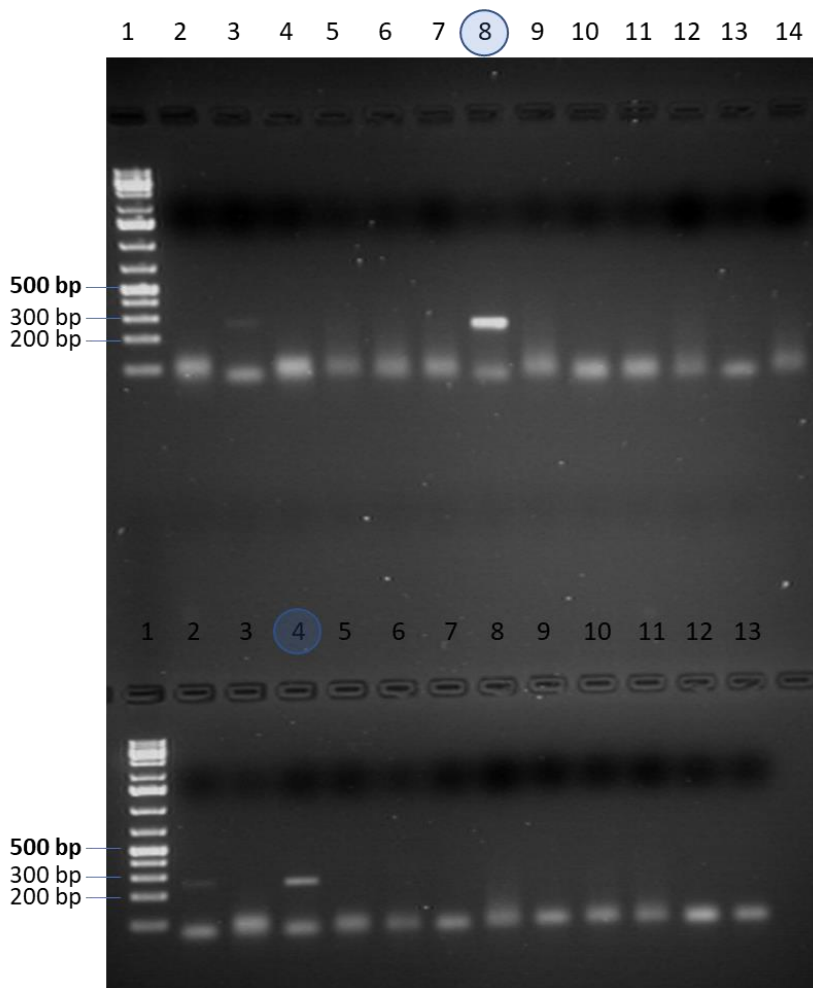


Abbildung 10.5–6: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der *clpA*-Mutation

Dargestellt ist ein 100 mL großes Agarosegel mit einer Agarosekonzentration von 1,6 %, welches für 520 ms mit UV-Licht belichtet und fotografiert wurde. Zur Herstellung des Agarosegels sowie als Lauffpuffer für die Elektrophorese wurde 0,5-fach konzentrierter TAE-Puffer verwendet. Das Gel wurde direkt mit 1 μ L einer einprozentigen Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die Elektrophorese erfolgte für 25 Minuten bei 130 V (76 mA). Für die PCR wurden die Oligonukleotide *clpA*_5_1462_EcoWT und *clpA*_3_1713_EcoWT_ARMS_weak genutzt (vgl. Tabelle 8.1–3). Wenn ein Amplifikat entsteht, wird eine Größe von 252 bp erwartet. Folgendes Auftragungsschema liegt dem Agarosegel zugrunde:

Obere Reihe:

Spur 1: 1 μ L Größenmarker (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder)

Spur 2: 5 μ L Negativkontrolle der PCR (ohne Template)

Spur 3: 5 μ L Positivkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* WT

Spur 4: 5 μ L Negativkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* MIVA *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14

Spur 5: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #101

Spur 6: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #102

Spur 7: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #103

Spur 8: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #104

Spur 9: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #105

Spur 10: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #106

Spur 11: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #107

Spur 12: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #108

Spur 13: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #109

Spur 14: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #110

Untere Reihe:

Spur 1: 1 μ L Größenmarker (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder)

Spur 2: 5 µL Positivkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* WT

Spur 3: 5 µL Negativkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* MIVa *clpA* (1696delA, 1701_1702insA) CRISPR-Mutante #14

Spur 4: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #111

Spur 5: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #112

Spur 6: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #113

Spur 7: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #114

Spur 8: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #115

Spur 9: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #116

Spur 10: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #117

Spur 11: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #118

Spur 12: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #119

Spur 13: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #120

Neben der Positivkontrolle mit der DNA von *E. coli* WT in Spur 3 in der oberen Reihe bzw. in Spur 2 in der unteren Reihe zeigt die ARMS-PCR der CRISPR *clpA*-Mutante #104 in Spur 8 in der oberen Reihe bzw. die ARMS-PCR der CRISPR *clpA*-Mutante #111 in Spur 4 in der unteren Reihe ein Amplifikat (vgl. Markierung in Abbildung 10.5–6). Die Ergebnisse der im Anschluss erfolgten Sanger-Sequenzierung der beiden Mutanten sind in Kapitel 10.3.2.2 aufgezeigt.

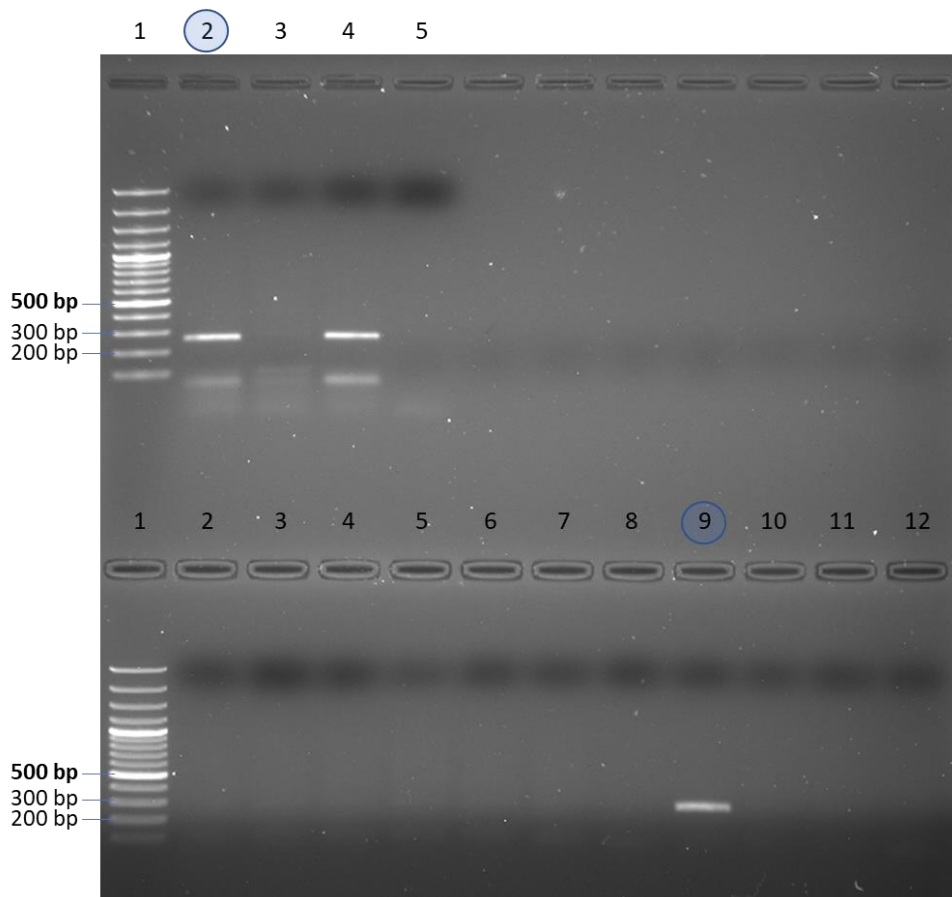
10.5.3 Mutagenese von *E. coli* MIII mit der *clpA*-Mutation aus *E. coli* MIVa

Abbildung 10.5–7: Agarosegel der ARMS-PCR zur Detektion der *clpA*-Mutation

Dargestellt ist ein 100 mL großes Agarosegel mit einer Agarosekonzentration von 1,2 %, welches mit UV-Licht belichtet und fotografiert wurde. Zur Herstellung des Agarosegels sowie als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 0,5-fach konzentrierter TAE-Puffer verwendet. Das Gel wurde direkt mit 1 μ L einer einprozentigen Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die Elektrophorese erfolgte für 40 Minuten bei 140 V. Für die PCR wurden die Oligonukleotide *clpA_5_1462_EcoWT* und *clpA_3_1721_EcoMIVa_ARMS* genutzt (vgl. Tabelle 8.1–3). Wenn ein Amplifikat entsteht, wird eine Größe von 260 bp erwartet. Folgendes Auftragsschema liegt dem Agarosegel zugrunde:

Obere Reihe:

Spur 1: 2 μ L Größenmarker (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder)

Spur 2: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #54

Spur 3: 5 μ L Negativkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* MIII

Spur 4: 5 μ L Positivkontrolle der ARMS-PCR von *E. coli* MIVa

Spur 5: 5 μ L Negativkontrolle der PCR (ohne Template)

Untere Reihe:

Spur 1: 2 μ L Größenmarker (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder)

Spur 2: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #35

Spur 3: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #36

Spur 4: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #37

Spur 5: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #38

Spur 6: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #47

Spur 7: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #48

Spur 8: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #49

Spur 9: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #50

Spur 10: 5 μ L Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #51

Spur 11: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #52
 Spur 12: 5 µL Reaktionsansatz der ARMS-PCR der potenziellen CRISPR *clpA*-Mutante #53

Neben der Positivkontrolle mit der DNA von *E. coli* MIVa in Spur 4 in der oberen Reihe zeigt die ARMS-PCR der CRISPR *clpA*-Mutante #54 in Spur 2 in der oberen Reihe bzw. die ARMS-PCR der CRISPR *clpA*-Mutante #50 in Spur 9 in der unteren Reihe ein Amplifikat (vgl. Markierung in Abbildung 10.5–7). Die Ergebnisse der im Anschluss erfolgten Sanger-Sequenzierung der Mutante #50 sind in Kapitel 10.3.3 aufgezeigt.

10.6 Rohdaten der quantitativen *real-time* PCR (RT-qPCR)

10.6.1 Expressionsanalysen zur Untersuchung der Auswirkungen der *clpA*-Mutation auf das MazEF Antitoxin-Toxin System

Im Folgenden sind die Ct-Werte der quantitativen *real-time* PCR (RT-qPCR) als Rohdaten aufgeführt, welche der Berechnung der relativen Genexpression in Kapitel 5.6 zugrunde liegen. In der Tabelle 10.6–1 sind die Ct-Werte für die Gene *dnaQ*, *rplJ* 1, *rplJ* 2, *rplL*, *rpoB* und *rpoC* jeweils für die vier Bakterienstämme bzw. Mutanten *E. coli* WT, *E. coli* MIII, *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa und in der Tabelle 10.6–2 sind die Ct-Werte für die Gene *dnaQ*, *rplJ* 1 und *upp* jeweils für den Bakterienstamm *E. coli* WT und die Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 angegeben. Außerdem wurde jeweils für alle Bakterienstämme bzw. Mutanten die NAC (*no amplification control*) mit aufgeführt. Bei der Angabe „undetermined“ war das Signal in der RT-qPCR zu schwach, um einen Wert zu bestimmen. Es handelt sich dabei um den Idealfall.

Tabelle 10.6–1: Ct-Werte der quantitativen *real-time* PCR (RT-qPCR) (Rohdaten)

Gen	<i>E. coli</i> Bakterienstamm bzw. Mutante		
	1. biologische Probe	2. biologische Probe	3. biologische Probe
<i>dnaQ</i>	WT		
	23,813	24,532	24,713
	MIII		
	24,807	25,496	24,793
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	24,777	25,190	24,958
<i>rplJ</i> 1	MIVa		
	25,787	26,135	26,246
	WT		
<i>rplJ</i> 1	15,173	15,381	15,708
	MIII		
<i>rplJ</i> 1	16,446	16,556	15,997

	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	17,150	17,215	16,678
	MIVa		
	17,844	18,338	17,682
<i>rplJ 2</i>	WT		
	16,956	17,286	17,498
	MIII		
	18,199	18,611	17,799
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	18,551	18,966	18,252
	MIVa		
	19,530	20,231	19,585
<i>rplL</i>	WT		
	16,990	17,323	17,783
	MIII		
	18,232	18,732	18,046
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	18,507	19,003	18,363
<i>rpoB</i>	MIVa		
	19,060	19,742	19,175
	WT		
	18,666	18,937	18,925
	MIII		
	19,032	18,889	18,899
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	19,422	19,293	19,324
<i>rpoC</i>	MIVa		
	18,682	18,970	18,486
	WT		
	18,564	18,425	18,862
	MIII		
	18,446	18,354	18,747
<i>NAC</i>	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	18,968	18,366	19,066
	MIVa		
	18,282	18,580	18,139
	WT		
	35,130	undetermined	36,267
<i>NAC</i>	MIII		
	undetermined	35,479	undetermined
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	undetermined	undetermined	undetermined
	MIVa		
undetermined	undetermined	38,001	

Tabelle 10.6–2: Ct-Werte der quantitativen real-time PCR (RT-qPCR) (Rohdaten)

Gen	<i>E. coli</i> Bakterienstamm bzw. Mutante		
	1. biologische Probe	2. biologische Probe	3. biologische Probe
<i>dnaQ</i>	WT		
	23,993	24,441	24,447
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	24,262	24,809	24,344
<i>rplJ 1</i>	WT		
	15,192	15,461	15,152
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	15,901	15,680	15,304
<i>upp</i>	WT		
	19,179	19,442	19,342
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	19,579	19,652	24,782
NAC	WT		
	35,429	undetermined	undetermined
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	36,582	35,770	undetermined

10.6.2 Expressionsanalysen zur Untersuchung der Auswirkungen der *clpA*-Mutation im Zusammenhang mit ROS

Im Folgenden sind die Ct-Werte der quantitativen *real-time* PCR (RT-qPCR) als Rohdaten aufgeführt, welche der Berechnung der relativen Genexpression in Kapitel 5.7 zugrunde liegen. In der Tabelle 10.6–3 sind die Ct-Werte für die Gene *dnaQ*, *clpX*, *katE*, *katG*, *ahpC*, *ahpF*, *dps*, *acnB* und *sdhC* jeweils für die fünf Bakterienstämme bzw. Mutanten *E. coli* WT, *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12, *E. coli* MIII, *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12 und *E. coli* MIVa angegeben. Außerdem wurde jeweils für alle Bakterienstämme bzw. Mutanten die NAC (*no amplification control*) mit aufgeführt. Bei der Angabe „undetermined“ war das Signal in der RT-qPCR zu schwach, um einen Wert zu bestimmen. Es handelt sich dabei um den Idealfall.

Tabelle 10.6–3: Ct-Werte der quantitativen real-time PCR (RT-qPCR) (Rohdaten)

Gen	<i>E. coli</i> Bakterienstamm bzw. Mutante		
	1. biologische Probe	2. biologische Probe	3. biologische Probe
<i>dnaQ</i>	WT		
	23,993	24,441	24,447
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	24,262	24,809	24,344
	MIII		
	24,975	25,496	24,730
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	24,598	25,194	24,679

	MIVa		
	25,843	25,876	25,786
<i>clpX</i>	WT		
	20,799	21,324	21,176
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	20,867	20,750	20,980
	MIII		
	21,030	21,236	21,102
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	20,856	20,868	21,142
	MIVa		
21,122	21,665	20,794	
<i>katE</i>	WT		
	28,310	28,982	28,051
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	28,129	27,961	27,891
	MIII		
	26,574	27,664	27,402
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	26,761	27,608	27,385
	MIVa		
26,378	27,340	26,547	
<i>katG</i>	WT		
	23,980	24,497	23,749
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	24,191	24,192	23,549
	MIII		
	24,848	25,487	25,036
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	24,681	24,531	25,044
	MIVa		
25,533	26,704	25,812	
<i>ahpC</i>	WT		
	20,257	20,305	19,373
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	20,412	19,547	19,592
	MIII		
	19,953	20,420	20,180
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	20,088	20,600	19,960
	MIVa		
20,592	21,289	20,568	
<i>ahpF</i>	WT		
	22,739	22,997	22,848
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	22,889	23,072	22,900
	MIII		
22,977	23,865	23,034	

Anhang

	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	23,001	23,956	23,106
	MIVa		
	23,224	24,154	23,372
<i>dps</i>	WT		
	28,194	28,481	27,672
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	28,366	27,967	27,198
	MIII		
	28,033	29,187	28,186
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	27,827	28,722	27,916
	MIVa		
28,750	30,214	29,208	
<i>acnB</i>	WT		
	20,984	20,735	21,269
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	21,151	20,863	21,322
	MIII		
	20,980	21,018	20,567
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	21,224	21,059	21,064
	MIVa		
20,351	20,957	20,592	
<i>sdhC</i>	WT		
	21,849	19,806	22,006
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	22,246	19,854	22,681
	MIII		
	20,329	19,682	19,782
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	21,067	20,228	20,964
	MIVa		
19,242	19,627	19,389	
<i>NAC</i>	WT		
	35,429	undetermined	undetermined
	WT ClpA-Ala569Argfs*12		
	36,582	35,770	undetermined
	MIII		
	36,642	38,069	undetermined
	MIII ClpA-Ala569Argfs*12		
	undetermined	undetermined	undetermined
	MIVa		
undetermined	35,780	36,918	

10.7 Rohdaten der Bestimmung des Superspiralisierungsgrades über den Qsc-Wert

In den folgenden Tabellen sind die Rohdaten der Lumineszenz-Messungen zur Bestimmung des Superspiralisierungsgrades über den Qsc-Wert aufgeführt, die dem Kapitel 5.8 zugrunde liegen. Dazu zählen die absoluten Werte der RLU (*relative light units*) und die Werte der einzelnen leeren Kavitäten der Mikrotiterplatte vor der Reagenzienzugabe (= Blank), welche mit dem Mithras LB 940 von der Firma Berthold Technologies GmbH & Co. KG ermittelt wurden. Außerdem wurde in den folgenden Tabellen der jeweilige Wert der OD_{600 nm} zum Zeitpunkt der Zellernte ergänzt. Von allen vermessenen Bakterienstämmen bzw. Mutanten wurden jeweils drei voneinander unabhängige biologische Proben bestimmt. In der Tabelle 10.7–1 sind die Rohdaten der Referenzstämme *E. coli* JTT1, *E. coli* RS2, *E. coli* WT und *E. coli* WT-3-1 jeweils mit den Plasmiden pPHB90 bzw. pPHB91 zu entnehmen. In der Tabelle 10.7–2 sind die Daten für den Stamm *E. coli* WT und die CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12 und in der Tabelle 10.7–3 für den Bakterienstamm *E. coli* WT und die Mutanten *E. coli* MIII, *E. coli* MIVa und *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12, auch jeweils mit den Plasmiden pPHB90 bzw. pPHB91, aufgeführt.

Tabelle 10.7–1: Rohdaten der Lumineszenz-Messung der Referenzstämme

<i>E. coli</i> Bakterienstamm bzw. Mutante	Biologische Probe	RLU (<i>relative light units</i>)	Blank	OD _{600 nm}
JTT1 pPHB90	1	1249186	105	0,4329
	2	86378437	308	0,4159
	3	89398600	284	0,4146
JTT1 pPHB91	1	402709	97	0,4340
	2	39746085	316	0,3954
	3	39392222	324	0,4171
RS2 pPHB90	1	674060	105	0,3956
	2	67846273	381	0,4006
	3	64196771	276	0,3927
RS2 pPHB91	1	119121	89	0,4072
	2	13299373	235	0,4280
	3	12923068	219	0,4049
WT pPHB90	1	397936	113	0,4153
	2	29835853	259	0,4314
	3	33058963	292	0,4369
WT pPHB91	1	252167	73	0,4226
	2	20687016	340	0,4451
	3	20296317	300	0,4299
WT-3-1 pPHB90	1	335806	89	0,4027
	2	25593079	332	0,4504
	3	27127514	276	0,4402

Anhang

WT-3-1 pPHB91	1	245270	113	0,4292
	2	20258209	365	0,4245
	3	19644302	316	0,4173

Tabelle 10.7–2: Rohdaten der Lumineszenz-Messung der CRISPR-Mutante *E. coli* WT ClpA-Ala569Argfs*12

<i>E. coli</i> Bakterienstamm bzw. Mutante	Biologische Probe	RLU (<i>relative light units</i>)	Blank	OD _{600 nm}
WT pPHB90	1	34463182	373	0,4065
		36728264	340	
	2	37639416	243	0,4213
		42090916	300	
	3	37039473	259	0,4065
		41495957	292	
WT pPHB91	1	20902955	308	0,4124
		22968290	340	
	2	23020930	259	0,3914
		25188797	219	
	3	28753240	227	0,4138
		28931963	219	
WT ClpA-Ala569Argfs*12 pPHB90	1	30683626	308	0,3911
	2	34239114	267	0,4377
	3	33557347	300	0,4125
WT ClpA-Ala569Argfs*12 pPHB91	1	22743047	292	0,4121
	2	22668785	227	0,4117
	3	24031719	259	0,4070

Tabelle 10.7–3: Rohdaten der Lumineszenz-Messung der CRISPR-Mutante *E. coli* MIII ClpA-Ala569Argfs*12

<i>E. coli</i> Bakterienstamm bzw. Mutante	Biologische Probe	RLU (<i>relative light units</i>)	Blank	OD _{600 nm}
WT pPHB90	1	34463182	373	0,4065
		36728264	340	
	2	37639416	243	0,4213
		42090916	300	
	3	37039473	259	0,4065
		41495957	292	
WT pPHB91	1	20902955	308	0,4124
		22968290	340	
	2	23020930	259	0,3914
		25188797	219	
	3	28753240	227	0,4138
		28931963	219	

MIII pPHB90	1	58960243	235	0,4194
	2	59046120	243	0,4069
	3	67716064	219	0,3979
MIII pPHB91	1	39951950	267	0,4203
	2	44613391	284	0,4143
	3	44451607	251	0,4130
MIVa pPHB90	1	50480319	227	0,4011
	2	58370002	243	0,4052
	3	45466708	267	0,3966
MIVa pPHB91	1	36949990	292	0,4012
	2	39872046	251	0,4045
	3	40266003	186	0,4024
MIII ClpA- Ala569Argfs*12 pPHB90	1	73080118	284	0,4125
	2	73856733	227	0,4226
	3	75923195	211	0,4121
MIII ClpA- Ala569Argfs*12 pPHB91	1	42709759	276	0,4375
	2	42900014	284	0,4269
	3	46594188	276	0,4184

11 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei all den liebevollen Menschen bedanken, die mich während meiner Zeit als Promotionsstudentin unterstützt haben und es mir damit ermöglichten diese Dissertation anzufertigen.

Insbesondere danke ich Ihnen, Prof. Dr. Peter Heisig, für die Möglichkeit diese Dissertation in Ihrem Arbeitskreis erstellen zu dürfen und mir dieses spannende und interessante Thema zu überlassen. Immer empfand ich eine freundliche Atmosphäre und schätzte die fachliche und konstruktive Unterstützung während Ihrer Betreuung meiner Arbeit oder fernab bei einem kleinen Plausch über den Apothekenalltag. Doch wie kam es dazu, dass ich diesen Weg der Promotion eingeschlagen habe. Nicht zuletzt erfreue ich mich darüber, wenn Sie, Frau Dr. Anke Heisig, von Zeit zu Zeit sagten: „Eigentlich wollte Alina nicht promovieren. Doch dann gefiel ihr die molekularbiologische Arbeit bei uns im Labor so sehr, dass sie blieb.“ Angefangen hat meine Zeit bei Ihnen im Arbeitskreis bereits 2013 während meines Pharmaziestudiums mit dem dreiwöchigen Wahlpflichtpraktikum mit Nina Vogelhubert bei Hans-Peter Sfeir. Hier wurde ich schon so freundlich empfangen und erhielt bereits viele Einblicke in die molekularbiologische Arbeit. Zu dem Zeitpunkt boten Sie mir schon die Möglichkeit an, mein sechsmonatiges Praktikum als PhiP (Pharmazeut im Praktikum) während meiner praktischen Ausbildung zur Apothekerin bei Ihnen zu absolvieren. So kam ich also 2015 als PhiP und wurde von Ihnen, Frau Dr. Anke Heisig, und den technischen Assistentinnen Gudrun Melles und Julia Lahnert wunderbar in das molekularbiologische Arbeiten eingearbeitet. Frau Dr. Anke Heisig, vielen Dank für Ihre wissenschaftliche Expertise, Ihre zahlreichen Ratschläge und Ihre hilfreichen Denkanstöße. Besonders danken möchte ich in dem Zuge auch bereits Antje Schnasse, die sich zu der Zeit gerade noch in Elternzeit befand, und Philipp Groth, der kurz nach meiner PhiP-Zeit als frisch ausgebildeter BTA eingestellt wurde. Bei methodischen Angelegenheiten und auch bei der Unterstützung einiger Experimente konnte ich mich in der ganzen Promotionszeit immer auf euch alle verlassen. Vielen Dank! Bei Sabine Badziong möchte ich mich für ihre organisatorische und verwaltungstechnische Unterstützung recht herzlich bedanken.

So kam ich dann, nach meiner Approbation als Apothekerin, zurück in den Arbeitskreis und gefühlt war ich gar nicht weg gewesen, als ich dann 2016 meine Promotion starten durfte. Ich zog in das Doktorandenlabor in U15 ein und erlebte dort eine großartige Zeit mit Deike Rönfeldt und Greta Gulbins. Ein großer Dank gilt euch beiden. Wir hatten ein super Miteinander komplett ohne Konkurrenzdenken, was ich sehr schätzte. Danke für das stetige gegenseitige Unterstützen und Motivieren, auch wenn ein Laborversuch mal nicht auf Anhieb so funktionierte, wie gewünscht. Liebe Greta, dich hat es mittlerweile nach Irland verzogen, aber ich freue mich für dich, dass du dir damit einen Wunsch

erfüllen konntest. Liebe Deike, du bist nun in Schweden und die Entfernung ist schon beachtlich, aber ich freue mich sehr, dass wir den Kontakt halten und du mich von dort immer unterstützt und motivierst. Danke, dass aus Kolleginnen Freundinnen wurden und die Freundschaften über die Landesgrenzen hinweg halten.

Ein großes Dankeschön geht generell an alle Mitglieder des Arbeitskreises, auch an die Ehemaligen und die nur zwischenzeitlich angestellten Kollegen und Kolleginnen für die schöne Zusammenarbeit und die großartige Zeit.

Vielen Dank für die Möglichkeit Claudia Cano während ihres Forschungspraktikums zu betreuen, in dem sie mich bei Teilprojekten mit dem CRISPR/Cas9-System unterstützte. Liebe Claudia, ich freue mich sehr, dass wir auch lange nach dem Forschungspraktikum und deiner Zeit als Masterandin im AK Heisig noch den Kontakt pflegen. Vielen Dank für deine motivierenden Worte, für deine Anteilnahme an meinem Laboralltag und für deine genialen peruanischen Kochkünste.

Außerdem möchte ich dir, liebe Caroline Opelt, für dein ständiges liebevolle und positive Triezen und deinen, dadurch erreichten, Ansporn danken, wodurch du mich enorm motiviert hast. Vielen Dank, dass wir nach einer kleinen „Warmwerden“-Phase aufgrund meiner norddeutschen Art das Vertrauen aufbauen konnten und zu Freundinnen wurden. Vielen Dank für den vertrauensvollen Austausch sämtlicher Probleme auch fernab des Laboralltags und dafür, dass wir neben ernsteren Themen auch immer sehr gut und sehr viel lachen können. Das schätze ich sehr.

Außerdem geht ein großes Dankeschön an Phyllis Zimmermann, meiner liebsten Apothekerin-Kollegin im Arbeitskreis. Liebe Phyllis, vielen Dank für deine lieben Worte, deine stetige Motivation und deine Begeisterung an meiner Arbeit. Danke auch für die Unterstützung im Apothekenalltag und dem regen Austausch über dortige Besonderheiten oder Vorkommnisse.

Meinen lieben Kollegen und Kolleginnen aus der Walddörfer Apotheke (Hamburg Volksdorf) und aus der Lotus-Apotheke (Hamburg Barmbek-Nord) möchte ich für den abwechslungsreichen Alltag fernab vom Labor danken. Mich erfreute es immer, wenn ihr mich montags und samstags gerne allgemein etwas zu *Escherichia coli* befragt habt und immer fasziniert wart.

Vielen Dank auch meinen Freundinnen, vor allem Bianca Tonn, Dagmar Schlüter, Nina Vogelhubert und Stefanie Fricke, für euer Interesse an meinem Laboralltag und das Mitfühlen beim Fertigstellen meiner Dissertation.

Liebe Julia Wilke, du machtest mit mir 2010 am Gymnasium Marianum Meppen das Abitur und seitdem halten wir den Kontakt, auch weil wir einen ähnlichen akademischen Werdegang haben. Vielen Dank, dass wir uns über das Leben als Promotionsstudent austauschen konnten und viele Gemein-

Danksagung

samkeiten entdecken konnten, auch wenn dein Thema zur Musikpädagogik nicht unterschiedlicher zu meinem sein konnte. Deine Disputation im letzten Jahr hat mir einen Ansporn für den Endspurt zur Fertigstellung meiner Arbeit gegeben. Vielen Dank!

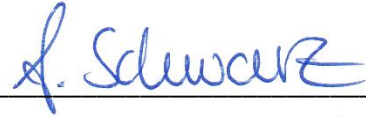
Ein besonderer Dank geht natürlich auch an dich, lieber Nils! Deine liebevollen Neckereien, wenn du mit einem Zwinkern sagtest „Ich glaube nicht, dass du noch fertig wirst“ waren eine große Motivation für mich, meine Dissertation zu schreiben und mich jeden Tag wieder daran zu setzen, ein Kapitel zu ergänzen oder an kleineren Details zu feilen. Denn ich weiß und konnte darauf bauen, dass du vollkommen hinter mir stehst und an mich glaubst. Vielen Dank für deine stetige Unterstützung und dafür, dass du mir den Rücken freigehalten hast, wenn es einmal wieder etwas stressiger wurde. Vielen lieben Dank!

Mein größter Dank gilt meinen Eltern! Euch ist diese Arbeit auch gewidmet, da ich euch so viel zu verdanken habe. Ihr habt mir alle Steine aus dem Weg geräumt und mich in jeder Hinsicht, auch finanziell, unterstützt, sodass ich meine Chance nutzen und letztendlich meinen Traum erfüllen konnte. Das schätze ich sehr und werde ich nie vergessen. Die wunderbare und ständige Unterstützung all die Jahre. Ihr habt immer zu einhundert Prozent an mich geglaubt. Ich bin euch so unendlich dankbar! Vielen lieben Dank!

12 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Hamburg, den 02. Juni 2023



Alina Schwarz