

Philipps



Universität
Marburg

**Konstruktion, Charakterisierung und Optimierung des
synthetischen, sekundären Chromosoms synVicII in**

Escherichia coli

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich der Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

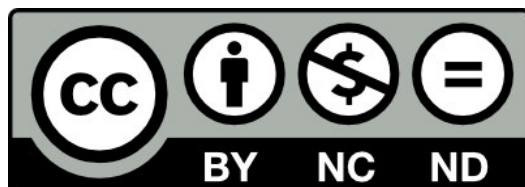
Diplom-Biologin

Sonja Messerschmidt

aus Schorndorf

Marburg, November 2016

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juli 2012 bis November 2016 am LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie in Marburg unter Leitung von Prof. Dr. T. Waldminghaus durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. T. Waldminghaus

Zweitgutachter: Dr. L. Randau

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2016

Die in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse sind in den folgenden Originalpublikationen enthalten:

Messerschmidt, S.J., Kemter, F.S., Schindler, D. and Waldminghaus, T., 2015. Synthetic secondary chromosomes in *Escherichia coli* based on the replication origin of chromosome II in *Vibrio cholerae*. Biotechnol J. 10, 302-14.

Messerschmidt, S.J., Schindler, D., Zumkeller, C.M., Kemter, F.S., Schallopp, N. and Waldminghaus, T., 2016. Optimization and characterization of the synthetic secondary chromosome synVicII in *Escherichia coli*. Front. Bioeng. Biotechnol. In revision

Eine weitere während der Promotion verfasste Originalpublikation, welche nicht Gegenstand dieser Dissertation ist, lautet:

Messerschmidt, S.J. and Waldminghaus, T., 2014. Dynamic organization: chromosome domains in *Escherichia coli*. J Mol Microbiol Biotechnol. 24, 301-15.

Inhaltsverzeichnis

1. Summary	1
2. Zusammenfassung	3
3. Einleitung	5
3.1 Synthetische Chromosomen	5
3.1.1 Definition eines synthetischen Chromosoms.....	5
3.1.2 Weshalb sollen synthetische Chromosomen konstruiert werden?	5
3.1.3 Zwei Beispiele für DNA-Assemblierungstechniken für die Konstruktion synthetischer Chromosomen	6
3.1.3 Bakterielle und eukaryotische synthetische Chromosomen.....	8
3.2 Sekundäre Chromosomen in Bakterien	10
3.2.1 <i>oriC</i> -Minichromosomen in <i>Escherichia coli</i>	11
3.2.2 Chromosomenumstrukturierungen	13
3.3 <i>Vibrio cholerae</i> als multi-chromosomaler Modellorganismus	15
3.3.1 Aufbau des Replikationsursprungs <i>oril</i>	15
3.3.2 Aufbau des <i>V. cholerae</i> Replikationsursprungs <i>orill</i> und Regulation der Initiation der DNA-Replikation.....	16
3.3.3 Zellzyklus-spezifische DNA-Replikation in <i>V. cholerae</i>	18
3.3.4 DNA-Replikation in <i>Vibrionaceae</i>	19
4. Ziele dieser Arbeit	21
5. Ergebnisse	23
5.1 Synthetic secondary chromosomes in <i>Escherichia coli</i> based on the replication origin of chromosome II in <i>Vibrio cholerae</i>	24
5.2 Optimization and characterization of the synthetic secondary chromosome synVicII in <i>Escherichia coli</i>	27
6. Diskussion	31
6.1 Das sekundäre, synthetische Chromosom synVicII	31
6.1.1 Repliziert synVicII Zell-zyklus spezifisch?.....	34
6.1.2 synVicII und seine Verwendung als Chromosomentestmodell	37
6.2 Ist synVicII in der Biotechnologie einsetzbar?	38
6.2.1 Wie modulierbar sind die DNA-Replikationseigenschaften von synVicII?	39
6.2.1.1 Verbesserung der Stabilität durch den Einbau von stabilisierenden DNA-Sequenzen .	42
6.2.1.2 Verbesserung der Stabilität durch den Einbau von stabilisierenden DNA-Sequenzen auf dem <i>Escherichia coli</i> Chromosom.....	45
6.2.2 Ist synVicII in andere Organismen als <i>Escherichia coli</i> übertragbar?	46

6.3 Untersuchung der Diversität der DNA-Replikation von verschiedenen <i>Vibrio</i> Spezies	50
7. Literaturverzeichnis	53

1. Summary

Synthetic secondary chromosomes are valuable tools to study chromosome maintenance systems. Important construction rules for synthetic chromosomes can be derived from their design, assembly and characterization. Furthermore, synthetic secondary chromosomes can be used to genetically modify microorganisms for biotechnology. For all applications, it is important that the synthetic secondary replicon employed is well described and characterized.

In this work the synthetic secondary chromosome synVicII was established and characterized in the monochromosomal bacterium *E. coli*. The natural occurring secondary chromosome II of *Vibrio cholerae*, a bacterium which possesses two different sized chromosomes, was used as template for synVicII. The replication origin of *V. cholerae* chromosome II *orIII*, the initiator gene *rctB* and the specific chromosome II segregation system *parABII* were successfully integrated into synVicII. Transformation of synVicII proved that the synthetic secondary chromosome is able to replicate in *E. coli*. For the efficient assembly, modification and transfer of synVicII, different elements were inserted in synVicII: For example, an integrated *oriT* allows the conjugal transfer of synVicII, a yeast replication origin and a selection marker allows the assembly in yeast and a Flp-FRT-cassette allows the removal of elements only needed for construction after transfer to final strain. SynVicII was developed to be compatible with ModularCloning, which allows the fast and efficient integration of new DNA sequences.

In the second part of this work synVicII was investigated regarding typical chromosome characteristics such as stability, copy number and genetic integrity. With a newly developed flow-cytometry based stability assay it was shown that synVicII is more stable than an *oriC*-based replicon, synEsc. A plate counting test confirmed these results and further demonstrated that synVicII is more unstable than a 100 % stable synF-plasmid. With a developed directed evolution experiments, new stable synVicII variants were identified. synVicII revealed in *E. coli* a comparable low copy number relative to *oriC*, the replication origin of the *E. coli* chromosome, which was shown by qPCR and microarray analysis. Copy number analysis also indicated that synVicII replicates in *E. coli* similarly to chromosome II in *V. cholerae*. Thus, synVicII probably starts DNA replication later than the *E. coli* chromosome. Southern Blot experiments demonstrated that synVicII in comparison to synEsc does not integrate into the *E. coli* chromosome.

Besides secondary chromosomes, tertiary chromosomes could also be applied in biotechnology. Therefore, the diversity of secondary chromosomes of *Vibrionaceae* was investigated. Marker frequency analysis indicated that the eleven analyzed members of *Vibrionaceae* initiate DNA replication of the secondary chromosomes later than that of the primary chromosome; replication of both chromosomes is terminated simultaneously. Nine new synthetic secondary chromosomes with

different *Vibrionaceae* replication origins were assembled and their potential as tertiary chromosome was initially tested. Conjugation experiments showed that all used *Vibrionaceae* replication origins are not compatible with each other.

Taken together and based on the characteristics so far, synVicII revealed great potential to be applied in basic research and biotechnology.

2. Zusammenfassung

Synthetische, sekundäre Chromosomen sind ein wertvolles Werkzeug, um Chromosomenorganisationssysteme zu untersuchen. Anhand ihres Designs, ihrer Assemblierung und ihrer Charakterisierung können auch wichtige Konstruktionsregeln für synthetische Chromosomen abgeleitet werden. In der Biotechnologie könnten außerdem synthetische, sekundäre Chromosomen genutzt werden, um Mikroorganismen genetisch zu verändern. Für alle Anwendungen ist es wichtig, dass das verwendete synthetische, sekundäre Replikon gut charakterisiert und beschrieben worden ist.

In dieser Arbeit wurde das synthetische, sekundäre Chromosom synVicII im monochromosomalen Bakterium *Escherichia coli* etabliert und charakterisiert. Als Vorbild für synVicII diente das natürlich vorkommende sekundäre Chromosom II von *Vibrio cholerae*, einem Bakterium, welches zwei unterschiedlich große Chromosomen besitzt. So wurden der Replikationsursprung des zweiten *V. cholerae* Chromosoms *oriII*, das Initiatorgen *rctB* und das eigene Chromosomen II Segregationssystem *parABII* in synVicII integriert. Transformation in *E. coli* bewies, dass synVicII erfolgreich in *E. coli* replizieren kann. Für die effiziente Assemblierung, Modifizierung und den Transfer von synVicII wurden verschiedene Elemente eingebaut: Beispielsweise macht ein integrierter *oriT* synVicII konjugierbar, ein Hefereplikationsursprung und ein Selektionsmarker erlauben die Assemblierung in *S. cerevisiae* und eine Flp-FRT-Kassette erlaubt die Entfernung von nur für die Konstruktion wichtigen Elementen. SynVicII wurde ModularCloning kompatibel entwickelt, sodass schnell und effizient neue DNA-Sequenzen eingebaut werden können. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde synVicII auf wesentliche Charakteristika bakterieller Chromosomen wie die Stabilität, die Kopienzahl und die genetische Integrität untersucht. Mit einem neu entwickelten Durchflusszytometrie-basierten Stabilitätstest konnte gezeigt werden, dass synVicII deutlich stabiler als ein *oriC*-basiertes Replikon, synEsc, ist. Ein Plattentest bestätigte die mit dem neu entwickelten Durchflusszytometrie-basierten Stabilitätstest bestimmte Replikonverlustrate von synVicII. Der Plattentest demonstrierte auch, dass synVicII instabiler als ein 100 % stabiles synF-Plasmid ist. Mit einem neu entwickelten Evolutionsexperiment konnten neue stabilere synVicII-Varianten entwickelt und identifiziert werden. synVicII besitzt in *E. coli* eine vergleichbar niedrige Kopienzahl relativ zu *oriC*, was anhand von qPCR und Microarray-Analysen geklärt werden konnte. Die Kopienzahl-Analyse deutete sogar darauf hin, dass synVicII in *E. coli* ähnlich wie das zweite Chromosom in *V. cholerae* repliziert. Demnach startet synVicII vermutlich später die DNA-Replikation als das *E. coli* Chromosom. Southern Blot Analysen demonstrierten, dass synVicII im Gegensatz zu synEsc nicht in das *E. coli* Chromosom integriert.

Neben sekundären Chromosomen könnten auch noch zusätzlich tertiäre Chromosomen in der Biotechnologie zum Einsatz kommen. Deswegen wurde die Diversität der sekundären Chromosomen von *Vibrionaceae* untersucht. Marker-Frequency-Analysen deuten darauf hin, dass alle sekundären Chromosomen in den 11 untersuchten Vertretern der *Vibrionaceae* die DNA-Replikation später initiieren als das erste Chromosom und beide Chromosomen zusammen terminieren. Neun neue synthetische Chromosomen mit verschiedenen *Vibrionaceae* Replikationsursprüngen wurden assembliert und ihre Eignung als tertiäres Chromosom initial getestet. Mit Konjugationstests wurde demonstriert, dass alle verwendeten *Vibrionaceae* Replikationsursprünge untereinander nicht kompatibel sind.

Zusammengefasst besitzt synVicII mit seinen bisherigen charakterisierten Chromosomeneigenschaften schon großes Potenzial, um in der Grundlagenforschung und Biotechnologie eingesetzt werden zu können.

3. Einleitung

3.1 Synthetische Chromosomen

Um ca. 1865 begründete Georg Mendel die noch heutige gültige Vererbungslehre. Kurze Zeit später prägten Friedrich Miescher und Richard Altmann den Begriff der Nukleinsäure und das Zeitalter der DNA-Analysen begann. Aufgrund fehlender Methoden konnte man keine DNA in großem Maßstab synthetisieren. Heute circa 150 Jahre später ist es tatsächlich möglich, synthetische virale und bakterielle Genome und seit kurzem auch eukaryotische Chromosomen zu assemblieren (Annaluru et al., 2014; Cello et al., 2002; Gibson et al., 2008). Im Zuge der Entwicklung der synthetischen Biologie wurden zahlreiche neue, günstige DNA-Assemblierungstechniken entwickelt, welche die effiziente Assemblierung von großen DNA-Stücken ermöglichen.

3.1.1 Definition eines synthetischen Chromosoms

Wenn man ein modifiziertes Chromosom betrachtet, ist es schwierig zu sagen, ob dieses „nur“ eine Veränderung des Ausgangschromosoms darstellt oder ob es sich um ein neu entwickeltes Chromosom handelt. Deshalb stellt sich die Frage, was ist ein synthetisches Chromosom? Um diese Frage zu beantworten, kann man verschiedene Aspekte wie die Methode, der Inhalt und der Bestandteil des Chromosoms betrachten (Schindler and Waldminghaus, 2015). Analog zu diesen Aspekten haben wir in unserer Arbeitsgruppe drei mögliche Definitionen eines synthetischen Chromosoms entwickelt (Schindler and Waldminghaus, 2015):

1. Ein synthetisches Chromosom ist ein Chromosom, welches aus synthetischen Fragmenten hergestellt wird.
2. Ein synthetisches Chromosom ist ein Chromosom mit fundamentalen anderen Eigenschaften als das natürlich vorkommende Chromosom.
3. Ein synthetisches Chromosom ist ein Chromosom, welches nicht aus DNA besteht.

3.1.2 Weshalb sollen synthetische Chromosomen konstruiert werden?

Aber weshalb ist es überhaupt so interessant, synthetische Chromosomen zu assemblieren? Ein Grund ist, dass man bis heute noch nicht richtig verstanden hat, welche Teile eines Chromosoms wirklich essentiell sind und wie ein Chromosom funktioniert. Der Aufbau der DNA wurde zwar schon längst geklärt; jedoch weiß man heutzutage, dass ein Chromosom weit mehr als nur ein gefalteter DNA-Strang ist. Jedes Chromosom besitzt z.B. ein oder mehrere „Chromosomenerhaltungs-Systeme“. Solche Systeme bestehen oft aus einem DNA-bindenden Protein und einem DNA-Motiv. Die DNA-Motive sind je nach Funktion unterschiedlich auf dem Chromosom verteilt (Touzain et al., 2011). Wie Chromosomen durch solche Systeme genau organisiert werden, ist nicht bekannt. Die Konstruktion

von synthetischen Chromosomen kann zum Verständnis der Funktionsweisen von Chromosomenerhaltungssystemen beitragen. Bei dem „Learning-by-building“ Ansatz können Konstruktionsregeln für die Assemblierung von Chromosomen abgeleitet werden. Da es heutzutage möglich ist, große, synthetische Chromosomen zu konstruieren, kann man sogar beispielsweise Chromosomenfaltung und deren Einfluss auf wichtige Zellprozesse untersuchen. Mit kürzlich entwickelten Chromosomenmodellen ist es durch induzierbare Genomumstrukturierungen sogar möglich, verschiedene Genomanordnungen und deren Einfluss auf verschiedenste Zellprozesse auszutesten (Annaluru et al., 2014). Ein ganz anderes Potential verspricht die Assemblierung synthetischer Chromosomen in biotechnologischer Hinsicht. In Zukunft könnten große Stoffwechselwege mittels synthetischer Chromosomen von einem Organismus auf den anderen übertragen werden. Ein Fortschritt in diese Richtung sind publizierte synthetische *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris* Stämme, welche Opioide, Cannabinoide und andere Moleküle mit pharmazeutischer Bedeutung herstellen können (Galanie et al., 2015; Zirpel et al., 2015). Andere biotechnologische Produktionsstämme wie *Escherichia coli* oder *Corynebacterium glutamicum* könnten einerseits synthetisch so modifiziert werden, dass sie mehr Produkte herstellen können. Andererseits könnten sie so verändert werden, dass sie komplett neue Produkte synthetisieren können, welche bisher nur chemisch hergestellt werden können. Bisherige synthetische Chromosomen wurden hauptsächlich anhand des natürlich vorkommenden Chromosoms designt (Gibson et al., 2008). Die de novo Synthese eines ganzen Mikroorganismus scheint aus jetziger Sicht zwar anspruchsvoll, aber nicht unmöglich.

3.1.3 Zwei Beispiele für DNA-Assemblierungstechniken für die Konstruktion synthetischer Chromosomen

Bisherige traditionelle Klonierungsmethoden basieren auf das Einfügen eines DNA-Fragmentes in einen Vektor mittels spezifischen Restriktions- und Ligationsenzymen. Wenn große DNA-Fragmente assembliert werden sollen, ist dieser Ansatz sehr limitierend. Eine typische Restriktionserkennungsstelle ist 6 Bp lang, was bedeutet, dass sich auf einem DNA-Fragment ca. alle 4000 Bp eine solche Erkennungsstelle befindet. Für ein DNA-Fragment in Chromosomengröße ist es also unwahrscheinlich ein Restriktionsenzym zu finden, welches nur ein einziges Mal in diesem DNA-Fragment schneidet. Für die Konstruktion von großen Replikons war es deshalb vonnöten, neue DNA-Assemblierungstechniken zu entwickeln. Ein Teil dieser neuen Methoden basieren auf der Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit homologen Bereichen. Eine solche Homologie-basierte DNA-Assemblierungstechnik ist die Gibson-Methode. Mit dieser Methode können mehrere überlappende DNA-Fragmente in einer einzigen isothermalen Reaktion *in vitro* verbunden werden (Gibson et al., 2009). An die aneinanderzufügenden DNA-Fragmente werden per PCR homologe Bereiche zum

nächsten DNA-Fragment angebracht. Größere Fragmente (> 5 Kbp) können über die Aufteilung in kleinere überlappende Fragmente assembliert werden. Die DNA wird mit einer 5'-Exonuklease, einer DNA-Polymerase und einer hitzestabilen DNA-Ligase und einem geeigneten Puffer gemischt. Die 5'-Exonuklease verdaut die 5'-Enden, sodass kurze, einzelsträngige DNA-Enden entstehen (Abb. 1). Diese lagern sich aneinander. Die DNA-Polymerase füllt die entstandenen Lücken auf. Anschließend verschließt die hitzestabile DNA-Ligase die „Narben“ und verbindet die DNA-Fragmente. Die Gibson-Reaktion findet bei 50°C für 1 h statt. Mit dieser Methode wurden schon DNA-Fragmente mit variablen Überhängen (15-80 Bp) und Hunderten von Kbp lang assembliert (siehe nächster Abschnitt) (Gibson et al., 2010; Gibson et al., 2009).

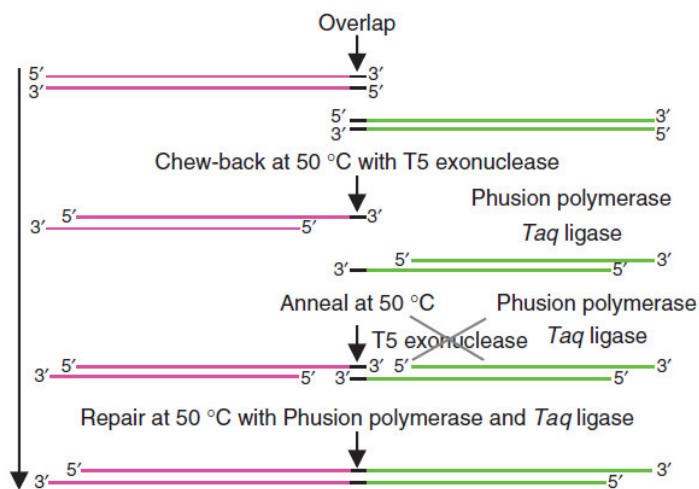


Abb. 1: Überblick über den Ablauf einer Gibson-Reaktion (Gibson et al., 2009). Die Details sind im Text beschrieben.

Im Gegensatz zur *in vitro* Gibson-Assemblierungstechnik können auch natürliche Systeme *in vivo* genutzt werden, um synthetische Chromosomen zu konstruieren. Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* besitzt ein natürliches Rekombinationssystem, welches das Aneinanderfügen von DNA-Fragmenten mit homologen Bereichen ermöglicht (Oldenburg et al., 1997; Raymond et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass eine 20 Bp-lange homologe Sequenz ausreichend ist, um zwei DNA-Fragmente zu verbinden (Kück U, 2005). Dafür müssen die überlappenden DNA-Stücke lediglich mit einem passenden Hefe-Replikationsursprung und einem Hefe-Selektionsmarker in *S. cerevisiae* transformiert werden. Wie bakterielle und eukaryotische synthetische Chromosomen bisher mit diesen und auch anderen Methoden konstruiert wurden, wird im nächsten Abschnitt erläutert.

3.1.3 Bakterielle und eukaryotische synthetische Chromosomen

Den Grundstein für die Konstruktion synthetischer Chromosomen lieferten Venter und seine Mitarbeiter mit der Erfindung der Gibson-Assemblierungsmethode (Gibson et al., 2009) (siehe vorheriger Abschnitt). Mit dieser Methode konstruierten sie zunächst *in vitro* das *Mycoplasma genitalium* Chromosom, welches das Chromosom des kleinsten freilebenden Bakteriums überhaupt darstellt, zusammen (Gibson et al., 2008). Da nur ca. 300 Kbp stabil in *E. coli* aufrechterhalten werden konnte, wurden die letzten Teile des Chromosoms in *S. cerevisiae* assembliert. Das synthetische Replikon war letztendlich 583 Kbp groß. Mit der Hefe-Rekombineering-Methode konnten Venter und sein Team kurze Zeit später auch erfolgreich zeigen, wie man aus synthetischen Oligonukleotiden in *S. cerevisiae* das *Mycoplasma mycoides* Chromosom (J-VI-syn1.0) mit einer Größe von 1,08 Mbp assembliert und danach in *Mycoplasma capricolum* transplantiert (Gibson et al., 2010). Interessanterweise wurde dieser Organismus letztendlich wirklich von dem synthetischen *M. mycoides* Chromosom kontrolliert. Des Weiteren ist es mit *S. cerevisiae* gelungen, das Genom von *Mycoplasma genitalium* in nur einem Schritt aus 25 DNA-Fragmenten zusammenzubauen (Gibson et al., 2009). Das erste synthetische, eukaryotische Chromosom SynIII wurde ebenfalls in *S. cerevisiae* konstruiert (Annaluru et al., 2014). Hierbei wurde Chromosom III von *S. cerevisiae* schrittweise wie folgt ersetzt: Synthetische DNA-Fragmente mit einem Hefe-Selektionsmarker und homologen Flanken wurden in die Hefe eingebracht. Dort wurden die Fragmente über homologe Rekombination wie oben beschrieben in das Hefechromosom eingebaut. Danach wurde das Verfahren mit anderen synthetischen DNA-Stücken und einem anderen Selektionsmarker wiederholt. Der Prozess wurde solange alternierend angewendet bis ein ganzes synthetisches Chromosom vorlag. Durch das gewählte Design der synthetischen DNA-Fragmente konnten unerwünschte Sequenzen wie z.B. Transposons, Introns und tRNAs entfernt und zusätzliche gewünschte Elemente, die die spätere Veränderung des Chromosoms erleichtern, hinzugefügt werden (Annaluru et al., 2014; Dymond and Boeke, 2012; Dymond et al., 2011). So wurden beispielsweise alle nicht essentiellen Gene mit loxP/sym-Rekombinationsstellen flankiert (Dymond et al., 2011). Nach Induzieren der Cre-Rekombinase können andere zufällige Genanordnungen im Chromosom entstehen, wodurch sich neue interessante Phänotypen ergeben. Beispielsweise wurde ein besonders langsam und ein besonders schnell wachsender Hefestamm entdeckt (Annaluru et al., 2014). Durch diese innovative Idee konnte Boeke und sein Team also ein synthetisches, eukaryotisches Chromosom, in welchem Chromosomstrukturierungen induziert werden können, assemblieren. Außerdem wurden die natürlichen Telomere im Replikon durch synthetische Telomere ersetzt (Mitchell and Boeke, 2014). Zur Unterscheidung des synthetischen Chromosoms wurden diesem kurze spezifische DNA-Sequenzen hinzugefügt. Dadurch ist es möglich, die spezifische Sequenz und damit das synthetische Chromosom mittels PCR zu detektieren. Zusätzlich wurden alle Stopcodons TAG zu TAA

umgewandelt. Somit könnte in Zukunft das Codon TAG für eine nicht-proteinogene Aminosäure genutzt werden. SynIII mit einer Größe von ungefähr 273 Kbp ist funktionell in *S. cerevisiae* (Annaluru et al., 2014). Wie limitierend jedoch dieses Design sein kann und wie begrenzt unser Wissen über die Funktionsweise eines Chromosoms ist, zeigt sich darin, dass ein haploider *S. cerevisiae* Stamm mit synIII das Induzieren des Rekombinationssystem nicht überlebte (Annaluru et al., 2014). Nichtsdestotrotz wollen Boeke und sein Team mithilfe vieler anderer Arbeitsgruppen ein komplettes synthetisches Hefegenom konstruieren. Das bedeutet, dass alle 16 Chromosomen und nicht nur Chromosom 3 synthetisch assembliert werden. Niemand weiß zwar, ob ein synthetisches Genom wirklich einen eukaryotischen Organismus am Leben erhalten kann. Jedoch wird sich dies an diesem „Learning-by-building“ Projekt zeigen.

Auf der Suche nach einem minimalen Genomset für ein funktionelles Chromosom benutzten Venter und sein Team ebenfalls das Rekombinationssystem von *S. cerevisiae* (Hutchison et al., 2016). Das Team entwickelte erst ein Design, synthetisierte dann das Genom von *M. mycoides* in der Hefe und testete anschließend die Funktionalität. Dass man wirklich von der Konstruktion eines Chromosoms lernen kann, sieht man daran, dass das erste entwickelte verkleinerte synthetische Chromosom, nach der Transplantation in *M. capriocolum* nicht funktionell war. Erst das Hinzufügen von essentiellen Genen produzierte ein verkleinertes, funktionelles Chromosom (Hutchison et al., 2016). Das 1027 Kbp-Replikon von *M. mycoides* wurde auf eine Größe von 531 Kbp reduziert. Sonstige Publikationen bezüglich minimaler Genome haben sich auf Arbeiten mit gerichteten Deletionsschritten bezogen, mit welchen Chromosomen schrittweise reduziert, anstatt aufgebaut wurden (Juhas et al., 2014; Posfai et al., 2006).

In der synthetischen Biologie gibt es auch andere Beispiele, welche sich mit der Rekodierung eines Chromosoms beschäftigen. Dabei macht man sich die mehrfache Kodierung von Aminosäuren und Translationsstopps im Triplett-Code zunutze. In *E. coli* wurde z.B. auf dem Chromosom alle Stopkodons TAG mit dem Stopkodon TAA ersetzt (Lajoie et al., 2013). Dadurch wird das Kodon TAG für eine nicht-proteinogene Aminosäure frei und nicht natürliche Aminosäuren könnten in ein Protein eingebaut werden. Solch ein modifizierter genetischer Code könnte den horizontalen DNA-Transfer zwischen synthetischen und natürlichen Organismen verhindern. Die DNA eines rekodierten Stammes würde vermutlich nicht in einem natürlich vorkommenden Organismus funktionieren und damit sind die Gefahren, welche das Aussetzen eines gentechnisch veränderten Organismus in die Natur mit sich bringt, eingedämmt (Schmidt and de Lorenzo, 2012). Der modifizierte genetische Code könnte deshalb auch dem rekodierten Mikroorganismus Phagenresistenz vermitteln. Dies ist vor allem für biotechnologische Produktionsstämme interessant, da Phagenkontaminationen bei industriellen Produktionsprozessen unter Einsatz von Bakterien ein Problem darstellen (Sturino and Klaenhammer, 2006). Der rekodierte *E. coli* Stamm zeigte jedoch eine verringerte Fitness im

Vergleich zu *E. coli* Wildtyp und das Kodon UAA wurde nur schlecht translatiert. Momentan arbeiten Church und seine Mitarbeiter sogar an einem *E. coli* Stamm, in welchem sieben Kodons rekodiert werden (Ostrov et al., 2016).

Neben der Synthese von bakteriellen primären Chromosomen könnten auch sekundäre Chromosomen synthetisch hergestellt und modifiziert werden. Um dies umzusetzen, muss erstmal verstanden werden, wie in Bakterien, welche mehr als nur ein Chromosom besitzen, Chromosomen funktionieren, organisiert und koordiniert werden.

3.2 Sekundäre Chromosomen in Bakterien

Die meisten Bakterien besitzen nur ein zirkuläres Chromosom. Nur 10 % aller Bakterien haben ihr Genom auf mehrere Chromosomen verteilt (Ochman, 2002). Das primäre Chromosom besitzt essentielle Gene und ist immer das größte Chromosom (Krawiec and Riley, 1990; Ochman, 2002; Okada et al., 2005). Die Definition eines sekundären Chromosoms und die Abgrenzung zu Megaplasmiden und Plasmiden ist schwierig. Die Definition hat sich in der Vergangenheit oft verändert und wird weitläufig kontrovers diskutiert (Downie and Young, 2001; Harrison et al., 2010; Slater et al., 2009). Was alle Definitionen gemeinsam beinhalten, ist, dass sekundäre Chromosomen kleiner als primäre Chromosomen sind (Cooper et al., 2010; Okada et al., 2005). Sie tragen essentielle Gene und replizieren ebenso wie primäre Chromosomen synchron und nur einmal pro Zellzyklus. Beispiele für sekundäre Chromosomen besitzende Organismen sind *Leptospira interrogans* und *Deinococcus radiodurans* (Ren et al., 2003; White et al., 1999). Unter den Proteobakterien sind *Rhodobacter sphaeroides*, alle *Burkholderiaceae* und alle *Vibrionaceae* sekundäre Chromosomen tragende Organismen (Lessie et al., 1996; Suwanto and Kaplan, 1989; Trucksis et al., 1998). Das Proteobakterium *Agrobacterium tumefaciens* ist außerdem insofern ein außergewöhnlicher Organismus, da er ein zirkuläres und ein lineares Chromosom besitzt (Allardet-Servent et al., 1993).

Dagegen sind Plasmide in der Regel kleiner als Chromosomen und besitzen keine essentiellen Gene (Sherratt, 1982). Stattdessen können sie für extra Spezialisierungen kodieren, welche den Organismus mit Virulenzfaktoren oder Pathogenität ausstatten (Sengupta and Austin, 2011). Ein Beispiel für Spezialisierungen sind Antibiotikaresistenzen (Gerdes et al., 1985). Manche Plasmide kodieren auch Toxin-Antitoxin-Systeme (Zielenkiewicz and Ceglowski, 2005). Plasmide replizieren asynchron und können an verschiedenen Zeitpunkten im Zellzyklus replizieren (Leonard and Helmstetter, 1988). Eine Ausnahme hierfür könnte das F-Plasmid darstellen, von dem bisher widersprüchliche Studien bezüglich der zell-zyklus spezifischen Replikation publiziert worden sind (Cooper and Keasling, 1998; Helmstetter et al., 1997; Keasling et al., 1992).

Um synthetische Chromosomen konstruieren zu können, muss erstmal verstanden werden, wie Chromosomen funktionieren und was ein Chromosom wirklich zu einem Chromosom macht. Dies

kann beispielsweise anhand von sekundären Replikons, welche genetisch leicht zugänglich sind, untersucht werden. Ein Beispiel für sekundäre Replikons, welche für die Analyse der Funktionsweise eines Chromosoms verwendet werden, sind sog. *oriC*-Minichromosomen. Des Weiteren können Untersuchungen von der DNA-Replikation in multiplen-Chromosomen-Mikroorganismen zum Verständnis der Koordination und der Erhaltung von mehreren Chromosomen in einer Zelle beitragen. Dieses Wissen kann auf die Konstruktion von synthetischen, sekundären Chromosomen übertragen werden. In den nächsten beiden Abschnitten werden *oriC*-Minichromosomen und deren Verwendung, sowie Ansätze der Chromosomenumstrukturierungen aufgezeigt, welche für diesen Zweck benutzt werden.

3.2.1 *oriC*-Minichromosomen in *Escherichia coli*

Replikons, welche von dem *E. coli* Replikationsursprung *oriC* aus repliziert werden, werden *oriC*-Minichromosomen genannt (Hiraga, 1976; Leonard and Helmstetter, 1986). Solche Minichromosomen wurden erstmals 1976 konstruiert, um *oriC* genauer zu analysieren (Hiraga, 1976). Sie replizieren DnaAC-abhängig und bidirektional wie ein Chromosom (Messer and Weigel, 1997). Wegen ihrer Ähnlichkeit mit einem Chromosom werden sie gerne eingesetzt, um die Replikation und deren Regulation zu untersuchen (Crooke et al., 1991; Leonard and Helmstetter, 1988). Die meisten Organismen besitzen ein striktes Kontrollsystem, welches dafür sorgt, dass die Replikation nur einmal pro Zellzyklus stattfindet. Beispielsweise wurde gezeigt, dass in *E. coli* bis zu acht Kopien eines Chromosoms auf einmal initiiert werden (Skarstad et al., 1986). Andere interessante Studien leiteten ab, dass bis zu 200 *oriC*-Minichromosomen in Synchronie mit dem Chromosom replizieren könnten (Leonard and Helmstetter, 1986; Lobner-Olesen, 1999). Dagegen replizieren Plasmide an verschiedenen Zeitpunkten im Zell-Zyklus (del Solar et al., 1998). Ein DNA-Replikation Kontrollmechanismus stellt aber trotzdem sicher, dass nur eine gewisse Anzahl an Plasmiden in der Zelle vorkommt (del Solar et al., 1998). Hierbei ist keine Unterscheidung zwischen schon bereits initiierten und nicht initiierten Replikationsursprüngen möglich. Nach dem Initiator-Titration-Modell von Hansen et al. erfolgt bei Chromosomen die Initiation der Replikation bei einer bestimmten DnaA Menge pro Zellmasse (Hansen et al., 1991). Dieser Schwellenwert wird erreicht, wenn das Initiatorprotein alle DnaA-Bindestellen in *oriC* gebunden hat. Infolgedessen werden die DNA-Stränge getrennt und unter Beteiligung weiterer DNA-Replikationsproteinen die Replikationsmaschine rekrutiert und auf die DNA geladen (Bramhill and Kornberg, 1988; Fuller et al., 1984). Durch Sequestration des Proteins SeqA kann ein Chromosom bereits initiierte Replikationsursprünge inaktivieren (Lu et al., 1994). DNA-Stücke, welche bereits repliziert worden sind, liegen dank der semi-konservativen Replikation hemimethyliert an GATC-Sequenzen vor. SeqA bindet bevorzugt an diese hemimethylierte DNA und hemmt die Remethylierung der DNA durch die

Dam-Methylase (Russell and Zinder, 1987; Slater et al., 1995). Da DnaA an methylierte Replikationsursprünge bindet, wird so u.a. die Reinitiation verhindert. Das freie DnaA kann an die anderen noch nicht replizierten Replikationsursprünge binden, wodurch die Initiation mehrerer Replikationsursprünge in kürzester Zeit ermöglicht wird. Die Sequestration dauert ca. für ein Drittel des Zellzyklus an (Campbell and Kleckner, 1990). Bis wieder genügend aktives DnaA für die nächste Initiationsrunde gebildet wird, muss in der Regel eine ganze Generation vergehen. Studien haben ergeben, dass *oriC*-Minichromosomen manchmal in *E. coli* in das primäre Chromosom integrieren (Lobner-Olesen, 1999; Lobner-Olesen and von Freiesleben, 1996; Skarstad and Lobner-Olesen, 2003). Das ist u.a. in Mutanten der Fall, welche einen asynchronen Phänotypen aufweisen (Lobner-Olesen and von Freiesleben, 1996; Skarstad and Lobner-Olesen, 2003). Dies konnte anhand von Southern-Blot-Experimenten mit *oriC*-Minichromosomen in den Δihf -, $\Delta seqA$ - und Δdam -Deletionsmutanten demonstriert werden (Lobner-Olesen, 1999; Skarstad and Lobner-Olesen, 2003). In der Δihf -Mutante findet die Initiation der DNA-Replikation nur begrenzt statt, wodurch es zu verringerten Initiationen pro Zellmasse kommt (Von Freiesleben et al., 2000). Asynchronie entsteht vermutlich durch die Initiation der DNA-Replikation von individuellen Replikationsursprüngen an verschiedenen Zeitpunkten im Zellzyklus (Skarstad and Lobner-Olesen, 2003). In den $\Delta seqA$ - und Δdam -Deletionsmutanten ist die Sequestration gestört, weswegen es vermutlich zur Reinitiation von bereits initiierten Replikationsursprüngen in einer Generation und so durch Überinitiationen zu einem asynchronen Phänotypen kommt (Boye and Lobner-Olesen, 1990; Lu et al., 1994). Außerdem integrieren *oriC*-Minichromosomen auch in *E. coli* Wildtyp in das Chromosom, wenn die Kopienzahl über 30 beträgt (Lobner-Olesen, 1999). Mit Southern-Blot-Experimenten wurde gezeigt, dass die *oriC*-Minichromosomen einerseits frei und andererseits in zahlreicher Kopie integriert im *E. coli* Chromosom vorliegen (Lobner-Olesen, 1999; Skarstad and Lobner-Olesen, 2003). Wie es zu dieser Integration kommt und wozu sie dient, kann nur spekuliert werden. Vermutlich konkurrieren die zahlreichen Replikationsursprünge um freies, aktivierendes ATP-DnaA. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein mini-*oriC* und ein chromosomaler *oriC* initiiert werden, ist gleich groß, weswegen die Zellen nur überleben können, wenn die Minichromosomen in das primäre Chromosom aufgenommen werden. Nur so ist gewährleistet, dass der chromosomale Replikationsursprung wirklich einmal pro Zellzyklus initiiert wird.

3.2.2 Chromosomenumstrukturierungen

Anhand der Analyse von Mikroorganismen, welche mehr als nur ein Chromosom besitzen, und z.B. deren Chromosomenumstrukturierungen kann gelernt werden, wie ein Chromosom funktioniert und wie mehrere Chromosomen aufrecht erhalten werden. Dieses Wissen könnte beispielsweise auf das Design von synthetischen, sekundären Chromosomen übertragen werden. Mazel und seine Mitarbeiter erforschen und entwickeln Chromosomenmodelle anhand von *Vibrio cholerae*- einem Bakterium mit zwei natürlichen unterschiedlich großen Chromosomen (siehe nächstes Kapitel). Um u. a. herauszufinden, ob die Chromosomengröße und deren genetische Verteilung Auswirkungen auf die Topologie hat, konstruierten sie einen *V. cholerae* Stamm mit nur einem Chromosom (= MCH1) und einem Stamm mit zwei gleich großen Chromosomen (=ESC1) (Val et al., 2012). Für die Konstruktion wurden zwei spezifische Rekombinationssysteme verwendet: das System des Phagen λ und das System des Phagen HK022. Zusammengehörige attL- und attR-Erkennungsstellen des jeweiligen zugehörigen Systems wurden getrennt auf Chromosom I und II integriert. Da es bekannt war, dass die *ter*-Region von Chromosom I die Aufnahme von DNA toleriert, wurde attR_{HK}/attL _{λ} um die Terminusregion von Chromosom I flankierend inseriert. Das Replikations-Segregations-Modul *parAB-orill-rctB* (Beschreibung siehe im nächsten Kapitel) wurde von attL_{HK}/attR _{λ} umgeben. Nach Induktion der jeweiligen Int Integrase und Excisionase findet die gerichtete Rekombination zwischen den Erkennungssequenzen statt. Konsequenterweise führte dies zur Fusion des ersten Chromosoms mit dem zweiten Chromosom unter Ausschluss der Replikation-Segregations-Kassette des zweiten Chromosoms (Abb. 2A) (Val et al., 2012). Das neue Chromosom mit einer Größe von ungefähr 4 Mbp repliziert und segregiert ausgehend des Replikationsurprungs des primären Chromosoms, *oril*, und des *parAB*-Systems. Das *parAB-orill-rctB* Gencluster lag als extra chromosomales Element zirkulär vor und wurde durch Wachstum ohne Selektionsdruck entfernt. Der synthetische MCH1-Stamm zeigte zwar eine etwas verringerte Generationszeit im Gegensatz zu dem Ausgangstamm. Dagegen waren aber phänotypisch die synthetischen Zellen nicht vom Ausgangstamm zu unterscheiden. Mittels Durchflusszytometrie konnte nachgewiesen werden, dass MCH1 genauso wie der Ausgangstamm repliziert. Für die Konstruktion zweier gleich großer *Vibrio* Chromosomen wurde ebenso mit dem zuvor beschriebenen Phagen-Rekombinationssystem λ /HK022 1 Mbp von Chromosom I auf Chromosom II übertragen. Der resultierende ESC1-Stamm hatte ungefähr eine Größe von 2 Mbp. Mit dem ESC1-Stamm, MCH1-Stamm und *V. cholerae* Wildtyp-Stamm, welche alle unterschiedliche große Chromosomen besitzen, wurde beispielsweise der Zusammenhang zwischen der Replikongröße und der Chromosomen-Dimer-Bildung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Chromosomendimeren exponentiell mit der Chromosomengröße ansteigt (siehe auch Diskussion).

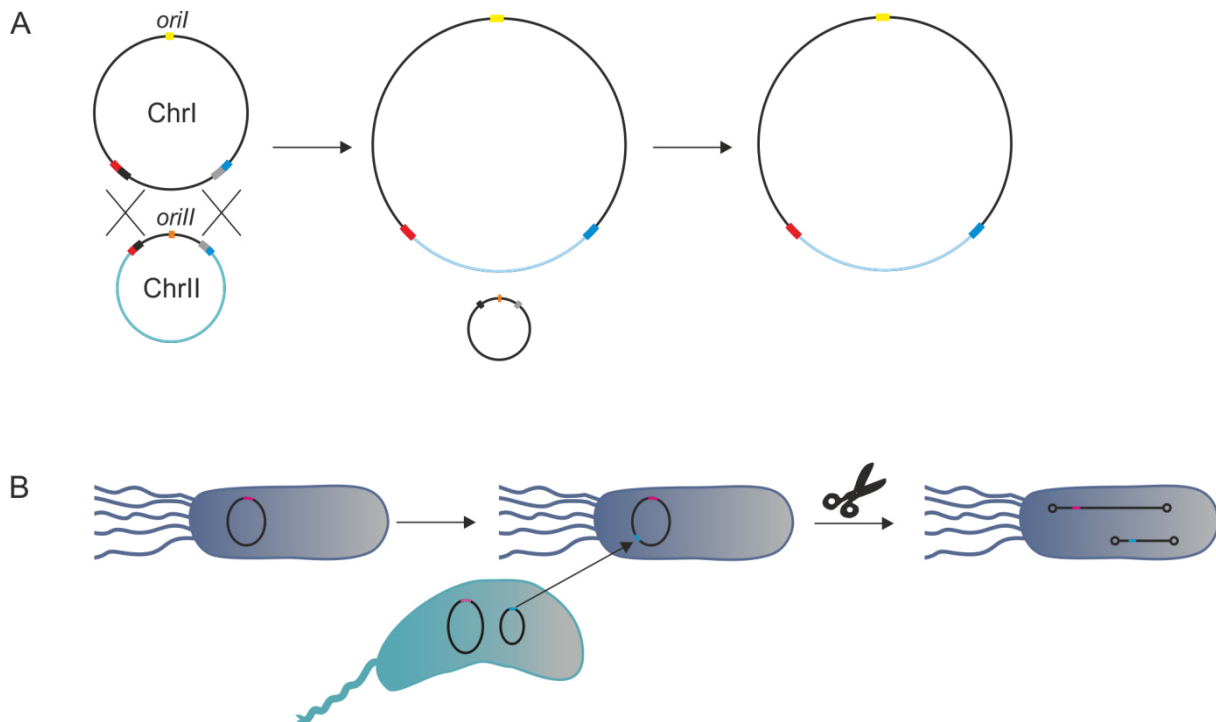


Abb. 2: Zwei verschiedene Ansätze für den Umbau von Chromosomen zur Untersuchung der Funktionsweise eines Chromosoms **A.** Fusion der beiden *V. cholerae* Chromosomen unter Ausschluss des Replikationsursprungs *orill* und dem *parABII* Segregationssystem mittels zweier verschiedener Rekombinationssysteme. Das *orill*-Replikations-Segregationsmodul bleibt als extra chromosomales Fragment übrig und kann über Wachstum ohne Selektionsdruck entfernt werden. **B** Aufteilung des zirkulären *E. coli* MG1655 Chromosoms in zwei lineare Hälften. Vor der Aufteilung wird der *orill* von *V. cholerae* in das *E. coli* Chromosom integriert.

Die bisherigen assemblierten, synthetischen Chromosomen waren kleiner als 1079 Kbp (JVNC-0.1). Forschungsarbeiten in *S. cerevisiae* ergaben, dass die Bäckerhefe möglicherweise nur Fremd-DNA bis zu einer Größe von 2 Mbp aufnehmen kann (Benders, 2012). Andere Organismen, die die Replikation größerer Replikons ermöglichen, sind bisher nicht bekannt. Die meisten Bakterien, darunter auch die beliebten Produktionsstämme *E. coli* und *C. glutamicum*, besitzen eine Genomgröße weit größer als 2000 Kbp. Die Synthese solcher großen, synthetischen Chromosomen könnte mit den bisherigen verfügbaren DNA-Assemblierungstechniken in Zukunft also ein großes Problem darstellen. Deshalb verfolgen Liang et al. einen anderen Ansatz: Für die erleichterte Synthese eines (großen) Chromosoms könnte das Chromosom in zwei Teile oder möglicherweise in noch mehr Untereinheiten aufgeteilt werden (Liang et al., 2013). Jedes dieser Fragmente repräsentiert eine selbst, replizierende Einheit. Dieses Replikon ist klein genug, wodurch die Assemblierung in *S. cerevisiae* erleichtert wird. Dass diese Idee im Prinzip funktioniert, konnten Liang et al. an einem *E. coli* Stamm beweisen (Liang et al., 2013). Mit dem *TerN/Tos* System des Bakteriophagen N15 wurde das ca. 4 Mbp große *E. coli* Chromosom in zwei lineare Chromosomenhälften aufgeteilt (Abb. 2B). Beide Hälften zusammen in einer Zelle ermöglichten die Lebensfähigkeit des *E. coli* Stammes. Die linearen Chromosomen besitzen durch das *TerN/Tos* System an ihren Enden eine Haarnadelstruktur. Jedes Replikon wird von einem unterschiedlichen Replikationsursprung aus

repliziert. Liang et al. verwendeten den *E. coli* wt Replikationsursprung (*oriC*) und den Replikationsursprung des sekundären Chromosoms von *V. cholerae* (*oril*). Durch das Einbringen von mehreren *tos*-Elementen und damit von Teilungssequenzen ist es theoretisch möglich, mehrere lineare Chromosomen zu generieren. Bei der Teilung der Chromosomen scheint sowohl die Position der Teilungssequenz als auch die Position des Replikationsursprunges eine Rolle zu spielen. Ein Chromosom lässt sich nicht an beliebiger Stelle aufteilen. Liang et al. testeten verschiedene lineare Chromosomenkombinationen aus (Liang et al., 2013). Davon war aber nur eine Kombination möglich, bei der zwei lineare Chromosomen von einer Größe von 3,27 und 1,37 Mbp entstanden sind. Interessanterweise entspricht diese Größenverteilung ungefähr der natürlichen Größenverteilung in *V. cholerae*, welche im nächsten Abschnitt näher erklärt wird.

3.3 *Vibrio cholerae* als multi-chromosomaler Modellorganismus

Der multi-chromosomale Modellorganismus *V. cholerae* besitzt ein Chromosom von einer Größe von 2,96 Mbp und ein Chromosom von 1,07 Mbp Größe (Heidelberg et al., 2000). Das kleinere Chromosom trägt essentielle Gene und repliziert synchron einmal pro Zellzyklus (Egan et al., 2004; Heidelberg et al., 2000). Daher wird das kleinere Chromosom als sekundäres Chromosom angesehen. Chromosom II trägt außerdem 14 Toxin-Antitoxin-Systeme (Heidelberg et al., 2000).

3.3.1 Aufbau des Replikationsursprungs *oril*

Das primäre Chromosom wird vom Replikationsursprung *oril* repliziert. *oril* zeigt den gleichen Aufbau wie *oriC*, dem Replikationsursprung von *E. coli* (Abb. 3A und B) (Duigou et al., 2006; Egan and Waldor, 2003). Beide Replikationsursprünge werden von dem Initiatorprotein DnaA kontrolliert. DnaA ist ein hoch konserviertes Protein und wird in mehreren Bakterienspezies gefunden (Messer, 2002). In *oril* liegen mehrere DnaA-Bindestellen. Auch eine IHF-Bindestelle und mehrere GATC-Sequenzen sind in *oril* zu finden. GATC-Sequenzen werden von der DNA-Adenin-Methyltransferase Dam methyliert, wodurch der Zeitpunkt der Reinitiation durch Sequestration der hemimethylierten Bindestellen durch SeqA reguliert wird (Lu et al., 1994; Waldminghaus and Skarstad, 2009). Es wurde bereits gezeigt, dass *oril* in *E. coli* *oriC* ersetzen kann (Koch et al., 2010). Vermutlich laufen deshalb bei der Regulation der Replikation des Chromosoms I von *V. cholerae* dieselben Prozesse wie bei *E. coli* ab.

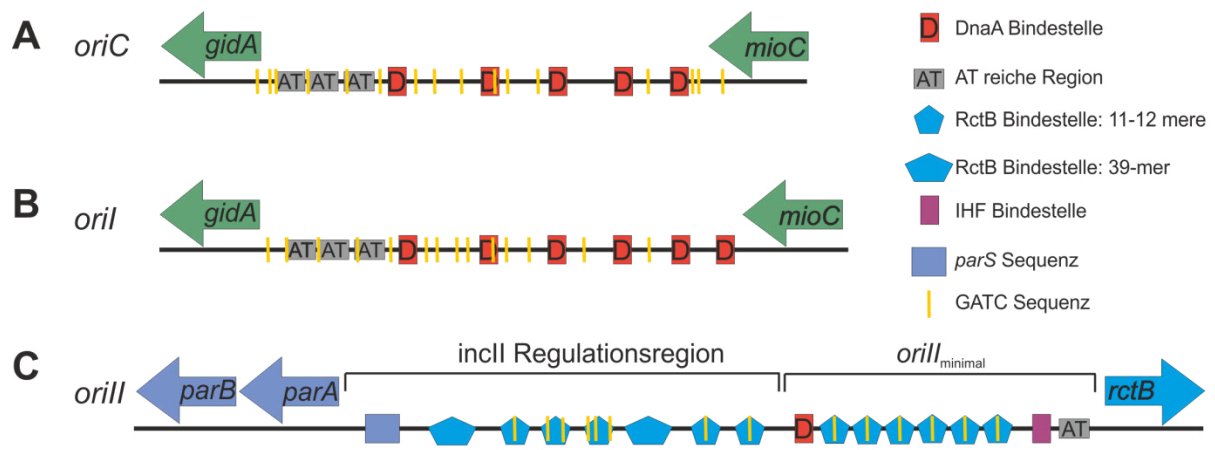


Abb. 3: Schematischer Aufbau der Replikationsursprünge von *E. coli* (A) und *V. cholerae* (B und C). Genkodierende Regionen sind in Form von Pfeilen dargestellt. DNA-Motive sind wie in der Legende beschrieben farbig gekennzeichnet.

3.3.2 Aufbau des *V. cholerae* Replikationsursprungs *orill* und Regulation der Initiation der DNA-Replikation

Der Replikationsursprung des zweiten Chromosoms unterscheidet sich im Aufbau deutlich von *oril*: Die *orill*-Region besteht aus dem minimalen Replikationsursprung *orill* und der *inclI*-Einheit (Egan and Waldor, 2003) (Abb. 3). *orill* enthält die minimale DNA-Sequenz, welche nur für die Replikation des Chromosoms II nötig ist (Egan and Waldor, 2003). Diese besteht hauptsächlich aus 6 sog. Iteronsequenzen, eine AT-reiche Region, eine IHF-Bindestelle und eine DnaA-Bindestelle. Die *inclI*-Region enthält negative regulatorische Elemente wie 5 Iterone, ein 29-mer und ein 39-mer (Egan and Waldor, 2003; Jha et al., 2012; Venkova-Canova and Chattoraj, 2011; Venkova-Canova et al., 2012). *orill* wird von dem Initiatorprotein RctB, welches an die Iterone in der minimalen *orill*-Region bindet und so den Replikationsursprung entwindet und das Aufschmelzen der AT-reichen Region vermittelt, kontrolliert (Duigou et al., 2006). Die AT-reiche Region scheint nicht nur wegen ihrer niedrigen Schmelztemperatur, sondern gezielt wegen ihrer spezifischen Sequenz und eventuell auch wegen ihrem Methylierungsmusters eine Rolle bei der DNA-Replikation zu spielen (Gerding et al., 2015). Die Sequenz der AT-reichen Region konnte nämlich kaum verändert werden und die *oril* AT-reiche Region konnte nicht die *orill* AT-reiche Region ersetzen (Gerding et al., 2015). Bei RctB handelt es sich um einen *Vibrio*-spezifischen Faktor, der keine Homologie zu anderen Initiatorproteinen zeigt (Egan and Waldor, 2003). RctB bindet und hydrolysiert ATP (Duigou et al., 2008). Im Gegensatz zu DnaA ist die ATP-gebundene Form von RctB inaktiv. RctB bindet DNA als Monomer oder als Dimer (Jha et al., 2012). Die *orill*-Region wird von den Genen *parABII*, welche für die Segregationsproteine kodieren, und *rctB* flankiert. Die DnaA-Bindestelle liegt konserviert in den Replikationsursprüngen von anderen *Vibrio* Spezies vor (Egan and Waldor, 2003). Die Anwesenheit und die Orientierung der DnaA-Box ist

wichtig für den Start der DNA-Replikation (Gerding et al., 2015). Überproduktion von DnaA hatte jedoch keinen Einfluss auf die DNA-Replikation von Chromosom II (Duigou et al., 2006).

Die Replikation von Chromosom II unterliegt einer komplexen Regulation durch RctB-Titration und „origin handcuffing“ (Jha et al., 2012; Venkova-Canova and Chatteraj, 2011). RctB-Titration und „origin handcuffing“ wird hauptsächlich über die *incII*-Region vermittelt (Jha et al., 2012; Venkova-Canova and Chatteraj, 2011). Das Initiatorprotein kann nämlich nicht nur an die Iterone in *orill*, sondern auch an die Iterone, den 29-mer und den 39-mer in der *incII*-Region binden (Jha et al., 2012; Venkova-Canova and Chatteraj, 2011; Venkova-Canova et al., 2012). Besonders stark ist der inhibierende Effekt des 39-mer. Die Initiation der Replikation von Chromosom II findet in Abhängigkeit der RctB-Konzentration statt (Pal et al., 2005). Über- und Unterinitiation wird durch eine negative Feedback-Schleife der Verfügbarkeit von RctB gesteuert (Venkova-Canova et al., 2012). Im RctB-Promotor befindet sich eine 29-mer Bindestelle, an welche das Protein ebenfalls binden kann (Venkova-Canova et al., 2012). Somit auto-reguliert der Initiator seine eigene Expression.

Der typische *orill*-Aufbau mit den Iteronsequenzen und die Kontrollelemente Initiatorautoregulation,-titration und „origin handcuffing“ erinnern stark an Plasmidsysteme (del Solar et al., 1998). Deshalb wird vermutet, dass das sekundäre Chromosom II aus einem Megaplasmid entstanden ist (Jha et al., 2012; Venkova-Canova and Chatteraj, 2011).

Die DNA-Replikation ist eng mit der Segregation des Chromosoms II verbunden. ParBII ist nicht nur an der Segregation beteiligt, sondern auch an der Regulation der DNA-Replikation (Venkova-Canova et al., 2013). Es wurde gezeigt, dass ParBII an *parS2-b* in der *incII*-Region bindet. *parS2-b* befindet sich in direkter Nachbarschaft zu der *parABII* zugewandten 39-mer Sequenz in der linken *incII*-Region (Abb. 3). Mehrere Segregationsproteine akkumulieren entlang der DNA-Sequenz in Richtung 39-mer. Infolgedessen wird der 39-mer besetzt und vermutlich wird RctB verdrängt. Das könnte dazu führen, dass RctB vorrangig an die Iterone von *orill* bindet und die Initiation der Replikation eingeleitet wird. Außerdem kann ParBII auch direkt an den zweiten 39-mer in der rechten *incII*-Region binden und könnte so möglicherweise RctB direkt verdrängen (Venkova-Canova et al., 2013).

orill unterliegt ebenso wie *oril* der Sequestration durch SeqA, welches die sofortige Reinitiation verhindert (Demarre and Chatteraj, 2010). Dam-Methylierung ist essentiell für die Initiation der DNA-Replikation des zweiten Chromosoms, aber nicht für das erste Chromosom (Demarre and Chatteraj, 2010; Val et al., 2012). Alle Iterone in *orill* besitzen eine Dam-Methylierungsstelle (GATC-Sequenz), welche voll methyliert vorliegen muss, damit RctB daran binden kann (Demarre and Chatteraj, 2010). Der 29-mer und die 39-mer müssen für die RctB-Bindung nicht voll methyliert sein (Venkova-Canova et al., 2012). Das Zusammenspiel von methylierungsabhängigen Prozessen (RctB/Iteron-Interaktion) und methylierungsunabhängigen Prozessen (RctB/39mer-Interaktion) führt zu einem Gleichgewicht

von RctB, welches den korrekten Zeitpunkt der Initiation der DNA-Replikation des zweiten Chromosoms mitbestimmt.

3.3.3 Zellzyklus-spezifische DNA-Replikation in *V. cholerae*

Die DNA-Replikation in *V. cholerae* verläuft ähnlich wie in monochromosomalen Organismen wie *E. coli* und wird gleichzeitig um Prozesse ergänzt, welche beide Chromosomen aufrechterhalten. Analog wie in *E. coli* startet sie an *oriI* und an *oriII*. Die DNA-Replikation verläuft dann bidirektional in Richtung Terminus, an dem die DNA-Replikation beendet wird. Interessanterweise startet zuerst Chromosom I die DNA-Replikation (Abb. 4). Nachdem ca. 2/3 des ersten Chromosoms repliziert worden ist, erfolgt die Initiation der DNA-Replikation des zweiten kleineren Chromosoms (Rasmussen et al., 2007). Infolgedessen terminieren beide Chromosomen gleichzeitig. Der Mechanismus dieser Terminationssynchronie war lange Zeit unverstanden. Jedoch entdeckten Baek et al. 2014 eine RctB-Bindestelle auf Chromosom I (Baek and Chattoraj, 2014). Diese RctB-Bindestelle weist keine Homologien mit Iterone oder 39-mere des *oriII*s auf. Eine 150-Bp-Region um diese Bindestelle herum verstärkte die DNA-Replikation eines *oriII*-basierten Minichromosoms in *E. coli*. Dass die beiden *Vibrio* Chromosomen tatsächlich über diese Region kommunizieren können, zeigten Mazel und Baek et al. in einer kürzlich erschienenen Publikation: Die 150-Bp-Region von Baek et al. wird jetzt als *crts*- (= *chrII replication triggering site*) Sequenz bezeichnet (Val et al., 2016). Sobald die *crts*-Sequenz des Chromosoms I repliziert worden ist, wird die Initiation der DNA-Replikation des Chromosoms II mit einer Verzögerung aktiviert (Abb. 4). Wie diese Aktivierung genau aussieht, ist bisher nicht verstanden. Lokalisationsstudien demonstrieren, dass die Position der *crts*-Sequenz und des *oriII* in der gleichen Zellregion während des gesamten Zellzyklus kolokalisieren (Val et al., 2016). Durch die „Chromosome conformation capture Methode“ konnten außerdem physikalische Kontakte zwischen den beiden DNA-Sequenzen nachgewiesen werden. Möglicherweise könnten also DNA-Strukturen eine Rolle spielen.

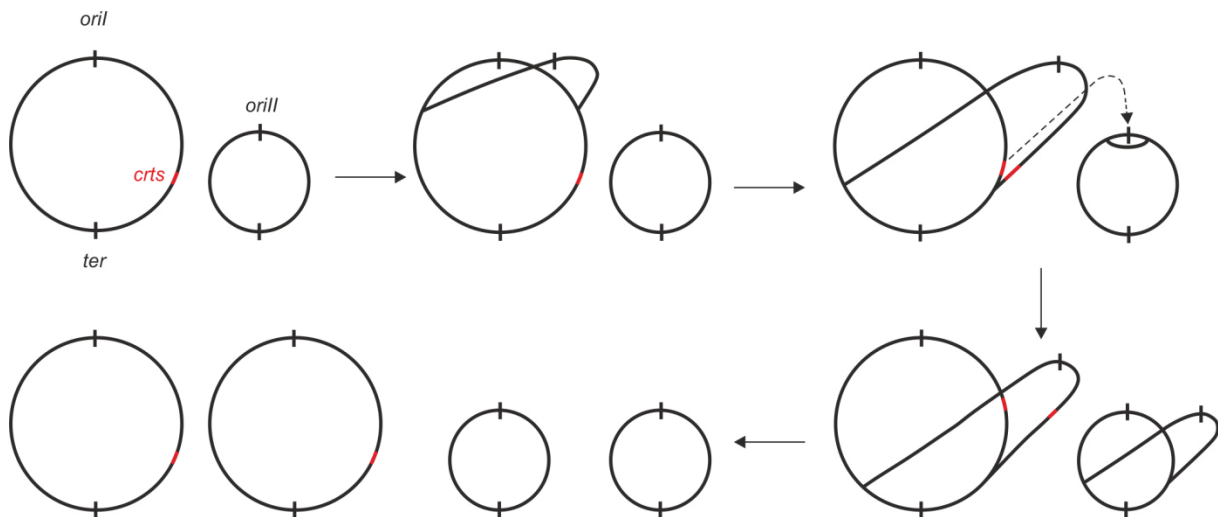


Abb. 4: Terminationssynchronie der beiden *V. cholerae* Chromosomen. Chromosom I initiiert als erstes die DNA-Replikation. DNA-Replikation der *crts*-Sequenz auf dem primären Chromosom induziert den Start der DNA-Replikation des sekundären Chromosoms. Schlussendlich beenden Chromosom I und Chromosom II zeitgleich die DNA-Replikation. Die *crts*-Sequenz ist in rot dargestellt.

In *V. cholerae* dauert die DNA-Replikation länger als die Verdoppelungszeit in komplexem Medium (Stokke et al., 2011). Um eine solche schnelle Verdoppelungszeit aufrecht erhalten zu können, wächst deshalb *V. cholerae* wie auch *E. coli* unter schnell wachsenden Bedingungen mit sog. „überlappenden Replikationszyklen“ (Cooper and Helmstetter, 1968; Skarstad et al., 1986). Das bedeutet, dass die Initiation der DNA-Replikation schon in einer früheren Generation erfolgt und die Zellteilung mit replizierenden Chromosomen stattfindet (Skarstad et al., 1986).

3.3.4 DNA-Replikation in *Vibrionaceae*

Die meisten Vertreter der *Vibrionaceae* Familie sind marin lebende, schnell wachsende Organismen und pathogen (Thompson et al., 2004). Neben den humanpathogenen Stämmen *V. cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* und *Vibrio vulnificus* existieren Stämme, welche z.B. Fische (*Vibrio anguillarum*) oder Shrimps (*Vibrio harveyi* und *Vibrio nigripulchritudo*) befallen. Alle Mitglieder der *Vibrionaceae* besitzen zwei unterschiedlich große Chromosomen (Okada et al., 2005). Die Analyse der DNA-Replikation beschränkt sich bisher auf wenige Arbeiten mit dem primären Chromosom. So wurden beispielsweise in *Photobacterium profundum* zwei Proteine identifiziert, welche Ähnlichkeiten und Funktionen zu *E. coli* DiaA, ein positiver Regulator, und SeqA, ein negativer Regulator der DNA-Replikation aufweisen (El-Hajj et al., 2009). Die beiden Regulatoren ermöglichen das Wachstum bei hohem Wasserdruck, unter welchem *P. profundum* unter Normalbedingungen lebt. Des Weiteren wurde auf Basis des Replikationsursprungs *oril* von *V. harveyi* ein Minichromosom konstruiert (Zyskind et al., 1983). Das Minichromosom konnte erfolgreich in *E. coli* replizieren, was die Funktionalität des Replikationsursprungs bestätigt. Anhand der Nukleotidsequenz des

Replikationsursprunges und fünf weiteren Replikationsursprüngen von anderen Enterobakterien wurde eine 122 nt Konsensussequenz gefunden, welche die DNA-Replikation in *E. coli* erlaubt. Eine andere Studie zeigte, dass *V. harveyi* DnaA und *E. coli* DnaA austauschbar sind, obwohl die *V. harveyi* *dnaA* Region anders organisiert ist (Berenstein et al., 2002). Die Expression des *V. harveyi* Initiator ist wie in *E. coli* autoreguliert und ATP-DnaA bindet an die DnaA-Boxen im *dnaA* Promotor. Außerdem unterliegen *V. harveyi* *dnaA* und *E. coli* *dnaA* der gleichen Transkriptionsregulation und beide Proteine kontrollieren die Initiation der DNA-Replikation (Berenstein et al., 2002).

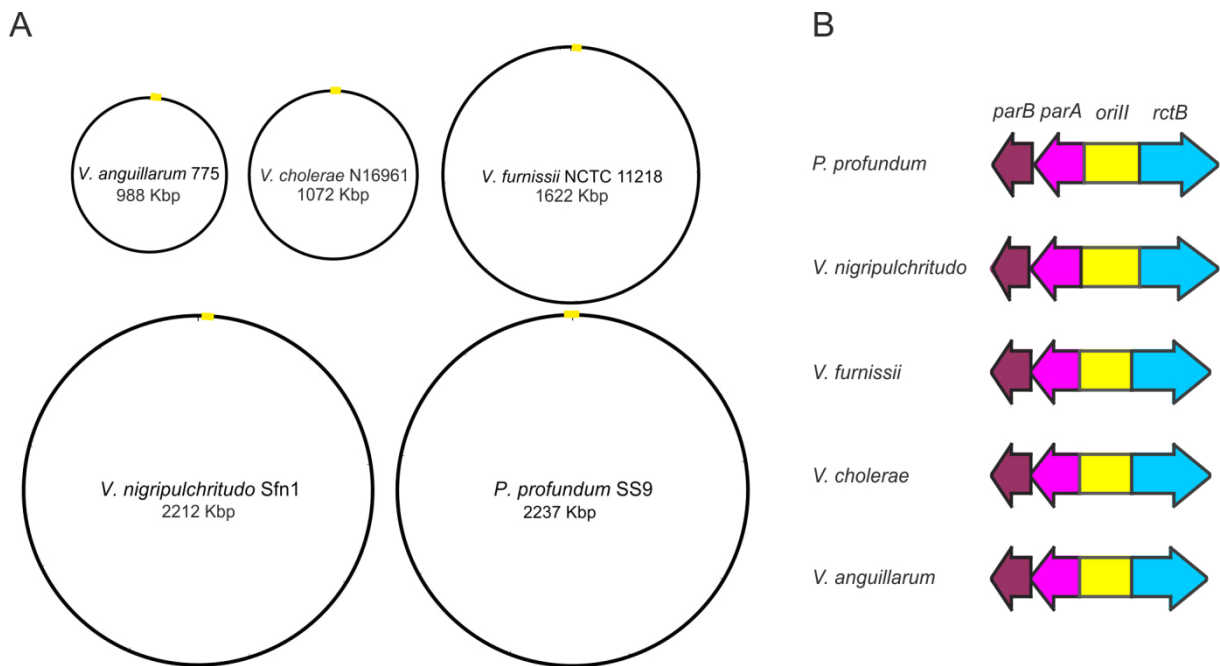


Abb. 5: **A** Verschiedene Vertreter der *Vibrionaceae* weisen eine unterschiedliche Größe der sekundären Chromosomen auf. **B** Aufbau des *orill* in verschiedenen Vertretern der *Vibrionaceae*. Analog zum *V. cholerae* Chromosom II ist der *orill* (siehe Abb. 3) von den verschiedenen *Vibrio* Spezies von *parAB* und *rctB* umgeben.

Die Analyse sekundärer Chromosomen in *Vibrionaceae* mit Ausnahme von *V. cholerae* ist bisher nicht erforscht worden. Die Größe der sekundären Chromosomen ist variabel (Abb. 5A). Der Replikationsursprung dieser sekundären Chromosomen ist jedoch ähnlich aufgebaut wie der von *V. cholerae* beschriebene *orill* in zuvor beschriebenen Abschnitt (Abb. 3). Alle *orill* werden durch RctB kontrolliert (Egan and Waldor, 2003). Das RctB kodierende Gen flankiert ebenso wie die für die Segregationsproteine kodierenden Gene *parAB* den *orill* (Abb. 5B).

4. Ziele dieser Arbeit

Chromosomen besitzen ein oder mehrere Chromosomenorganisationssysteme, welche aus einem DNA-bindenden Protein und einem DNA-Motiv bestehen. Die DNA-Motive sind nicht zufällig auf dem Chromosom verteilt, sondern die Position der DNA-Motive hängen mit der Funktion zusammen (Touzain et al., 2011). Wie Chromosomen durch die Chromosomenerhaltungssysteme organisiert sind, ist bisher aufgrund fehlender Testmethoden nicht verstanden. In der Biotechnologie werden Plasmide verwendet oder Insertionen in das Chromosom eingefügt, um *E. coli* im Hinblick auf Steigerung der Produktivität genetisch zu verändern. Insertionen in das Chromosom sind oft invasiv und risikobehaftet. Plasmide werden oft nicht stabil weitervererbt und gehen verloren.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, ein synthetisches, sekundäres Chromosom in *E. coli* zu etablieren, anhand welchem in Zukunft die Chromosomenorganisation studiert werden kann. Außerdem könnte ein solches synthetisches Chromosom in Zukunft in der Biotechnologie als Alternative zu Plasmiden genutzt werden, um z.B. *E. coli* genetisch zu verändern. Dafür bedarf es einem Replikon, das sich wie ein Chromosom und nicht wie ein Plasmid verhält. Das synthetische, sekundäre Chromosom soll auf Basis des Chromosoms II (ChrII) von *V. cholerae* konstruiert werden. Für die Entwicklung des synthetischen Chromosoms soll eine geeignete, effiziente Assemblierungsmethode gefunden werden, welche die Assemblierung auch in *S. cerevisiae* erlaubt. Das synthetische Chromosom sollte später den effizienten Einbau von beliebigen DNA-Sequenzen ermöglichen. Hierbei ist es von Vorteil, wenn die Kandidaten mit den neuen DNA-Sequenzen von dem Ursprungschromosom unterschieden werden könnten. Das synthetische Chromosom soll so entwickelt werden, dass es Messungen wie z.B. Stabilitätsmessungen erlaubt und seine Eigenschaften gut beschrieben werden können.

Damit es in Zukunft als Chromosomentestmodell verwendet werden kann, soll das synthetische, sekundäre Chromosom im zweiten Teil dieser Arbeit in *E. coli* auf wesentliche Charakteristika bakterieller Chromosomen hin untersucht werden. Chromosomen zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine niedrige Kopienzahl haben. Außerdem werden sie stabil weitervererbt und replizieren synchron Zellzyklus-kontrolliert. Deshalb soll für das synthetische, sekundäre Chromosom die Kopienzahl bestimmt, sowie die Stabilität und die Zellzyklus-spezifische Replikation mit geeigneten Methoden analysiert werden.

Die genetische Information könnte nicht nur auf zwei, sondern auch auf drei Replikons verteilt werden. Deshalb soll im dritten Teil dieser Arbeit die Biodiversität der DNA-Replikation von verschiedenen Mitgliedern der *Vibrionaceae* untersucht und ihr Potenzial für tertiäre synthetische Chromosomen initial getestet werden. Die Mitglieder der *Vibrionaceae* haben alle unterschiedlich große sekundäre Chromosomen. Die DNA-Replikation von ausgewählten Mitgliedern soll im Hinblick auf die Terminationssynchronie mithilfe von Marker-Frequency-Analysen untersucht und bestimmt

werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Größe des Chromosoms und dem Start der Initiation der DNA-Replikation gibt. Außerdem sollen noch auf Basis der sekundären Chromosomen verschiedener *Vibrionaceae* andere synthetische, sekundäre Chromosomen konstruiert und im Hinblick auf ihre Eignung als synthetisches Chromosom initial getestet werden.

5. Ergebnisse

Dieser Teil der Arbeit gliedert sich in zwei Kapitel. Dabei enthält das erste Kapitel eine Studie, welche bereits publiziert ist (Kapitel 5.1). Das zweite Kapitel enthält eine Studie, welche zur Publikation bereits eingereicht worden ist und momentan überarbeitet wird (Kapitel 5.2). Vor jedem Abschnitt ist eine Zusammenfassung der relevanten Ergebnisse und eine Übersicht der Autoren sowie ihr Mitwirken an der jeweiligen Publikation angeführt.

5.1 Synthetic secondary chromosomes in *Escherichia coli* based on the replication origin of chromosome II in *Vibrio cholerae*

**Sonja Messerschmidt, Franziska Kemter, Daniel Schindler
and Torsten Waldminghaus
(2015)**

Journal of Biotechnology

5.1 Synthetic secondary chromosomes in *Escherichia coli* based on the replication origin of chromosome II in *Vibrio cholerae*

Ein Ziel in der Biotechnologie ist es, neue effiziente Produktionsstämme für die Herstellung von wertvollen Chemikalien und Molekülen zu generieren. Mit der Konstruktion und Verwendung bakterieller synthetischer, sekundärer Chromosomen ist es möglich, dieses Ziel zu erreichen. Durch ein gewähltes Chromosomendesign kann der Organismus genetisch so verändert werden, dass die gewünschten Produktionseigenschaften gezielt verbessert werden. Die Konstruktion und das Testen von synthetischen, sekundären Chromosomen tragen zudem auch dazu bei, die Funktionsweise eines Chromosoms zu verstehen. In Messerschmidt et al, 2015 entwickelten wir deshalb das synthetische, sekundäre Chromosom synVicII und transformierten es in den biotechnologisch genutzten und monochromosomalen Organismus *E. coli*. Als Vorbild für synVicII wurde das sekundäre Chromosom von *V. cholerae* verwendet. Für die Assemblierung eines synthetischen, sekundären Chromosoms in *E. coli* ist es wichtig, einen Replikationsursprung zu verwenden, welcher sich von *oriC*, dem Replikationsursprung von *E. coli* maßgeblich unterscheidet. Des Weiteren muss das synthetische Replikon stabil weiter vererbt werden, weswegen das Konstrukt mit einem guten Segregationssystem ausgestattet sein sollte. Deshalb wurde synVicII mit dem nativen Replikations-Segregations-Modul von Chromosom II von *V. cholerae* versehen. Das Modul besteht aus *orill*, dem Initiatorgen *rctB* und den für die Segregationsproteine kodierenden Genen *parABII*. Damit synVicII über homologe Rekombination in *S. cerevisiae* assembliert werden kann, wurde zusätzlich ein Hefe-Replikationsursprung (zu *ori*) und –marker (*ura*) in synVicII integriert. Zur Selektion in *E. coli* dient eine inserierte Ampicillin-Resistenz. Zum Testen der Funktionalität des *orill* wurde außerdem ein konditioneller Replikationsursprung, der *oriR6K*, eingebaut, der nur in einem *E. coli* Stamm mit *λpir* Gen funktionell ist. Im *pir*- *E. coli* MG1655 Stamm kann synVicII nur replizieren, wenn *orill*, ein anderer funktioneller Replikationsursprung, vorhanden ist. Für die spätere geplante Integration beliebig großer DNA-Fragmente wurde eine *I-SceI* Restriktionsstelle eingebaut. Nach der Transformation von synVicII in *E. coli* MG1655 wurden lebende Kolonien beobachtet. Weitere Kultivierung des *E. coli* Stammes beweist, dass synVicII in *E. coli* funktionell ist und replizieren kann. Um zu testen, ob synVicII stabil an Tochterzellen weitervererbt wird, wurde ein Durchflusszytometrie-basierter Stabilitätstest entwickelt. Dazu wurde synVicII mit einer instabilen *gfp*-Variante markiert. Nach Kultivierung des Stammes in Medium ohne Ampicillin wird der Anteil der *gfp*⁺-Zellen und damit der Anteil der noch synVicII tragenden Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Mit diesem Test konnte gezeigt werden, dass synVicII nach 3 h mit einer Verlustrate von -8 % pro h wesentlich stabiler ist als das *oriC*-basierte Replikon synEsc mit einer Verlustrate von -25 % pro h. Die Stabilität und damit auch die Eignung des Tests, Replikonverlusten zu messen, konnte mit einem konventionellen Test, bei welchem das Verhältnis von resistenten zu nicht resistenten

Zellen bestimmt wird, bestätigt werden. Des Weiteren konnte mit diesem alternativen Test demonstriert werden, dass synVicII nicht so stabil wie ein F *ori*-basiertes Plasmid (synF-Plasmid) ist, welches 100 % stabil war. Außerdem deuteten Zellzyklus-Analysen und die Bestimmung der Kopienzahl mithilfe qPCR und Microarrays darauf hin, dass synVicII in *E. coli* ein ähnliches Replikationsverhalten aufweist wie das Chromosom II in *V. cholerae*. synVicII hatte eine niedrigere Kopienzahl als *oriC* (0,54 bzw. 0,69), was darauf schließen lässt, dass synVicII erst später als *oriC* initiiert aber auch bevor das *E. coli* Chromosom terminiert. Zusammengefasst stellt synVicII also ein geeignetes synthetisches, sekundäres Chromosom in *E. coli* dar, um damit als Ersatz für Plasmide einerseits große DNA-Fragmente stabil in einer Zelle zu halten. Andererseits könnte synVicII in Zukunft in der Grundlagenforschung für z.B. die Analyse von Chromosomenorganisationssysteme verwendet werden.

Unter der Anleitung von Prof. Dr. Waldminghaus etablierte und konstruierte ich sowohl das synthetische, sekundäre Chromosom synVicII, das *oriC*-basierte Replikon synEsc als auch das F *ori*-basierte Replikon in *E. coli*. Ich entwickelte den Durchflusszytometrie-basierten Stabilitätstest und bestimmte die Stabilitäten der verschiedenen Replikons mit diesem Test. Der konventionelle Plattentest zur Bestimmung der Stabilität der Replikons wurde ebenfalls von mir durchgeführt. Im Rahmen Ihrer Masterarbeit übernahm Franziska Kemter, welche von mir betreut worden ist, die Zellzyklus-Analysen und die Kopienanzahlbestimmungen. Daniel Schindler entwickelte hierfür die Microarray-Sonden. Das Manuskript wurde von Prof. Dr. Waldminghaus und mir geschrieben.

5.2 Optimization and characterization of the synthetic secondary chromosome synVicII in *Escherichia coli*

**Sonja Messerschmidt, Daniel Schindler, Celine Zumkeller, Franziska Kemter,
Nadine Schallopp
and Torsten Waldminghaus**

Frontiers in Microbiology: Bioengineering and Biotechnology, accepted

5.2. Optimization and characterization of the synthetic secondary chromosome synVicII in *Escherichia coli*

In der Biotechnologie werden für gentechnische Veränderungen von Mikroorganismen oft Plasmide verwendet oder direkt das Chromosom modifiziert. Die Chromosomenveränderung ist dabei sehr risikobehaftet und Plasmide sind oft instabil. Eine andere Herangehensweise ist die Verwendung eines zusätzlichen synthetischen, sekundären Chromosoms, welches genetisch leicht zugänglich und stabil ist. Anhand der Assemblierung und dem Testen des synthetischen, sekundären Chromosoms können Konstruktionsregeln für synthetische Chromosomen abgeleitet werden und die Funktionsweise eines Chromosoms ausführlich untersucht werden. Ein mögliches Chromosomenmodell ist das auf dem *V. cholerae orill*-basierte synVicII, welches in unserer Arbeitsgruppe entwickelt worden ist. Bevor es aber als Chromosomenmodell und biotechnologisch genutzt werden kann, muss es ausführlich charakterisiert werden. Für zukünftige biotechnologische Anwendungen ist es wichtig, dass synVicII nicht integriert im *E. coli* Chromosom vorliegt. Mittels Southern-Blot-Analysen wurde deshalb untersucht, ob synVicII in das primäre Chromosom von *E. coli* integrieren kann. Im Gegensatz zu synEsc, einem *oriC*-basierten Replikon, integrierte synVicII in *E. coli* MG1655 und in einer $\Delta seqA$ -Mutante nicht und es lag sogar nach einer Kultivierung von 3 Tagen immer noch frei vor. Dies war auch der Fall, wenn synVicII homologe Sequenzen trägt. In Messerschmidt et al, 2015 konnte bereits gezeigt werden, dass synVicII mit einer Replikonverlustrate von -8 % pro h relativ stabil ist. Für bestimmte künftige biotechnologische Produktionszwecke wäre es aber vonnöten ein noch stabileres Replikon zur Verfügung zu haben. Deshalb wurde ein direktgerichtetes Evolutionsexperiment entwickelt, mit welchem stabilere synVicII-Mutanten identifiziert werden können. Durch einen entwickelten Ampicillin-Test können diese Mutanten in Copy-up und nicht Copy-up Mutanten unterschieden werden. Der Test identifizierte einen stabilen Copy-up Mutant (synVicII-1.10) und zwei nicht Copy-up Mutanten (synVicII-1.8/9). Microarray-Analysen mit synVicII-1.8 und synVicII-1.10 bestätigten, dass der Test geeignet ist, um die Kopienanzahl der Mutanten abzuschätzen. Eine Sequenzierungsanalyse des *rctB* Gens in synVicII-1.10 bestätigte eine Punktmutation, welche vermutlich zum copy-up Phänotyp führt. Punktmutationen in *rctB* sind bekannt dafür, dass sie ausschlaggebend für eine erhöhte Kopienanzahl eines *orill*-basierten Replikons sind (Koch et al., 2012). Um die erhöhte Stabilität auszulösende Mutation in synVicII-1.8 zu finden, wurde dieser Kandidat komplett sequenziert. Es wurde eine Punktmutation im Replikationsursprung und eine im *gfp*-Terminator gefunden. Um diese zu testen, wurden diese Mutationen unabhängig von einander in synVicII eingebracht. Anschließend wurde die Stabilität bestimmt. Die Mutation im *gfp*-Terminator erhöhte nur leicht die Stabilität von synVicII, die Mutation im Replikationsursprung dagegen verringerte die Stabilität von synVicII. Der molekulare Mechanismus dahinter muss noch in weiteren Studien analysiert werden. In Zukunft könnte die

genetische Information zusätzlich noch auf ein tertiäres synthetisches Chromosom verteilt werden. Deswegen wurde die Diversität von Replikationsursprüngen von sekundären Chromosomen von verschiedenen *Vibrionaceae* im Hinblick auf die Eignung als tertiäres Chromosom getestet. Dazu wurden synthetische Chromosomen mit den Replikationsursprüngen von neun Mitgliedern der *Vibrionaceae* konstruiert. Alle synthetischen Chromosomen waren in *E. coli* MG1655 funktionell und alle Stämme zeigten ungefähr das gleiche Wachstumsverhalten. All diese Konstrukte wurden mittels Konjugation auf Kompatibilität untereinander untersucht und mit der Konjugationseffizienz eines *F ori*-basierten Replikons, der Positivkontrolle, verglichen. Die Experimente zeigten, dass die *Vibrio* Replikationsursprünge im Vergleich zur Positivkontrolle untereinander nicht kompatibel sind. Die *Vibrio* Replikationsursprünge scheinen daher zur gleichen Inkompatibilitätsgruppe zu gehören, aufgrund dessen man sie nicht in einer Zelle zusammen verwenden kann. Damit synVicII noch leichter genetisch zugänglich wird, wurde das Design von synVicII weiterentwickelt und verbessert. So wurde beispielsweise synVicII konjugations- und Modular Cloning-tauglich gemacht. Eine *lacZα-ccdB* Kasette wurde integriert, mit welcher die Blau-Weiß-Selektion und die Selektion auf lebende Zellen für das Auffinden rekombinanter DNA ermöglicht wird.

synVicII hat sich innerhalb dieser Arbeit zu einem wichtigen Werkzeug entwickelt, welches in unserer Arbeitsgruppe bereits als wertvolles Chromosomentestmodell verwendet wird.

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Waldminghaus wurde Celine Zumkeller im Rahmen Ihrer Bachelorarbeit von mir betreut. Celine Zumkeller führte die Southern-Blot-Analysen durch und konstruierte hierfür die synthetischen Chromosomen mit den homologen Bereichen. Ich wiederholte die Experimente. Der Evolutionstest sowie die ersten Ampicillin-Tests wurden ebenfalls von Celine Zumkeller durchgeführt. Nadine Schalopp wiederholte den Ampicillin-Test. Während Celine Zumkeller das *rctB* Gen von synVicII-1.10 sequenzieren ließ, war ich für die Sequenzierung der Replikationsursprünge von synVicII-1.8/9 zuständig. Anschließend ließ ich synVicII-1.8 komplett sequenzieren und die identifizierten Mutationen in *orill* und im *gfp*-Terminator wurden von mir in ein synVicII-1.3 Rückgrat eingebaut. Die Stabilität dieser Mutanten wurden von mir gemessen. Die synthetischen Chromosomen, welche auf verschiedene *Vibrionaceae* Replikationsursprüngen basieren, wurden von mir konstruiert. Die Vorversuche der Konjugationen wurden von Nadine Schalopp übernommen, die eigentlichen Konjugationen wurden von mir durchgeführt. Die Microarray-Analysen und der Einbau der FRT-Kasette wurden von Franziska Kemter übernommen. Der *oriT* wurde von Celine Zumkeller in synVicII inseriert. Die Verschiebung der *I-SceI* Restriktionsschnittstelle und das Testen des Flip-Systems wurden von Nadine Schalopp durchgeführt. Daniel Schindler war für das Entfernen der *BsaI/BpiI* Schnittstellen zuständig und machte damit synVicII MoClo kompatibel. Das Manuskript wurde von Prof. Dr. Waldminghaus und

mir entworfen. Daniel Schindler und Franziska Kemter haben bei Teilen des Material- und Methodenteils und den Abbildungen mitgewirkt.

6. Diskussion

6.1 Das sekundäre, synthetische Chromosom synVicII

In dieser Arbeit wurde das synthetische, sekundäre Chromosom synVicII, welches in der Zukunft in der Grundlagenforschung als Chromosomenmodell für das Testen von Chromosomenerhaltungssystemen und in der Biotechnologie eingesetzt werden soll, in *E. coli* entwickelt und analysiert.

In der Biotechnologie werden Bakterienstämme wie z.B. *E. coli* für die Produktion von z.B. rekombinanten Proteinen, Vitaminen und Aminosäuren genutzt (Lin et al., 2014; Rodriguez et al., 2014; Rosano and Ceccarelli, 2014). Die Produktionsstämme können durch Chromosommodifikationen, hauptsächlich durch Integration oder durch Deletion von genetischem Material konstruiert werden (Thomason et al., 2007). Die Veränderung des Chromosoms birgt großes Risiko und kann negativen Einfluss auf andere Zellprozesse nehmen (Asai et al., 1998; Mettrick and Grainge, 2016). Eine Alternative zur Modifikation des Chromosoms stellt die Verwendung von sekundären Replikons dar. Beliebte sekundäre Replikons sind Plasmide, welche das leichte Hinzufügen von DNA ermöglichen (del Solar et al., 1998). Bei Plasmiden werden strikt zwischen Replikons, welche in einer höheren Kopienzahl in der Zelle, sog. High-Copy Plasmide, und Replikons, welche in einer niedrigeren Kopienzahl in der Zelle vorliegen, sog. Low-Copy Plasmide, unterschieden (Jones et al., 2000). Eine höhere Kopienzahl für ein leicht manipulierbares Replikon, welches auch als Chromosomentestmodell verwendet werden soll, ist unerwünscht. Chromosomen liegen in einer niedrigen Kopienzahl vor und um Chromosomenerhaltungssysteme mit dem Replikon zu untersuchen sollte dieses Chromosomentestmodell auch in einer vergleichbaren niedrigen Kopienzahl vorliegen. Außerdem werden High-Copy Plasmide unter bestimmten Bedingungen z.B. in Medium ohne Antibiotikum instabil weitervererbt (Jones and Melling, 1984; Noack et al., 1981). Low-copy Plasmide liegen zwar in einer geringen Kopienzahl in der Zelle vor; nach meinem Wissen wurden bisher noch keine Fragmente, die größer als 12-Kbp sind, in Low-copy Plasmiden für die Manipulation von Bakterien integriert, obwohl natürlich vorkommende Low-Copy Plasmide in *E. coli* mit einer Größe von über 100 Kbp existieren (Holloway et al., 1987; Jones and Keasling, 1998). Für die genetische Manipulation von Bakterien könnte es aber nötig sein, dass große DNA-Fragmente transferiert werden müssen, weswegen der Vektor in der Lage sein sollte, große DNA-Fragmente zu tragen. Die meisten Plasmide v.a. High-Copy Plasmide replizieren außerdem asynchron und können an verschiedenen Zeitpunkten im Zellzyklus replizieren (Leonard and Helmstetter, 1988). Eine Ausnahme hierfür könnte das Low-Copy Plasmid, F-Plasmid, darstellen, von dem bisher widersprüchliche Studien bezüglich der zell-zyklus spezifischen Replikation publiziert worden sind (Cooper and Keasling, 1998; Helmstetter et al., 1997; Keasling et al., 1992).

Ein beliebtes Chromosomentestmodell in *E. coli* sind sog. *oriC*-Minichromosomen. Es handelt sich um sekundäre Replikons, welche *oriC* als Replikationsursprung besitzen und in der Zelle autonom replizieren können (Hiraga, 1976). Sie wurden schon wegen ihrer Ähnlichkeit zu einem Chromosom für viele Studien für die Untersuchung der Initiation und der Regulation der DNA-Replikation eines Chromosoms verwendet (Hiraga, 2000; Woelker and Messer, 1993). Ihre Verwendung als Chromosomentestmodell ist aber umstritten, weil z.B. Unterschiede in der Initiation der DNA-Replikation eines *oriC*-Minichromosoms und eines Chromosoms festgestellt worden sind (Asai et al., 1998). So konnte gezeigt werden, dass die Länge der *oriC*-Sequenz und die Anwesenheit von benachbarten Genen Einfluss auf die Funktion von *oriC* in *oriC*-Minichromosomen nehmen. Ein *oriC*-Minichromosom, in welchem die dem *mioC* zugewandten DnaA-R4-Box deletiert wurde, konnte in *E. coli* nicht replizieren (Woelker and Messer, 1993). Im Gegensatz dazu konnte das *E. coli* Chromosom an *oriC* in Abwesenheit dieser DnaA Box initiieren und somit replizieren (Bates et al., 1995). Mittels Durchflusszytometrie-Analysen konnte ein asynchroner Initiationsphänotyp nachgewiesen werden (Bates et al., 1995). Für die DNA-Replikation von *oriC*-Minichromosomen ist die Transkription der *oriC* benachbarten Genen *mioC* und *gidA* zwar nicht essentiell (Asai et al., 1998; Leonard and Helmstetter, 1986; Tanaka and Hiraga, 1985); dennoch erhöhte die Anwesenheit von *mioC* und damit vermutlich die Transkription des Gens die Kopienzahl und somit auch die Stabilität von *oriC*-Minichromosomen (Bates et al., 1997; Lobner-Olesen and Boye, 1992). Transkription von *mioC* und *gidA* wird für die Initiation von *oriC* in *oriC*-Minichromosomen benötigt, wenn in diesen IHF deletiert wurde (Kano et al., 1991). Dagegen ist die Transkription von *mioC* und *gidA* für die Initiation des chromosomalen *oriC* unter gleichen Bedingungen nicht wichtig (Bates et al., 1997). Eine Erklärung für diese Diskrepanz zwischen *oriC*-basierten Replikons und chromosomalen *oriC* ist, dass die beiden Replikationsursprünge in topologisch unterschiedlichen Zuständen vorliegen könnten (Asai et al., 1998). Dafür spricht, dass chromosomaler *oriC* in Abwesenheit der DnaA-R4-Box Transkription von den flankierenden Genen benötigt (Bates et al., 1997). Transkription verändert die lokale Superhelizität der DNA. Dass die beiden Replikons unterschiedliche Anforderungen für Histon-ähnliche Proteine wie IHF besitzen, welche die DNA-Struktur von *oriC* verändern, deutet auch auf das Vorhandensein von topologisch unterschiedlichen Zuständen hin. Außerdem wurde gezeigt, dass *oriC*-Minichromosomen in unterschiedlichem Genkontext auch in das primäre Chromosom integrieren können (Lobner-Olesen, 1999; Messerschmidt et al., 2016; Skarstad and Lobner-Olesen, 2003). *oriC*-Minichromosomen sind mit diesen Eigenschaften also nicht unbedingt geeignet, um sie als Chromosomentestmodell oder in der Biotechnologie einzusetzen.

Neben Plasmiden wurden auch sog. Chromide als sekundäre Replikons beschrieben (Harrison et al., 2010). Der Begriff des Chromids ist auf die Mischeigenschaften eines Chromosoms und eines

Plasmids zurückzuführen, welches ein solches Replikon besitzt. Ein Chromid besteht demzufolge aus der gleichen Nukleotidzusammensetzung wie das primäre Chromosom und der G+C-Gehalt weicht maximal um 1 % von dem des primären Chromosoms ab. Außerdem kodiert es ebenso wie das Chromosom sog. essentielle „Core“-Gene. Die konservierten Core-Gene sind in der gleichen Reihenfolge auf Chromosomen anderer Spezies zu finden. Als Plasmideigenschaft besitzt das Chromid ein für Plasmide typisches Replikations- und Plasmiderhaltungssystem. Zu diesem DNA-Replikationssystem gehört ein eigenes Initiatorprotein, welches die DNA-Replikation unabhängig von der des Chromosoms steuert. Ein Chromid ist außerdem das größte sekundäre Replikon in einer Zelle.

V. cholerae ist ein γ -Proteobakterium, welches nach der Definition von Harrison et al. ein Chromid besitzt. Der Mikroorganismus besitzt zwei unterschiedlich große Chromosomen (Heidelberg et al., 2000). Bei dem Chromid handelt es sich um das sekundäre und kleinere Chromosom, welches einen Plasmid-ähnlichen Replikationsursprung mit eigenem Initiator (RctB) und ein eigenes Segregationssystem besitzt (Egan and Waldor, 2003; Yamaichi et al., 2007b). Das sekundäre *V. cholerae* Chromosom trägt essentielle Gene und repliziert zell-zyklus spezifisch, weswegen es als sekundäres Chromosom angesehen wird (Egan et al., 2004; Heidelberg et al., 2000). Das in dieser Arbeit etablierte synthetische, sekundäre Chromosom synVicII wurde auf Basis des sekundären Chromosoms von *V. cholerae* entwickelt (Messerschmidt et al., 2015). In dieser Arbeit wurde synVicII beschrieben und gezeigt, dass synVicII schon wichtige Chromosomeneigenschaften besitzt. Sekundäre Chromosomen wie beispielsweise die von *V. cholerae* werden stabil weiter vererbt (Yamaichi et al., 2007b). Wie mit dem eigens entworfenen Durchflusszytometrie-basierten Stabilitätstest gezeigt wurde, ist synVicII mit einer Replikonverlustrate von -8 % bzw. -6 % pro h stabiler als ein *oriC*-basiertes Replikon mit einer Replikonverlustrate von -25 %/h (Messerschmidt et al., 2015). Dennoch ist synVicII nicht so stabil wie ein F *ori*-basiertes Replikon, welches 100 % stabil war. Um synVicII in der Grundlagenforschung als Chromosomenmodell einzusetzen, um beispielsweise stabilisierende DNA-Sequenzen zu testen, ist diese moderate Stabilität von synVicII völlig ausreichend. Durch den Einbau von möglichen stabilisierenden DNA-Sequenzen könnte mit der moderaten Stabilität von synVicII analysiert werden, ob diese sich noch auf eine 100 %ige Stabilität steigern lässt. Wenn synVicII in der Biotechnologie eingesetzt werden soll, sollte die Stabilität verbessert werden (siehe auch 6.2.1). Ein Ansatz in diese Richtung sind die in dieser Arbeit entwickelten Evolutionsexperimente, mit welchem erfolgreich stabilere synVicII-Varianten identifiziert worden sind (Messerschmidt et al., 2016, in revision).

synVicII besitzt relativ zu *oriC*, dem Replikationsursprung von dem *E. coli* Chromosom, eine geringe Kopienzahl zwischen 0,5-0,7, was anhand von qPCR und Microarray-Analysen mit exponentiell wachsenden Zellen abgeleitet werden konnte (Messerschmidt et al., 2015). Die niedrigere Kopienzahl

von synVicII im Vergleich zu der von *oriC* deutet daraufhin, dass synVicII später als das Hauptchromosom initiiert. Der Replikationsursprung *oriII* des sekundären Chromosoms in *V. cholerae* liegt im Vergleich zum Replikationsursprung des primären Chromosoms auch in einer niedrigeren Kopienzahl vor, was zeigt, dass zuerst Chromosom I die DNA-Replikation startet und dann Chromosom II folgt (Rasmussen et al., 2007; Val et al., 2016). synVicII scheint also in *E. coli* ähnlich zu replizieren als das sekundäre Chromosom in *V. cholerae*. Für die Interpretation der Kopienzahlen von synVicII in den durchgeführten Kopienanzahl-Analysen wurde angenommen, dass synVicII wie das sekundäre Chromosom in *V. cholerae* zu einem definierten Zeitpunkt zell-zyklus spezifisch repliziert. Ob dies wirklich der Fall ist, muss noch mit einer geeigneten Methode getestet werden. Eine solche Methode wird im nächsten Abschnitt erklärt.

6.1.1 Repliziert synVicII zell-zyklus spezifisch?

Ob synVicII zell-zyklus spezifisch repliziert, könnte mithilfe modifizierter Meselson-Stahl-Experimente nachgewiesen werden (Olsson et al., 2002). Mit der Etablierung dieser Methode wurde während dieser Arbeit begonnen. Der synVicII tragende *E. coli* Stamm (SMS18) wird zunächst in Medium mit schwerem Kohlenstoff und Stickstoff angezogen (Abb. 6). In der frühen exponentiellen Phase wird der Stamm in frisches Medium mit leichtem Kohlenstoff und Stickstoff überführt und weiter kultiviert. Durch die semi-konservative DNA-Replikation wird die schwere DNA in leichte umgebaut. Die DNA besteht anfangs aus zwei schweren Strängen. Die beiden schweren DNA-Stränge werden in einer Runde der DNA-Replikation in zwei leicht-schwere DNA-Stränge umgesetzt. In der nächsten Runde werden die beiden leicht-schweren DNA-Stränge in einen schwer-leichten und einen leichten-leichten DNA-Strang umgewandelt, aus welchen im nächsten Zyklus zwei leichte DNA-Stränge entstehen. Nach der Überführung in das leichte Medium werden an geeigneten Zeitpunkten Zellproben entnommen und die Gesamt-DNA isoliert. Diese wird anschließend verdaut und in einem CsCl Gradienten aufgetrennt (Abb. 6). Je nach vorliegender Art der DNA ist sie in einer anderen Schicht des Gradienten angeordnet: Schwere DNA befindet sich im unteren Bereich, schwer-leichte DNA im mittleren und leichte DNA im oberen Bereich. Der Gradient wird anschließend fraktioniert. Die Fraktionierung erfolgt über das Auffangen der Proben in einer 96-Well Platte. Die relative Menge und die Art der drei unterschiedlichen DNA-Typen kann in einem Dot Blot nachgewiesen werden. Die DNA wird mit dem DIG System von Roche detektiert. Da ein Chromosom nur einmal an einem bestimmten Zeitpunkt pro Zellzyklus die DNA-Replikation initiiert, kann schwere und leichte DNA nie gleichzeitig auftreten. Bei Plasmiden hingegen, welche an verschiedenen Zeitpunkten im Zell-Zyklus die DNA-Replikation starten, kann man in einer Probe zur selben Zeit schwere und leichte DNA nachweisen.

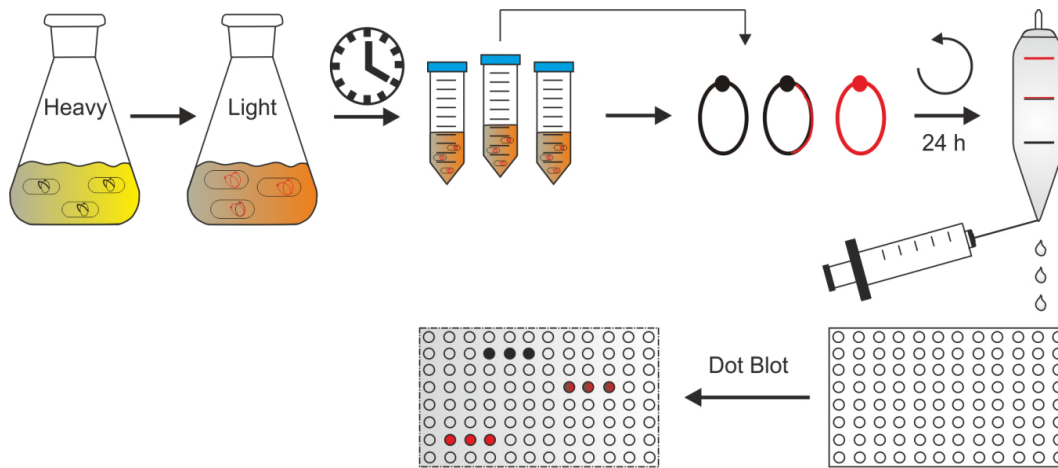


Abb. 6: Schema für den Ablauf eines modifizierten Meselson-Stahl-Experimentes zur Identifizierung von Zellzyklus kontrolliert replizierenden Replikons. Beschreibung der Methode siehe Text.

Für diese aufwändigen Experimente musste jeder Schritt einzeln sorgfältig etabliert werden. Zunächst musste für die Kultivierung der Stämme ein geeignetes Medium gefunden werden. Wachstumsexperimente im Schüttelkolben zeigten, dass der synVicII tragende *E. coli* MG1655 Stamm am besten bei 37°C in M9 Minimalmedium mit 6 mM Glukose wächst (Daten nicht gezeigt). Deshalb sollte für die eigentlichen Meselson-Stahl-Experimente dieses Medium verwendet werden. Für die weiteren Vorexperimente wurde jedoch ein synVicII tragender *E. coli* λ pir Stamm (SMS13) verwendet, welcher durch Replikation des *oriR6K* Replikationsursprungs eine höhere Kopienzahl von synVicII besitzt. Des Weiteren wurde der Stamm in M9 Medium mit Casaminosäuren (CasAs) kultiviert, da der Stamm hier schneller im schweren Medium wächst als ohne Zusatz von CasAs. Für die DNA-Auftrennung im CsCl-Gradienten mittels Ultrazentrifugation wurden verschiedene CsCl-Konzentrationen ausgetestet. Hierbei stellte sich heraus, dass eine CsCl-Konzentration von 1,687 g/mL ideal für die Auftrennung von schwerer und leichter DNA ist. Die Fraktionierung musste sorgfältig geplant werden. Das Ultrazentrifugationsröhrchen (UZ-Röhrchen) wurde möglichst erschütterungsfrei in eine geeignete Apparatur eingespannt. Mit einer heißen Kanüle wurde vorsichtig ein Loch in den Boden und im oberen Bereich seitlich des UZ-Röhrchens eingefügt. Anschließend erfolgte die Fraktionierung per Tropfen in die 96-well Platte. Für die modifizierten Meselson-Stahl-Experimente sollte die DNA-Replikation von synVicII in *E. coli* mit der DNA-Replikation von synEsc, einem *oriC*-basierten Replikon, verglichen werden. Um die Replikons im Dot Blot detektieren zu können, muss die DNA markiert werden. Da beide Replikons eine Ampicillinresistenz tragen, wurde eine DIG-markierte AmpR-Sonde hergestellt. In den fraktionierten Gradientenproben konnte so im Dot Blot tatsächlich schwere und leichte synVicII DNA nachgewiesen werden (Abb. 7). Nach Kultivierung von SMS13 einerseits in schweren M9-CasAs und andererseits in leichtem M9-CasAs Medium wurde mit größeren Zellmengen (~100 ml) eine Midi-Präparation

durchgeführt. Anschließend erfolgte eine DNA-Fällung, um genügend schweres und leichtes synVicII zu isolieren, von welchem 1,25 µg in den CsCl-Gradienten eingesetzt wurde. Obwohl die Etablierung der Methode erfolgreich war, konnten die eigentlichen Experimente nicht durchgeführt werden. Die Isolierung von synVicII in *E. coli* MG1655, welcher zunächst in schwerem M9 Medium und dann in leichtem M9 Medium kultiviert wurde, gestaltete sich sehr schwierig. Mit verschiedenen DNA-Isolationsmethoden konnte nicht genügend DNA isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise war die verwendete Ausgangsmenge an Zellmaterial nicht ausreichend. Das bedeutet, dass in Zukunft deutlich mehr Material an Zellkultur für die Isolierung der DNA genutzt werden muss. Eine andere Möglichkeit wäre, dass man das Replikationsverhalten von synVicII mit dem Replikationsverhalten des *E. coli* Chromosoms vergleicht. Hierfür wird für die modifizierten Meselson-Stahl-Experimente nicht nur synVicII isoliert, sondern die Gesamt-DNA. Die Gesamt-DNA könnte dem CsCl-Gradient und dem Dot Blot unterworfen werden. Für den Dot Blot müssten lediglich zwei unterschiedliche DIG markierte Sonden verwendet werden: Eine chromosomale Sonde, z.B. eine *gidA*-Sonde könnte das *E. coli* Chromosom detektieren und die AmpR-Sonde könnte synVicII detektieren. Ein solcher Ansatz wurde ebenso bereits in dieser Arbeit durchgeführt. Jedoch wurden hierfür, analog zu einem Protokoll, nur 100 ng Gesamt-DNA verwendet und im Dot Blot war keine DNA zu detektieren. Wie aus den beschriebenen Vorexperimenten hervorgeht (hier wurden 1,25 µg verwendet), wurde vermutlich zu wenig DNA in den Experimenten eingesetzt. Deshalb sollte für einen Vergleich von Chromosom zu sekundärem Replikon sicherlich mehr DNA eingesetzt werden.

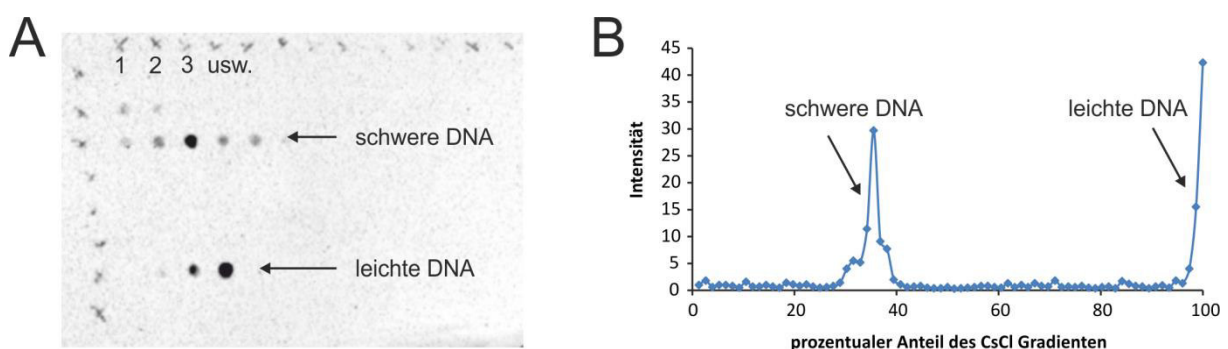


Abb. 7: Dot Blot für die Quantifizierung von schwer-schwerer und leicht-leichter DNA. A. In einem CsCl-Gradienten wurde schweres synVicII und leichtes synVicII in gleichen Mengen aufgetrennt. Nach der Fraktionierung des Gradienten in eine 96-Well Platte wurde mit einem Dot Blot die schwer-schwere und die leicht-leichte DNA nachgewiesen. Die DNA in den Proben wurde mit einer DIG markierten AmpR Sonde, welche spezifisch an synVicII bindet, detektiert. Da der CsCl Gradient automatisch von unten nach oben geeirnet wird, befindet sich zuerst in den Proben die schwere DNA und als letztes die leichte DNA. B Mithilfe des Dot Blots in A kann anhand des Detektionssignals der DNA die Intensität mit dem Programm „Image Lab 4.1.0“ relativ zu einer Referenzprobe berechnet werden. Die Intensität korreliert mit der DNA-Menge. Um zu bestimmen, in welchem Bereich des CsCl Gradienten sich die schwere DNA und die leichte DNA befinden, wurde die Intensität gegen den Prozentanteil des CsCl Gradienten geplottet.

6.1.2 synVicII und seine Verwendung als Chromosomentestmodell

Nichtsdestotrotz bleibt die Frage, ob synVicII als synthetisches, sekundäres Chromosom in *E. coli* geeignet ist, um als Chromosomenmodell eingesetzt zu werden? synVicII ist wie oben schon genannt nicht 100 % stabil - eine Tatsache, welche es für die Untersuchungen von stabilisierenden DNA Sequenzen prädestiniert. Über MoClo Klonierungen können effizient DNA-Motive wie, z.B. *ter*-Sequenzen eingebaut werden. Ob sich dadurch die Stabilität von synVicII erhöht, kann mit dem Durchflusszytometrie-basierten Test analysiert werden (Messerschmidt et al., 2015).

Aber auch der Einfluss von ganz anderen DNA-Motiven auf die Chromosomenorganisation kann mit synVicII getestet werden. Ein noch nicht vollständiger verstandener Prozess ist beispielsweise die funktionelle Interaktion zwischen MutH, welches am DNA-Mismatch-Reparatur-System beteiligt ist, und von SeqA, dem Sequestrationsprotein. Beide Systeme benötigen hemimethylierte GATC-Sequenzen, welche hinter der DNA-Replikationsgabel entstehen (Lee et al., 2005; Lu et al., 1994; Slater et al., 1995; Waldminghaus and Skarstad, 2009). Kommt es zu einer Basenfehlpaarung während der DNA-Replikation, muss das DNA-Mismatch-Reparatur-System den neu replizierten und damit den „geschädigten“ DNA-Strang erkennen. Durch die semi-konservative DNA-Replikation liegt der neu replizierte DNA-Strang, in welchem es zu der Basenfehlpaarung gekommen ist, nicht methyliert vor. Am DNA-Mismatch-Reparatur-System in *E. coli* sind u.a. die Proteine MutS, MutL und MutH beteiligt (Li, 2008). MutS erkennt den Fehler und bindet als Dimer an die DNA. MutL bildet mit MutS einen Komplex, wobei MutL dann MutH rekrutiert und aktiviert (Li, 2008). MutH bindet an das hemimethylierte GATC-Motiv und schneidet den neu replizierten Strang, sodass anschließend die DNA repariert werden kann. Während MutH nur ein einzelnes GATC-Motiv benötigt, bindet SeqA als Dimer an zwei GATC-Motive, welche in einem bestimmten Abstand in räumlicher Nähe liegen müssen. Da SeqA die Remethylierung verzögert, könnte SeqA das Zeitfenster bestimmen, in dem MutH schneiden kann. Ob MutH für das Schneiden des neu replizierten Stranges in Anwesenheit von SeqA länger Zeit hat, ist nicht bekannt. Dieser Sachverhalt kann mit der Konstruktion eines großen synthetischen Chromosoms und einer spezifischen GATC-Motiv Verteilung näher untersucht werden. Mit dem MoClo-Klonierungssystem ist es bereits gelungen, drei synthetische Chromosomen ausgehend von synVicII-2.0 als Rückgrat zu konstruieren (Schindler and Waldminghaus, in preparation): Chromosom I besitzt GATC-Sequenzen in einem solchen Abstand, dass MutH und SeqA daran binden können. Chromosom II besitzt nur GATC-Sequenzen in nicht direkter Nachbarschaft, sodass nur MutH und nicht SeqA daran binden kann. Chromosom III besitzt gar keine GATC-Sequenzen, außer die des Rückgrats von synVicII. Infolgedessen kann weder MutH noch SeqA daran binden. Alle drei Chromosomen sind ungefähr 100 Kbp groß. Das experimentelle Design der Chromosomen, welches die SeqA-Bindung nur an zwei GATC-Sequenzen im richtigen Abstand zulässt, konnte mit Chip-Seq Daten bestätigt werden (Schindler and Waldminghaus, in preparation): SeqA

kann nur an Chromosom I und nicht an Chromosom II und III binden. Um Einblicke in die Interaktion zwischen SeqA und MutH zu bekommen, wurde eine Mutagenese über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Es ist zu erwarten, dass in Chromosom I eine vergleichbare Mutationsrate zu der des *E. coli* Chromosoms vorliegt, weil das Mismatch-Reparatur-System funktionieren sollte. Da in Chromosom III das Mismatch-Reparatur-System durch die Nicht-DNA-Bindung von MutH den geschädigten DNA-Strang nicht reparieren kann, ist für Chromosom III eine hohe Mutationsrate zu erwarten. Über die zu erwartende Mutationsrate von Chromosom II kann man nur spekulieren. Wenn Dam hinter der DNA-Replikationsgabel die GATC-Motive sofort remethyliert und dann MutH wegen der zu kurzen Zeitspanne der Hemimethylierung nicht agieren kann, dann könnte eine höhere Mutationsrate als wie für Chromosom II zu erwarten sein. Wenn MutH auch ohne SeqA seine Funktion ausüben kann, dann könnte eine zu Chromosom I vergleichbare niedrige Mutationsrate nachzuweisen sein. Nach der Mutagenese zeigte sich, dass in Chromosom III wie erwartet die Mutationsrate im Vergleich zu den beiden anderen Chromosomen deutlich erhöht ist. Für die beiden anderen Chromosomen werden gerade noch weitere statistische Analysen durchgeführt, um eine signifikante Aussage treffen zu können. Neben der funktionellen Interaktion zwischen MutH und SeqA kann mit synVicII als Chromosomenmodell und dem Stabilitätstest auch getestet werden, ob die unterschiedliche GATC-Verteilung auf synVicII Einfluss auf die Segregation und damit auf die Stabilität eines Chromosoms nimmt. Die durchgeführten Stabilitätsmessungen zeigten, dass die unterschiedliche GATC-Verteilung keinen Einfluss auf die Stabilität hat, da es zwischen den einzelnen Chromosomen kein Unterschied in der Stabilität gab. Die Stabilitäten der drei Chromosomen waren im Vergleich zu synVicII-2.0 jedoch vermutlich durch die Größe stark herabgesetzt. Anhand dieses Beispiels konnte also erfolgreich gezeigt werden, dass synVicII tatsächlich als Chromosomenmodell in der Genetik eingesetzt werden kann, um DNA-Motive und deren Einfluss auf funktionelle Interaktionen zu untersuchen.

6.2 Ist synVicII in der Biotechnologie einsetzbar?

Eine wichtige Anwendung synthetischer Chromosomen ist die in der Biotechnologie (Birchler, 2015). Mithilfe synthetischer Chromosomen soll es in der Zukunft gelingen, die Produktivität von eingesetzten Herstellorganismen zu steigern oder sogar neue Produktionsstämme mit neuen Produkten herzustellen. synVicII könnte ein solches, synthetisches Chromosom sein, welches z.B. *E. coli* gentechnisch so verändern könnte.

6.2.1 Wie modulierbar sind die DNA-Replikationseigenschaften von synVicII?

Für den Einsatz in der Biotechnologie ist es von Vorteil, wenn die DNA-Replikationseigenschaften des verwendeten Replikons variabel und modulierbar sind. Eine Veränderung der Struktur des Replikons oder eine Integration des Replikons in das Chromosom machen die Regulation von z.B. bestimmten Stoffwechselwegen für biotechnologische Anwendungen schwierig. Eine wichtige Eigenschaft hierfür bringt synVicII, wie in dieser Arbeit mit Southern-Blot-Experimenten gezeigt wurde, bereits mit: synVicII integriert nämlich nicht in das primäre *E. coli* Chromosom (Messerschmidt et al., 2016, in revision). Andere Replikons, welche in andere integrieren, zerstörten den genetischen Kontext ihrer DNA-Sequenz (Haldimann and Wanner, 2001). synVicII besitzt also in dieser Hinsicht großes Potenzial für die Biotechnologie. In gentechnisch veränderten Mikroorganismen können unter Verwendung von synthetischen Operons mehrere Gene, welche sonst in unterschiedlichen Operons liegen, gleichzeitig exprimiert werden (Ravasi et al., 2012). In manchen Fällen sind aber Koexpression der Gene und somit das Vorliegen der Genprodukte zur gleichen Zeit unerwünscht, da sie toxisch sind oder inkompatible Reaktionen katalysieren (Moyed et al., 1983; Ravasi et al., 2012). Die Expression der Gene kann zeitlich getrennt werden, wenn Gencluster mit mehr als nur einer Transkriptionseinheit verwendet werden (Ravasi et al., 2012). In der Transkriptionseinheit kann jedes Gen oder jede Gruppe von Genen unter die Kontrolle eines unabhängigen Promoters gesetzt werden. Eine Alternative hierfür könnte auch sein, dass man die Genexpression nicht auf dem Level der Transkription reguliert, sondern durch eine unterschiedliche Kopienzahl von Replikons steuert. Man könnte also je nach Anwendung eine niedrige oder eine hohe Kopienzahl des Replikons benötigen. Hierfür könnte auch synVicII und das modulierbare Initiatorgen *rctB* verwendet werden. Eine Publikation zeigte, dass ein Aminosäureaustausch in RctB ausreichend ist, um einen Phänotypen mit erhöhter Kopienzahl zu generieren (Koch et al., 2012). Für das Screenen nach Copy-up-*orill*-Minichromosomen wurden *E. coli* Zellen mit *orill*-Minichromosomen in Kanamycin-haltigem Medium angezogen und anschließend auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert. Das *orill*-Minichromosom konnte nur in 14 % der Zellen nachgewiesen werden (Koch et al., 2012). Es wurde beobachtet, dass die instabilen *orill*-Minichromosomen unter selektiven Wachstumsbedingungen Mutationen anhäufen, welche einen Aminosäureaustausch an z.B. Position 269, 381 und 439 in RctB auslösen. Eine dieser Punktmutation in *rctB* reichte aus, um die *orill*-Minichromosomen Kopienzahl von ungefähr 1 auf eine Kopienzahl von 24-75 zu erhöhen, was anhand von Southern Blots gezeigt werden konnte. Die RctB-Copy-up-Mutanten konnten außerdem nicht mehr Dimere bilden und an die 39-mere in *orill* binden, was daraufhin deutet, dass RctB statt an die hemmenden 39-mere zu binden, vermehrt an die aktivierenden Iterone im minimalen *orill* bindet (Koch et al., 2012). Copy-up-Mutanten wurden auch schon für andere Replikons und deren Initiatorgen beschrieben (Fang et al., 1993; Wadood et al., 1997). In dieser Arbeit war es mit dem durchgeführten Evolutionsexperiment

auch gelungen, synVicII-Varianten mit einer Punktmutation in RctB zu generieren (Messerschmidt et al., 2016, in revision). Hier wurde beispielsweise ein Serin gegen ein Tyrosin an Aminosäureposition 555 in RctB ausgetauscht. RctB ist ein Protein, welches aus 658 Aminosäuren besteht (Jha et al., 2014). Eine Kristallstruktur von RctB konnte bisher noch nicht generiert und analysiert werden. Über die Proteindomänen von RctB ist außerdem auch nicht so viel bekannt. Der in dieser Arbeit gefundene Aminosäureaustausch findet in der C-terminalen Domäne von RctB statt. Die C-terminale Domäne konnte deletiert werden, ohne dass die Initiation an *orill* durch RctB beeinträchtigt war. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass es einen 71-Aminosäure-umfassenden Bereich gibt, welcher gleichzeitig für die DNA-Bindung an 12-mere und 39-mere und für die Dimerisierung von RctB wichtig ist (Jha et al., 2014). Die anderen ausgetauschten Aminosäuren an Position 269, 381 und 439, welche zu einem Copy-up Phänotypen der *orill*-Minichromosomen führten, liegen in RctB ausserhalb dieses Bereiches in Richtung N-Terminus. Sie könnten ebenfalls in einer Domäne liegen, welche überlappend für die DNA-Bindung und die Dimerisierung zuständig ist, da die Copy-up-Mutanten nicht mehr Dimere bilden und an die 39-mere binden konnten (Jha et al., 2014). Die Punktmutation in *rctB* für eine Copy-Up-Mutante müsste also in einer überlappenden DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne von RctB liegen oder in einer ganz anderen bisher unbekanntem Domäne, wie es der Fall für die in dieser Arbeit identifizierten Copy-up-Mutante ist. Es könnten also verschiedene synVicIIs mit verschiedenen Punktmutationen in *rctB* gebaut werden, welche dann in *E. coli* eingebracht und getestet werden müssen. Auf diese Weise könnte also ein *E. coli* Stamm mit einem synthetischen, sekundären Chromosom mit unterschiedlichen Kopienzahlen generiert werden. Ein ganz anderes, interessantes Regulationselement von synVicII könnte die in *V. cholerae* erst kürzlich beschriebene *crts*-Sequenz sein (Baek and Chatteraj, 2014; Val et al., 2016). Mit der *crts*-Sequenz konnte gezeigt werden, wie das *V. cholerae* Chromosom I mit Chromosom II kommuniziert. Die *crts*-Sequenz liegt ungefähr in 2/3 Entfernung vom Replikationsursprung *oril*. Interessanterweise löst die Replikation dieser Sequenz mit einer kurzen Verzögerung die Initiation der DNA-Replikation des Chromosoms II aus (Val et al., 2016). Die *crts*-Sequenz ist also u.a. für die in *V. cholerae* vorherrschende Terminationssynchronie der beiden Chromosomen verantwortlich (Val et al., 2016). Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt. Durch diese Regulationssequenz eröffnen sich für die Zukunft und den Einsatz von synVicII in der Biotechnologie noch nie dagewesene Optionen: Für manche Anwendungen ist es wichtig, dass ein Replikon nämlich erst zu einem ganz bestimmten Zeitpunkt repliziert wird. Vorausgesetzt, dass der *crts*-Mechanismus auch in *E. coli* funktioniert, könnte man durch den Einbau der *crts*-Sequenz in das *E. coli* Chromosom auch den Zeitpunkt der DNA-Replikation von synVicII steuern. In *E. coli* war die relative Kopienzahl eines *orill*-basierten Minichromosoms in Anwesenheit der *crts*-Sequenz auf einem Plasmid höher als im Vergleich des *orill*-basierten Minichromosoms in Abwesenheit der *crts*-Sequenz (Baek and Chatteraj, 2014). Des

Weiteren erfolgt die durch die *crts*-Sequenz verstärkende Replikation des *orill*-Replikons ohne die Einschränkung der hemmenden Aktivität von z.B. 39-mer, da die Kopienzahl in *E. coli* sowohl von 39-mer tragenden *orill*-Replikons als auch nicht 39-mer tragende *orill*-Replikons erhöht war (Baek and Chatteraj, 2014). Mit qPCR-Analysen konnte in *V. cholerae* gezeigt werden, dass die *crts*-Sequenz auf einem Plasmid zu einem höheren *orill/terII* Verhältnis führt als in Abwesenheit der *crts*-Sequenz auf dem verwendeten Plasmid (Baek and Chatteraj, 2014). In *V. cholerae* wurde außerdem die *crts*-Sequenz auf dem ersten Chromosom in Richtung *oril* verschoben, wodurch der Zeitpunkt der Initiation der DNA-Replikation des zweiten Chromosoms früher erfolgte (Val et al., 2016). Durch Verschieben der Position der *crts*-Sequenz auf dem *E. coli* Chromosom könnte man theoretisch den Zeitpunkt der DNA-Replikation von synVicII kontrollieren. Wird eine höhere Kopienzahl von synVicII benötigt, könnte der Einbau von zusätzlichen *crts*-Sequenzen auf dem *E. coli* Chromosom zu einem solchen Copy-up-Phänotyp führen. Ob synVicII und seine besondere Regulation immer noch wie gewünscht funktioniert, müsste getestet werden. In *V. cholerae* wurde jedenfalls gezeigt, dass ein Mutantenstamm mit einer zusätzlichen *crts*-Sequenz auf dem ersten Chromosom tatsächlich in doppelter Kopienzahl für das Chromosom II vorlag (Val et al., 2016). Die Kopienzahl des ersten Chromosoms war unverändert. Hierbei machte es keinen Unterschied, ob die zusätzliche *crts*-Sequenz in gleicher Entfernung zu *oril* (Mutante 1) oder ob die zusätzliche *crts*-Sequenz näher an *oril* positioniert wurde (Mutante 2), sodass eine *crts*-Sequenz vor der anderen repliziert wird. Die Kopienzahl erhöhte sich in beiden Fällen von zwei auf vier Kopien (Val et al., 2016). Im Gegensatz dazu konnten Unterschiede bei den Zellteilungsphänotypen beobachtet werden. Bei beiden Mutantenstämmen verlief zwar interessanterweise die Zellteilung asymmetrisch. Bei Mutante 1 lagen aber nach der Zellteilung genauso oft 3 Chromosomen wie 2 Chromosomen II vor. Dagegen waren in Mutante 2 öfters 3 Chromosomen II als 2 Chromosomen II zu finden. Diese Unterschiede in den Mutantenstämmen deuten darauf hin, dass in der Mutante 2 möglicherweise einer der beiden *orill* früher repliziert als der andere. Dies würde bedeuten, dass die Unterschiede der Position und der Zeitpunkt der DNA-Replikation der *crts*-Sequenz auf Chromosom II die Initiationsynchronie von mehreren Replikationsursprüngen verändert und dadurch durcheinander bringt. Ob dies in *V. cholerae* wirklich der Fall ist, muss mit weiteren Experimenten aufgeklärt werden. Würde die Position der zusätzlichen *crts*-Sequenz auf dem *E. coli* Chromosom wirklich die synchrone Initiation von synVicII negativ beeinflussen, wäre das für die bisherigen Eigenschaften von synVicII fatal. Um zu zeigen, dass der Triggermechanismus der *crts*-Sequenz auch in *E. coli* funktioniert, könnten nach der Integration der *crts*-Sequenz in das *E. coli* Genom Marker-Frequency-Analysen durchgeführt werden. Um synVicII in der Biotechnologie als Replikon einzusetzen, müsste die relative Stabilität von synVicII noch hinreichend verbessert werden. In der Biotechnologie sind nämlich stabile Replikons dringend notwendig. Das führt direkt zu der Frage, was bedeutet und bestimmt Stabilität überhaupt? Laut

unserer Definition bedeutet Stabilität, wie oft ein Replikon während der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben wird. Die einfachste Möglichkeit, ein Replikon stabiler zu machen, ist das Integrieren von essentiellen Genen oder das Einfügen von Toxin-Antitoxin-Systemen (Kroll et al., 2010). Hier wird das Replikon stabil aufrechterhalten, da in Abwesenheit des Replikons der Organismus sterben würde. Das Einfügen von solchen DNA-Sequenzen führt genau genommen also nicht zur Erhöhung der Stabilität, sondern führt nur zur Abnahme der Zellen, welche kein Replikon besitzen. Es handelt sich also um negative Selektion. In dieser Arbeit konzentriert man sich aber auf die „intrinsische“ Stabilität, wodurch eine positive Selektion durchgeführt wird.

6.2.1.1 Verbesserung der Stabilität durch den Einbau von stabilisierenden DNA-Sequenzen

Um die Stabilität von synVicII zu erhöhen, könnten also stabilisierende Chromosomenerhaltungsmotive in synVicII eingebaut werden. Angriffspunkte für die Erhöhung der Stabilität sind hierfür beispielsweise die Segregation, die Chromosomen-Dimer-Auflösung und die Termination der DNA-Replikation. Eine Idee ist, dass synVicII mit zusätzlichen *parSII*-Sequenzen versehen wird. Infolgedessen könnte die Segregation von synVicII effizienter ablaufen. In *V. cholerae* trägt Chromosom II 9 *parSII*-Sequenzen und das in dieser Arbeit konstruierte 100 % stabile synF-Plasmid trägt 12 Centromer-ähnliche Sequenzen. In der Masterarbeit von Joel Eichmann wurde bereits zusätzlich eine bzw. zwei *parSII*-Sequenzen für ein ca. 50-Kbp-großes synVicII verwendet. Unerwarteterweise zeigte sich, dass drei *parSII*-Sequenzen das System instabiler machen, obwohl vermutlich kein Segregationsdefekt vorliegt, was anhand von ersten Fluoreszenzmikroskopie-Daten abgeleitet werden konnte. Das Chromosom, welches zusätzlich nur eine zusätzliche *parSII*-Sequenz trägt, zeigte eine vergleichbare Stabilität zu der von synVicII. Eine Erklärung für die Instabilität des Chromosoms mit den drei *parSII*-Sequenzen könnte sein, dass das Chromosom in verschiedene Richtungen gegensätzlich bewegt wird. In *V. cholerae* bindet ParBII an *parSII* und der ParBII-*parSII*-Komplex wird durch ParA von der Zellmitte, in der sich das sekundäre, replizierende Chromosom befindet, auf die $\frac{1}{4}$ Position in der Zelle gezogen (Ramachandran et al., 2014). Durch die entgegengesetzten Bewegungen der drei ParB-*parSII*-ParA-Komplexe von synVicII könnten die Chromosomen schlechter segregiert werden, was zu einer verringerten Stabilität führt. Zudem könnten sich auch die *parSII*-Sequenzen in synVicII an der falschen Position im Chromosom befinden. Schließlich ist bekannt, dass sich DNA-Motive nicht zufällig an irgendwelchen Chromosomenpositionen befinden, sondern die Position der DNA-Motive hängt mit der Funktion zusammen (Messerschmidt and Waldminghaus, 2014; Touzain et al., 2011).

Eine andere Möglichkeit, die Stabilität von synVicII zu verbessern, ist der Einbau von KOPS-Sequenzen (=FtsK orienting polar sequences) und einer *dif*-Sequenz. KOPS-Sequenzen liegen in *E. coli* von *oriC* zur *dif*-Sequenz, welche sich in der Terminus-Region befindet, orientiert vor. Durch die DNA-

Replikation von zirkulären Chromosomen, wie sie in *E. coli* vorliegen, können Chromosomen-Dimere entstehen. Diese Chromosomen-Dimere müssen aufgelöst werden, bevor die Chromosomen segregiert werden können und die Zellteilung stattfinden kann. An den vom Replikationsursprung zur *dif*-Sequenz orientierten KOPS-Sequenzen wird FtsK, die DNA-Translokase, beladen, welche die *dif*-Sequenz aufsucht (Lowe et al., 2008; Perals et al., 2000; Sivanathan et al., 2006). FtsK translokalisiert DNA und bringt damit die beiden *dif*-Sequenzen in räumliche Nähe zueinander. Infolgedessen bindet XerCD an die *dif*-Sequenz und löst die Chromosomen-Dimere in Monomere auf (Steiner and Kuempel, 1998). Durch den Einbau der orientierten KOPS-Sequenzen und der *dif*-Sequenz könnten also Chromosomen-Dimere besser aufgelöst werden und somit kann die Chromosomensegregation effizienter stattfinden, wodurch synVicII eine erhöhte Stabilität erreichen müsste. Möglicherweise wäre aber gar kein Unterschied in der Stabilität messbar, weil Chromosomendimere in den meisten Bakterien sowieso nur selten auftreten. In *V. cholerae* bilden sich 5,8 % der Dimere pro Zelle pro Generation auf dem 2,96 Mbp Chromosom und 3 % der Dimere auf dem 1,07 Mbp sekundären Chromosom (Val et al., 2008). Unter den gleichen Bedingungen werden 15,6 % der Dimere auf dem 4,6 Mbp *E. coli* Chromosom generiert (Val et al., 2008). In *dif*-Mutanten von *V. cholerae* bilden sich 8,8 % der Dimere pro Zelle pro Generation auf dem primären Chromosom und 3,4 % der Dimere auf dem sekundären Chromosom (Val et al., 2012). Im monochromosomalen *V. cholerae* MCH1-entstehen 12,5 % der Dimere auf dem ca. 4 Mbp-großen Chromosom, im ESC1-Stamm, welcher zwei gleich große 2 Mbp-Chromosomen besitzt, entstehen ca. 4,5 % der Dimere auf den Chromosomen (Val et al., 2012). Es gibt also einen Zusammenhang mit der Größe des Replikons und der Dimerbildung. Für synVicII-2.0 mit seiner derzeitigen Größe von 13 Kbp und anderen Varianten mit einer Größe von 50-100 Kbp würde das bedeuten, dass sich eventuell gar keine Chromosomendimere bilden. Außerdem ist unklar, ob synVicII überhaupt über ein FtsK-XerCD System organisiert wird. Für manche Plasmide wurde beschrieben, dass die Dimerauflösung FtsK-unabhängig stattfinden kann (Kennedy et al., 2008). Es müsste also noch getestet werden, ob sich in synVicII Dimere bilden und ob diese dann unter Beteiligung von FtsK oder ohne Beteiligung von FtsK aufgelöst werden. Für diesen Zweck könnten unterschiedliche Varianten an synVicII assembliert werden: Auf einem synthetischen Chromosom könnten nur KOPS-Sequenzen und auf einem zweiten Chromosom könnten KOPS-Sequenzen und eine *dif*-Sequenz in der Terminusregion integriert werden. Diese beiden Chromosomen und den hier in dieser Arbeit konstruierten Prototyp synVicII ohne KOPS und ohne *dif*-Sequenz könnte man dem Stabilitätstest unterziehen. Es wäre zu erwarten, dass, wenn sich in synVicII Chromosomendimere bilden, die beiden neu konstruierten synVicII-Varianten stabiler sein müssten. Werden die Dimere FtsK-abhängig aufgelöst, so müsste die synVicII-Variante mit den KOPS- und der *dif*-Sequenz stabiler sein als das synVicII, welches nur mit KOPS-Sequenzen ausgestattet worden ist.

Es wurde bereits publiziert, dass *oriC*-basierte Replikons „überreplizieren“ und die Termination der DNA-Replikation nicht richtig stattfinden kann (Hiasa and Marians, 1994). Wenn die Replikationsgabeln in der Terminusregion des Chromosoms aufeinandertreffen oder die Replikationsgabeln auf eine *ter*-Sequenz treffen, findet die Termination der DNA-Replikation statt (Kaplan and Bastia, 2009). Hierbei bindet der Replikationsterminator Tus asymmetrisch an die *ter*-Motive. Das *Ter*-gebundene Tus Protein interagiert mit der DNA-Helikase (DnaB) und hemmt seine weitere Translokation, sodass es zu einem Stillstand der DNA-Replikation und damit zu einer Verhinderung der Überreplikation kommt (Duggin et al., 2008). *Ter*-Sequenzen liegen polar auf dem *E. coli* Chromosom vor, sodass sie nur das Fortschreiten der Replikationsgabel in eine Richtung erlauben (Duggin et al., 2008). Bei der Überreplikation, wie sie für die *oriC*-Minichromosomen gezeigt wurde, werden die Replikationsgabeln im Terminus nicht gestoppt und ein ganzes Chromosom statt nur des halben Chromosomenarms wird repliziert (Hiasa and Marians, 1994). Dies führt zur Bildung von zwei Chromosomendimeren anstatt eines verdoppelten Replikons. Wenn die Termination durch diese Überreplikation wie beschrieben nicht richtig stattfindet, dann kann die Segregation der beiden Chromosomen auch nicht effizient erfolgen und das Replikon könnte bei der Zellteilung verloren werden. Deshalb könnte auch der Einbau von *ter*-Sequenzen und damit der Angriffspunkt der Termination der DNA-Replikation ein stabilisierender Effekt auf *synVicII* haben. Im Rahmen der Masterarbeit von Franziska Kemter wurden bereits zwei entgegengesetzte *ter*-Sequenzen in die Terminusregion von *synVicII* eingebaut. Eine stabilisierende Wirkung auf *synVicII* konnte jedoch nicht beobachtet werden. Das *E. coli* Chromosom besitzt nicht nur 2, sondern 10 *ter*-Sequenzen (Mulcair et al., 2006). Möglicherweise könnten also zwei *ter*-Sequenzen zu wenig sein, um einen stabilisierenden Effekt nachweisen zu können. In einem überreplizierenden *oriC*-Minichromosom konnte jedenfalls durch den Einbau von nur zwei *ter*-Sequenzen mit einem Abstand von 1 Kbp die Überreplikation gestoppt werden (Hiasa and Marians, 1994). Die *ter*-Sequenzen auf *synVicII* wurden aber nur in einem Abstand von 74 Bp integriert. So wäre es möglich, dass durch die Bindung von Tus an die eine *ter*-Sequenz, Tus nicht an die andere Sequenz binden kann, weil die beiden Sequenzen zu nah beieinander sind. Die Stabilität des *oriC*-Minichromosoms in der Studie von Hiasa und Marians wurde nicht gemessen. Eine andere Studie demonstrierte jedoch, dass ein R1-basiertes Replikon, welches zwei *ter*-Sequenzen trägt, nach der Entfernung der rechten *ter*-Sequenz instabiler weiter vererbt wurde (Krabbe et al., 1997). Der stabilisierende Effekt der rechten *ter*-Sequenz wurde darauf zurückgeführt, dass die Termination der DNA-Replikation nur mit der linken und der rechten *ter*-Sequenz in dem R1-Replikon funktioniert, weil dadurch die Multimerisierung der Replikons verhindert wird.

Der verwendete Stabilitätstest könnte auch evtl. nicht sensitiv genug sein, um geringe Stabilitätsunterschiede zwischen Replikons wahrzunehmen. Eine Alternative zu dem in dieser Arbeit

entwickelten Stabilitätstest ist ein Kompetitions-Wachstums-Test (San Millan et al., 2014). Eine Möglichkeit für diesen Test ist, dass zwei unterschiedlich markierte *E. coli* Stämme verwendet werden. Dafür wird ein für ein Fluoreszenzprotein kodierendes Gen in das *E. coli* Chromosom integriert. Die zu untersuchenden Replikons werden in die beiden unterschiedlich markierten *E. coli* Stämme transformiert. Der Kompetitionstest kann nur durchgeführt werden, wenn die beiden Stämme mit dem Replikon eine gleiche Wachstumsgeschwindigkeit besitzen. Für die Experimente werden die Stämme gleichzeitig über den gleichen Zeitraum in Medium ohne Antibiotikum angezogen. Der Stamm mit dem instabileren Replikon verliert das Replikon schneller als der Stamm mit dem stabilen Replikon. Dann werden die Stämme in Medium mit Antibiotikum überführt und das Wachstum und die Fluoreszenz über einen längeren Zeitraum gemessen. Der Stamm mit dem instabileren Replikon kann in dem Medium mit Antibiotikum nicht wachsen. Daher sollte die Fluoreszenz des Stammes mit dem stabilen Replikon stärker sein und dominieren. Anhand der Fluoreszenzunterschiede können Rückschlüsse auf die Stabilität gezogen werden.

6.2.1.2 Verbesserung der Stabilität durch den Einbau von stabilisierenden DNA-Sequenzen auf dem *Escherichia coli* Chromosom

Neben dem Einbau von stabilisierenden DNA-Motiven in synVicII könnten auch DNA-Sequenzen in das *E. coli* Chromosom eingebaut werden, welche die Stabilität von synVicII erhöhen könnten. Eine solche Sequenz könnte die in *V. cholerae* Terminationssynchronie stimulierende *crts*-Sequenz sein. Wenn diese Sequenz auch in *E. coli* funktionell ist, könnte diese vielleicht die Zellzyklus-spezifische DNA-Replikation von synVicII sicherstellen und damit synVicII stabiler machen. Es wurde außerdem publiziert, dass in *V. cholerae* neben dem Chromosom II ebenfalls das Chromosom I eine *parSII*-Sequenz trägt (Yamaichi et al., 2007a). Das ist der Fall, obwohl beide Chromosomen ihr eigenes Segregationssystem kodieren und beide Segregationssysteme nur für die Segregation des jeweiligen Chromosoms zuständig sind (Yamaichi et al., 2007a). Die *parSII*-Sequenz befindet sich in der Nähe der Terminusregion des Chromosoms I. Die Funktion der *parSII*-Sequenz auf Chromosom I ist bisher unbekannt. Möglicherweise könnte aber auch diese Sequenz eine regulatorische Funktion wie die *crts*-Sequenz ausführen und könnte deswegen eine stabilisierende Funktion auf synVicII in *E. coli* ausüben. Dies könnte nach Integration der *parSII*-Sequenz auf dem *E. coli* Chromosom in der Nähe der Terminusregion in dem Stamm, der synVicII trägt, mit dem Durchflusszytometrie-basierten Stabilitätstest getestet werden. Eine andere Möglichkeit eine stabilere synVicII-Variante herzustellen, bietet die Suche nach unbekanntem regulatorischen Sequenzen mithilfe einer Transposonmutagenese. Diese Mutagenese könnte in dem synthetischen monochromosomalen *V. cholerae* Stamm MCH1 durchgeführt werden (Val et al., 2014). In diesem Stamm sind wie in der Einleitung beschrieben die beiden *V. cholerae* Chromosomen unter Ausschluss der *orill-rctB-parABII*

Region fusioniert. Das fusionierte Chromosom wird von *oriI* aus repliziert. Die Transposonmutagenese erlaubt die Identifizierung nicht essentieller DNA-Sequenzen. Nach der Durchführung muss geprüft werden, ob die nicht essentiellen Bereiche eventuell für die DNA-Replikation des Chromosoms II eine Rolle spielen oder tatsächlich verzichtbare Elemente eines Chromosoms darstellen. Die Transposonmutagenese in MCH1 könnte dafür mit der Transposonmutagenese von *V. cholerae* Wildtyp verglichen werden. In *V. cholerae* Wildtyp sind die Zellen, welche ein Transposon in einem essentiellen Gen für Chromosom I oder II tragen, nicht lebensfähig. Die noch lebensfähigen Wildtyp-Zellen können mit den Transposon gesprungenen lebensfähigen MCH1-Zellen verglichen werden. Bei den Genen, in welchen sich ein Transposon befindet und die bei der Transposonmutagenese von MCH1 auftauchen, aber nicht in der Transposongenese des Wildtyps auftauchen, handelt es sich eventuell um essentielle Gene für das sekundäre Chromosom. Diese neu identifizierten DNA-Sequenzen könnten dann in synVicII eingebaut werden und der Effekt auf die synVicII Stabilität untersucht werden.

6.2.2 Ist synVicII in andere Organismen als *Escherichia coli* übertragbar?

In der Biotechnologie häufig verwendete Produktionsstämme sind *Corynebacterium glutamicum*, *B. subtilis* oder *S. cerevisiae* (Borodina and Nielsen, 2014; Wendisch et al., 2016; Westers et al., 2004). Für diese Stämme werden oft Plasmide, welche ein breites Wirtsspektrum besitzen, verwendet (Jain and Srivastava, 2013). Ein breites Wirtsspektrum bedeutet, dass diese Plasmide in verschiedenen Mikroorganismen replizieren und aufrechterhalten werden können (Jain and Srivastava, 2013). Diese Eigenschaft ist von besonderem Interesse, da diese Plasmide nicht nur eine wichtige Rolle bei horizontalem Gentransfer spielen, sondern auch eine gute Plattform für Vektorkonstruktionen darbieten (Jain and Srivastava, 2013). Da synVicII als Alternative zu Plasmiden in der Biotechnologie eingesetzt werden könnte, stellt sich die Frage, ob synVicII auch in diesen anderen Mikroorganismen verwendet werden könnte? Der erste Schritt für die Verwendung in anderen Mikroorganismen ist generell die Übertragbarkeit von synVicII. Da synvicII-2.0 mit einem *oriT*, einem übertragbaren Replikationsursprung, ausgestattet ist, müsste sich synVicII beispielsweise leicht in *C. glutamicum* konjugieren lassen (Schafer et al., 1990). Die Konjugation von Plasmiden von einem *E. coli* Donor Stamm in einen *C. glutamicum* Stamm läuft generell sehr effizient ab (Schafer et al., 1990). Jedoch besitzt *C. glutamicum* ein sehr strenges Restriktions-Modifikationssystem, weshalb Fremd-DNA oder DNA mit anderem Methylierungsmuster schnell degradiert wird (Bonamy et al., 1990; Bonnassie et al., 1990; Liebl et al., 1989). Deshalb muss das Restriktionssystem inaktiviert werden. Dies kann durch eine Hitzeinkubation bei 46-49°C für 9 min oder durch andere Stressfaktoren wie pH-Veränderungen, Alkohol oder Detergenzien wie SDS erfolgen (Schafer et al., 1994). Eine Alternative zu diesen Stressfaktoren ist die Verwendung von Restriktions-defizienten

C. glutamicum Stämmen oder Zelloberflächenmutanten als Rezipientenstämme (Jang and Britz, 2000). Des Weiteren könnte synVicII auch *in vitro* synthetisiert werden, sodass es frei von störenden DNA-Methylierungsmustern vorliegt. Hierbei wäre aber die Größe von synVicII aufgrund der limitierenden Gensynthese sehr beschränkt. Allerdings stellt sich nach der erfolgten Konjugation in synVicII überhaupt die Frage, ob synVicII in z.B. *C. glutamicum* wirklich replizieren könnte. Für *orill* wurde nämlich gezeigt, dass die Dam-Methyltransferase, welche Adenine methyliert, für die Initiation der DNA-Replikation benötigt wird (Demarre and Chattoraj, 2010; Val et al., 2014). *In vitro* Arbeiten in *E. coli* demonstrierten, dass RctB nur an voll methylierte GATCs, welche sich in der RctB-Bindestelle befindet, bindet (Demarre and Chattoraj, 2010). Des Weiteren publizierten Mazel et al., dass auch *in vivo* Dam essentiell für die DNA-Replikation von *orill* ist (Val et al., 2014). Nur der monochromosomale MCH1-Stamm, welcher unabhängig von *orill* repliziert, war ohne Dam im Vergleich zu *V. cholerae* Wildtyp lebensfähig. Da *C. glutamicum* keine Dam-Methyltransferase sondern u.a. eine andere Methyltransferase (CgIIIM) besitzt, würde synVicII in diesem Organismus vermutlich nicht replizieren können (Jang et al., 1996; Schafer et al., 1997). CgIIIM erkennt die Sequenz GCNGC und methyliert spezifisch Cytosin (Schafer et al., 1997). Die Verwendung von synVicII in anderen Mikroorganismen, welche eine Dam-Methyltransferase besitzen, sollte aber kein Problem sein. Dam wurde hauptsächlich in γ -Proteobakterien gefunden (Brezellec et al., 2006). Somit wäre also die Verwendung von synVicII auf diese Phyla beschränkt. Eine Lösung für dieses Problem könnte der Einbau eines *dam* Gens in das *C. glutamicum* Chromosom darstellen. Hier müsste allerdings sichergestellt werden, dass *dam* in beispielsweise *C. glutamicum* auch gut exprimiert wird. Des Weiteren müsste unbedingt sichergestellt sein, dass der synthetische *C. glutamicum* Stamm ein ähnliches Wachstumsverhalten wie *C. glutamicum* Wild-Typ aufweist. In *E. coli* wurden bereits andere Methylierungsmuster wie z.B. die von *Nitrobacter* nachgeahmt (Zhang et al., 2012). *Nitrobacter* konnte bisher aufgrund fehlender Werkzeuge nicht genetisch verändert werden. Der Mikroorganismus besitzt ein spezielles Restriktions-Modifikationssystem, welches Fremd-DNA wie die aus *E. coli* verdaut (Starkenburg et al., 2008). Für die Nachahmung des *Nitrobacter* Methylierungssystems wurden die *Nitrobacter* Methylasen, welche in *E. coli* nicht natürlicherweise vorkommen, in *E. coli* eingebracht (Zhang et al., 2012). Nach der erfolgreichen Expression der Fremd-Methylasen von *Nitrobacter* in *E. coli*, wurde das Methylierungsmuster von *E. coli* so verändert, dass es das Methylierungsmuster des Zielorganismus *Nitrobacter* widerspiegelte. Plasmide, welche in diesem neuen *E. coli* Stamm konstruiert wurden, konnten erfolgreich in *Nitrobacter* eingebracht und genetisch manipuliert werden, ohne dass diese Plasmide modifiziert oder verdaut wurden (Zhang et al., 2012).

Es darf nicht zu Interferenzen zwischen der natürlichen *C. glutamicum* Methyltransferase und eingeführter Dam in *C. glutamicum* kommen. In *B. subtilis* konnte beispielsweise *E. coli* Dam

erfolgreich exprimiert werden (Guha and Guschlbauer, 1992). Trotzdem wurden die meisten chromosomalen GATC-Motive nicht methyliert. Untersuchungen ergaben, dass die Methylierungen vermutlich durch Rekombination und das *Bacillus* eigene DNA-Reparatursystem entfernt wurden, da sie als Fehler erkannt wurden (Guha and Guschlbauer, 1992). In Reparatur-defizienten Mutanten war die Dam-Methylierung zwar vollständig, aber schädlich für das Wachstum und die Lebensfähigkeit der Zellen (Guha and Guschlbauer, 1992). Außerdem wurde die SOS-Antwort in diesen Mutanten aktiviert. Da DNA-Methylierungen auch für die Regulation verschiedener Prozesse in der Zelle wichtig sind, wäre möglicherweise ein solcher Schritt, welcher das Methylierungsmuster drastisch verändert, zu invasiv für *C. glutamicum* (Lobner-Olesen et al., 2005; Oshima et al., 2002). Eine andere Möglichkeit wäre, das Methylierungsmuster von synVicII zu verändern. Das bedeutet, dass in synVicII alle GATC-Sequenzen in *orIII* durch GCNGC Sequenzen ersetzt werden könnten. Eine solche gezielte Dam-Methylierung wurde in Bakterien bisher noch nicht publiziert. Es gibt aber in Eukaryoten eine Methode, DamID, welche als Alternative zu ChIP (= „Chromatin Immunoprecipitation“) für das Auffinden von Protein-DNA-Bindungen entwickelt worden ist (van Steensel and Henikoff, 2000). Bei DamID wird *E. coli* Dam mit dem zu analysierenden DNA-bindenden Protein fusioniert. Das Protein bindet entweder direkt oder indirekt über einen Protein-Komplex an das Chromatin. Wenn das Fusionsprotein *in vivo* exprimiert wird, methyliert Dam die Adenine im GATC-Motiv in direkter Nachbarschaft zu der Bindestelle des DNA-bindenden Proteins. Die Adenin-Methylierung, welche sonst normalerweise in Eukaryoten nicht zu finden ist, markiert die DNA. Nach der Isolierung der DNA kann das methylierungssensitive Restriktionsenzym *DpnI* benutzt werden, um die genomische DNA zu fragmentieren. Methylierte Sequenzen können dann per PCR amplifiziert und durch verschiedene Sequenzierung- oder Array-basierten Methoden detektiert werden. Anschließend kann ein Chromatinprofil mit Positionen der DNA-Bindestelle des zu analysierenden Proteins erstellt werden. Nun könnte man also die *C. glutamicum* spezifische Methyltransferase CgIIIM in *E. coli* mit einem speziellen *orIII*-bindenden Protein fusionieren, um gezielt dort die Cytosine in den RctB-Bindestellen zu methylieren. Als spezifisch bindendes Protein könnte z.B. ein Repressor wie TetR verwendet werden, welcher spezifisch an die TetO-Operator-Sequenz bindet. Dazu müsste die *tetO*-Sequenz in *orIII* neben die RctB-Bindestellen integriert werden. Fusioniert man nun CgIIIM mit TetR, müssten theoretisch nur gezielt die Cytosine methyliert werden. Ob dies wirklich der Fall ist, müsste mit weiteren Tests überprüft werden. Da aber dadurch nicht nur die wichtigen RctB-Bindestellen zerstört werden, sondern auch die komplette Regulation von synVicII, würde synVicII sicherlich weder in *E. coli* noch in *C. glutamicum* replizieren können. Als Alternative könnte theoretisch auch in *C. glutamicum* über DamID die *E. coli* Dam-Methylase mit TetR fusioniert und dann synVicII mit seinen GATC-Motiven und der Repressorbindestelle verwendet werden.

Ein anderer Ansatz als direkt synVicII in anderen Mikroorganismen zu verwenden, wäre die Konstruktion von neuen synthetischen, sekundären Chromosomen in biotechnologisch relevanten Mikroorganismen wie *C. glutamicum*. Damit synVicII beispielweise in *C. glutamicum* replizieren könnte, müsste es erstmal einen anderen *C. glutamicum* spezifischen Replikationsursprung besitzen. Bei der Assemblierung von synVicII wurde extra ein Design gewählt, welches den Einbau eines anderen Replikationsursprunges ermöglicht. Der *oriII* Replikationsursprung könnte also leicht entweder durch einen *C. glutamicum* Replikationsursprung ersetzt werden oder über die *lacZ-ccdB* Kasette ein zusätzlicher *C. glutamicum* Replikationsursprung eingefügt werden. Hierbei wäre es jedoch wichtig, einen Replikationsursprung zu verwenden, welcher sich vom *C. glutamicum* Replikationsursprung unterscheidet. Einen solchen kompatiblen Replikationsursprung könnte man in nahe verwandten *Actinobacteria* finden, welche ebenso mehr als nur ein Chromosom besitzen (Jha et al., 2012).

Eine besonders interessante Eigenschaft von synVicII für den Einsatz in der Biotechnologie wäre, wenn synVicII einen Replikationsursprung besitzen würde, welcher die DNA-Replikation in sehr vielen biotechnologisch relevanten Mikroorganismen erlauben würde. Einen solchen Replikationsursprung zu konstruieren ist sicherlich schwierig, da dieser Replikationsursprung ein sehr breites Wirtsspektrum besitzen müsste und kompatibel mit den Replikationsursprüngen der Hauptchromosomen sein müsste. Das bedeutet, dass auch hier natürlich vorkommende sekundäre Chromosomen und ihre Replikationsursprünge als Template für einen solchen Replikationsursprung herangezogen werden könnten. Die Replikationsursprünge und ihre Replikationssysteme von primären bakteriellen Chromosomen sind zwar ähnlich; so werden z.B. alle primären Bakterienchromosomen über das Initiatorprotein DnaA reguliert (Zakrzewska-Czerwinska et al., 2007) und so konnte beispielsweise *V. cholerae oriI* in *E. coli oriC* ersetzen (Koch et al., 2010). Jedoch sind die Replikationsursprünge und die Replikationssysteme von sekundären Chromosomen, welche oft Plasmid-typische Replikationssysteme verwenden, in verschiedenen Bakterien eher divers (Du et al., 2016; Egan and Waldor, 2003). Mit bioinformatischen Analysen könnten Sequenzvergleiche von verschiedenen Replikationsursprüngen und deren Initiatorgenen von sekundären Chromosomen durchgeführt werden. Werden konservierte Bereiche gefunden, könnte eventuell eine Sequenz abgeleitet werden, welche einen funktionellen Replikationsursprung darstellen könnte.

Die Mo-Clo Kompatibilität von synVicII erlaubt außerdem einen sehr schnellen und effizienten Einbau von Organismus spezifischen DNA-Sequenzen (Messerschmidt et al, 2016 submitted).

6.3 Untersuchung der Diversität der DNA-Replikation von verschiedenen *Vibrio* Spezies

In der Grundlagenforschung und in der Biotechnologie könnten nicht nur sekundäre, synthetische Chromosomen wie synVicII, sondern auch zum Beispiel tertiäre, synthetische Chromosomen verwendet werden. Somit könnte die genetische Information auf mehr als nur zwei Chromosomen verteilt werden. Eine Verteilung der genetischen Information auf mehrere Replikons bringt Vorteile mit sich. Beispielsweise sind solche kleineren Replikons leichter zugänglich und genetisch veränderbar (Liang et al., 2013; Milbredt et al., 2016; Schindler and Waldminghaus, 2015). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist der *V. cholerae orill* Replikationsursprung und sein gut regulierbares Replikationssystem gut geeignet, um das synthetische Chromosom synVicII in *E. coli* zu replizieren. Als Alternative zu *V. cholerae orill*-basierten synthetischen, sekundären Chromosomen könnten deshalb in Zukunft synthetische Chromosomen auf Basis von anderen *Vibrio* Replikationsursprüngen assembliert werden. Wie in der Einleitung schon beschrieben worden ist, wurde die DNA-Replikation in den multi-chromosomalen *Vibrios* mit Ausnahme von *V. cholerae* bisher kaum studiert. In *V. cholerae* startet das kleinere Chromosom II erst die DNA-Replikation, nachdem ca. 2/3 des ersten Chromosoms und gerade die *crts*-Sequenz repliziert worden ist (Val et al., 2016). Dies kann beispielsweise anhand von Chromosomensequenzierungen und deren Marker-Frequency-Analyse untersucht werden (Val et al., 2016). Hierbei ist die relative Menge der DNA-Sequenzen entlang des Chromosoms proportional zu der Anzahl der sequenzierten Reads per Kb und die Kopienzahl der DNA-Fragmente kann abgeleitet werden. Die Kopienzahl wird gegen die chromosomale Position aufgetragen (Abb. 8). Ein Vergleich der Kopienzahl von *oril* zu *orill* gibt Aufschluss über den Zeitpunkt der DNA-Replikation. Im Falle von *V. cholerae* ist die Kopienzahl von *orill* geringer als die von *oril*, was daraufhin deutet, dass die DNA-Replikation von Chromosom II später startet als die von Chromosom I. Wann und wie die DNA-Replikation der beiden Chromosomen in anderen *Vibrios* stattfindet, ist bisher unbekannt. Da interessanterweise die sekundären Chromosomen in anderen *Vibrios* unterschiedliche Größen aufweisen (Abb. 5), stellt sich auch die Frage, ob der Zeitpunkt der DNA-Replikation von der Größe des Replikons oder von einem anderen Faktor z.B. der kürzlich identifizierten *crts*-Sequenz auf Chromosom I abhängt (Abb. 8). Mittels Chromosomensequenzierungen und Marker-Frequency-Analyse wurden in dieser Arbeit mögliche Antworten auf diese Frage gefunden. Dazu wurden elf verschiedene *Vibrio* Stämme (*V. anguillarum*, *V. coralliilyticus*, *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. nigripulchritudo*, *V. parahaemolyticus*, *V. tasmaniensis*, *V. tubiashi* und *V. vulnificus*), *P. profundum*, *A. salmonicida* und der Kontrollstamm *V. cholerae* in Komplexmedium (M518) unter ihren optimalen Wachstumsbedingungen angezogen. DNA-Proben wurden in der exponentiellen Phase und als Referenz in der stationären Phase entnommen. Gesamt-

DNA wurde über eine Chloroform-Phenol-Aufreinigung isoliert und anschließend in einem Multiplex-Illumina Durchlauf in Kooperation mit der DSMZ in Braunschweig sequenziert. Das Mapping der Reads erfolgte ebenfalls bei der DSMZ und die Analysen wurden mit Hilfe von Patrick Sobetzko durchgeführt.

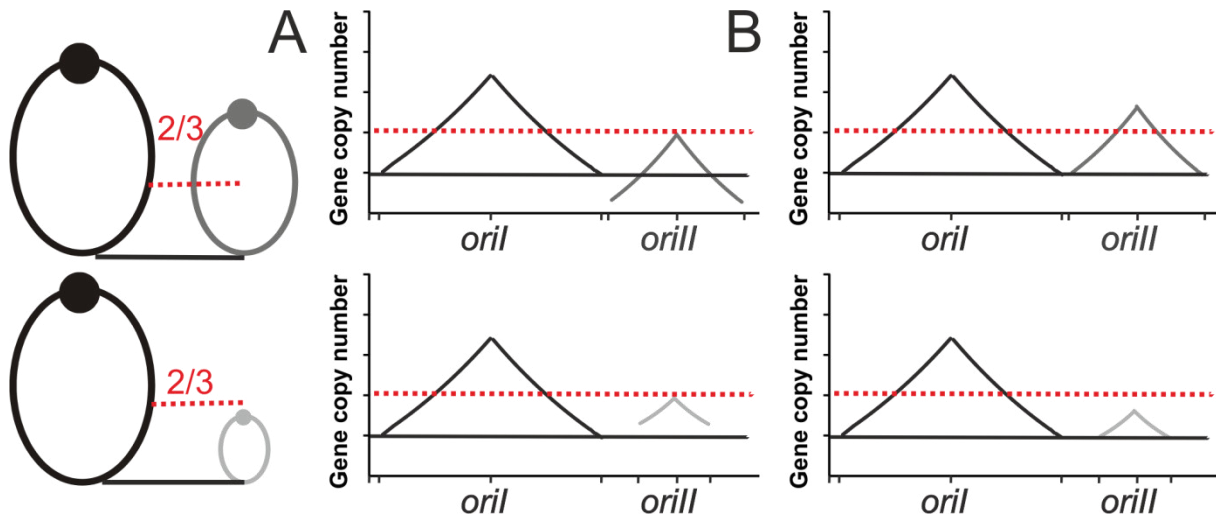


Abb. 8: Marker-Frequency-Analyse zur Unterscheidung zweier Modelle, nach welchen der Zeitpunkt der DNA-Replikation von zwei Chromosomen relativ zu einem Zell-zyklus spezifischen Faktor wie z.B. der *crts*-Sequenz (A) oder abhängig von der Replikongröße erfolgt (B). Wenn das sekundäre Replikon die DNA-Replikation immer zu einem gleichen Zeitpunkt, welcher durch den Zell-Zyklus bestimmt wird (hier z.B. nachdem 2/3 des ersten Chromosoms wie in *V. cholerae* repliziert worden ist), startet, dann ist die *terII* Kopienanzahl geringer als die von Chromosom I. Voraussetzung ist, dass Chromosom II größer als 1/3 von Chromosom I ist (A). Das bedeutet auch, dass Chromosom II später als Chromosom I terminiert. Im Gegensatz dazu wird die *terII* Kopienzahl höher als die von Chromosom I sein, wenn das sekundäre Replikon etwas kleiner als 1/3 des Chromosoms I ist. In diesem Fall terminiert Chromosom II bevor Chromosom I terminiert. Nach dem zweiten Größen-regulierten Modell wird das größere sekundäre Replikon die DNA-Replikation starten bevor 2/3 des ersten Chromosoms repliziert worden ist und die *terI* und *terII* Kopienzahlen werden ungefähr gleich sein (B). Dagegen wird das kleinere, sekundäre Chromosom später als 2/3 von Chromosom I initiieren und konsequenterweise ist die *terII* Kopienzahl kleiner als die in A.

Da die Genomplots für alle untersuchten Stämme ähnlich aussehen, wird in dieser Arbeit in der Abb. 9 nur ein exemplarischer Genomplot für *V. furnissii* und für *V. cholerae* gezeigt. Die Kopienzahl von *orII* ist kleiner als die Kopienzahl von *orI* (Abb. 9, rote Punkte). Dies deutet daraufhin, dass die DNA-Replikation von Chromosom II in allen 12 untersuchten Stämmen, erst nachdem ca. ein Drittel des ersten Chromosoms repliziert worden ist, startet. Chromosom I und II terminieren ungefähr gleichzeitig, was anhand der ungefähr gleichen Kopienzahl-Minima von Chromosom I und Chromosom II (blaue Punkte Abb. 9) abgeleitet werden kann. So verhalten sich also Chromosom I und II in anderen Vertretern der *Vibrionaceae* genauso, wie es auch für *V. cholerae* bereits publiziert worden ist.

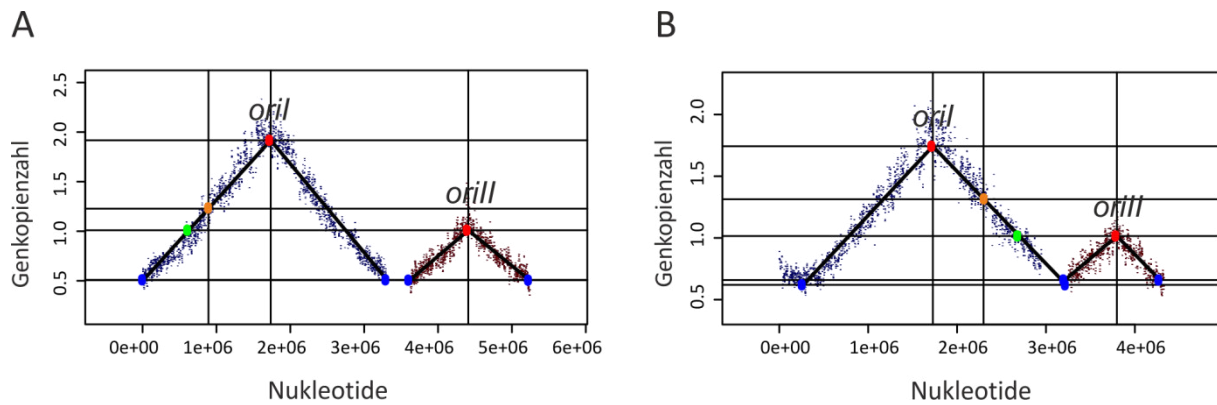


Abb. 9: Terminationssynchronie von *V. furnissii* (A) und *V. cholerae* (B). Die Marker Frequency Analyse wurde mit exponentiell wachsenden *V. furnissii* (A) und *V. cholerae* (B) Zellen durchgeführt. Marker Frequency Analyse wurde analog zu Val et al. 2016 durchgeführt. Log₂ der Anzahl der Reads, welche der Genkopienzahl entspricht, wurde relativ zu der Position in Chromosom I und II geplottet. Jede Base wurde zu den Reads einer stationären Probe normalisiert. Positionen des *oril*, *orill*, *terl*, *terll* und der *crts*-Sequenz sind in rot, blau, und orange dargestellt. Die Kopienzahl von Chromosom II gemappt auf das erste Chromosom ist in grün dargestellt.

Eine bioinformatische Analyse ergab, dass auch die 11 untersuchten Stämme eine *crts*-Sequenz auf dem Chromosom in ca. ein Drittel Entfernung zu *oril* auf dem ersten Chromosom besitzen. Alle *crts*-Sequenzen liegen an einer Position im Chromosomen-I-Bereich, welcher vor der Initiation des zweiten Chromosoms liegt. Es liegt also nahe, dass wie in *V. cholerae* auch die DNA-Replikation der *crts*-Sequenz auf dem ersten Chromosom ausschlaggebend für den Beginn der DNA-Replikation des zweiten Chromosoms ist. In *V. cholerae* entspricht die Verspätung der Duplizierung der *crts*-Sequenz und der Initiation von *orill* ungefähr einem Abstand von ca. 200 Kbp. Ob dies auch der Fall für die hier analysierten Stämme ist, muss mittels bioinformatischen Analysen noch überprüft werden.

Gut charakterisierte Replikons sind eine Voraussetzung für deren Verwendung in der Biotechnologie und in der Grundlagenforschung. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, wurde in *E. coli* erfolgreich das sekundäre, synthetische Chromosom synVicII etabliert und eine erste Charakterisierung dieses Replikons durchgeführt. synVicII stellt ein Prototyp sekundärer, synthetischer Chromosomen dar, welcher mit seinen Eigenschaften in der Grundlagenforschung als Chromosomenmodell dienen kann. Außerdem besitzt es mit seinen neuen Eigenschaften großes Potenzial, um in der Biotechnologie zum Beispiel als Ersatz für Plasmide eingesetzt zu werden. Mit weiteren Optimierungen von synVicII wird es in Zukunft eine Rolle beim Design von neuen synthetischen Mikroorganismen, welche neue Moleküle produzieren können, spielen.

7. Literaturverzeichnis

- Allardet-Servent, A., Michaux-Charachon, S., Jumas-Bilak, E., Karayan, L. and Ramuz, M., 1993. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *J Bacteriol.* 175, 7869-74.
- Annaluru, N., Muller, H., Mitchell, L.A., Ramalingam, S., Stracquadanio, G., Richardson, S.M., Dymond, J.S., Kuang, Z., Scheifele, L.Z., Cooper, E.M., Cai, Y., Zeller, K., Agmon, N., Han, J.S., Hadjithomas, M., Tullman, J., Caravelli, K., Cirelli, K., Guo, Z., London, V., Yeluru, A., Murugan, S., Kandavelou, K., Agier, N., Fischer, G., Yang, K., Martin, J.A., Bilgel, M., Bohutski, P., Boulier, K.M., Capaldo, B.J., Chang, J., Charoen, K., Choi, W.J., Deng, P., DiCarlo, J.E., Doong, J., Dunn, J., Feinberg, J.I., Fernandez, C., Floria, C.E., Gladowski, D., Hadidi, P., Ishizuka, I., Jabbari, J., Lau, C.Y., Lee, P.A., Li, S., Lin, D., Linder, M.E., Ling, J., Liu, J., London, M., Ma, H., Mao, J., McDade, J.E., McMillan, A., Moore, A.M., Oh, W.C., Ouyang, Y., Patel, R., Paul, M., Paulsen, L.C., Qiu, J., Rhee, A., Rubashkin, M.G., Soh, I.Y., Sotuyo, N.E., Srinivas, V., Suarez, A., Wong, A., Wong, R., Xie, W.R., Xu, Y., Yu, A.T., Koszul, R., Bader, J.S., Boeke, J.D. and Chandrasegaran, S., 2014. Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science.* 344, 55-8.
- Asai, T., Bates, D.B., Boye, E. and Kogoma, T., 1998. Are minichromosomes valid model systems for DNA replication control? Lessons learned from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 29, 671-5.
- Baek, J.H. and Chatteraj, D.K., 2014. Chromosome I controls chromosome II replication in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 10, e1004184.
- Bates, D.B., Asai, T., Cao, Y., Chambers, M.W., Cadwell, G.W., Boye, E. and Kogoma, T., 1995. The DnaA box R4 in the minimal *oriC* is dispensable for initiation of *Escherichia coli* chromosome replication. *Nucleic Acids Res.* 23, 3119-25.
- Bates, D.B., Boye, E., Asai, T. and Kogoma, T., 1997. The absence of effect of *gid* or *mioC* transcription on the initiation of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 12497-502.
- Berenstein, D., Olesen, K., Speck, C. and Skovgaard, O., 2002. Genetic organization of the *Vibrio harveyi* DnaA gene region and analysis of the function of the *V. harveyi* DnaA protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 184, 2533-8.
- Birchler, J.A., 2015. Promises and pitfalls of synthetic chromosomes in plants. *Trends Biotechnol.* 33, 189-94.
- Bonamy, C., Guyonvarch, A., Reyes, O., David, F. and Leblon, G., 1990. Interspecies electrotransformation in *Corynebacteria*. *FEMS Microbiol Lett.* 54, 263-9.
- Bonnassie, S., Burini, J.F., Oreglia, J., Trautwetter, A., Patte, J.C. and Sicard, A.M., 1990. Transfer of plasmid DNA to *Brevibacterium lactofermentum* by electrotransformation. *J Gen Microbiol.* 136, 2107-12.
- Borodina, I. and Nielsen, J., 2014. Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. *Biotechnol J.* 9, 609-620.
- Boye, E. and Lobner-Olesen, A., 1990. The role of Dam methyltransferase in the control of DNA replication in *E. coli*. *Cell.* 62, 981-9.
- Bramhill, D. and Kornberg, A., 1988. Duplex opening by DnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell.* 52, 743-55.
- Brezellec, P., Hoebeke, M., Hiet, M.S., Pasek, S. and Ferat, J.L., 2006. DomainSieve: a protein domain-based screen that led to the identification of dam-associated genes with potential link to DNA maintenance. *Bioinformatics.* 22, 1935-41.
- Campbell, J.L. and Kleckner, N., 1990. *E. coli oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from Dam methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell.* 62, 967-79.
- Cello, J., Paul, A.V. and Wimmer, E., 2002. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science.* 297, 1016-8.

- Cooper, S. and Helmstetter, C.E., 1968. Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B/r. *J Mol Biol.* 31, 519-40.
- Cooper, S. and Keasling, J.D., 1998. Cycle-specific replication of chromosomal and F-plasmid origins. *FEMS Microbiol Lett.* 163, 217-22.
- Cooper, V.S., Vohr, S.H., Wrocklage, S.C. and Hatcher, P.J., 2010. Why genes evolve faster on secondary chromosomes in bacteria. *PLoS Comput Biol.* 6, e1000732.
- Crooke, E., Hwang, D.S., Skarstad, K., Thony, B. and Kornberg, A., 1991. *E. coli* minichromosome replication: regulation of initiation at *oriC*. *Res Microbiol.* 142, 127-30.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M.J., Espinosa, M. and Diaz-Orejas, R., 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62, 434-64.
- Demarre, G. and Chattoraj, D.K., 2010. DNA adenine methylation is required to replicate both *Vibrio cholerae* chromosomes once per cell cycle. *PLoS Genet.* 6, e1000939.
- Downie, J.A. and Young, J.P., 2001. Genome sequencing. The ABC of symbiosis. *Nature.* 412, 597-8.
- Du, W.L., Dubarry, N., Passot, F.M., Kamgoue, A., Murray, H., Lane, D. and Pasta, F., 2016. Orderly Replication and Segregation of the Four Replicons of *Burkholderia cenocepacia* J2315. *PLoS Genet.* 12, e1006172.
- Duggin, I.G., Wake, R.G., Bell, S.D. and Hill, T.M., 2008. The replication fork trap and termination of chromosome replication. *Mol Microbiol.* 70, 1323-33.
- Duigou, S., Knudsen, K.G., Skovgaard, O., Egan, E.S., Lobner-Olesen, A. and Waldor, M.K., 2006. Independent control of replication initiation of the two *Vibrio cholerae* chromosomes by DnaA and RctB. *J Bacteriol.* 188, 6419-24.
- Duigou, S., Yamaichi, Y. and Waldor, M.K., 2008. ATP negatively regulates the initiator protein of *Vibrio cholerae* chromosome II replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 10577-82.
- Dymond, J. and Boeke, J., 2012. The *Saccharomyces cerevisiae* SCRaMbLE system and genome minimization. *Bioeng Bugs.* 3, 168-71.
- Dymond, J.S., Richardson, S.M., Coombes, C.E., Babatz, T., Muller, H., Annaluru, N., Blake, W.J., Schwerzmann, J.W., Dai, J., Lindstrom, D.L., Boeke, A.C., Gottschling, D.E., Chandrasegaran, S., Bader, J.S. and Boeke, J.D., 2011. Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature.* 477, 471-6.
- Egan, E.S., Lobner-Olesen, A. and Waldor, M.K., 2004. Synchronous replication initiation of the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Curr Biol.* 14, R501-2.
- Egan, E.S. and Waldor, M.K., 2003. Distinct replication requirements for the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Cell.* 114, 521-30.
- El-Hajj, Z.W., Tryfona, T., Allcock, D.J., Hasan, F., Lauro, F.M., Sawyer, L., Bartlett, D.H. and Ferguson, G.P., 2009. Importance of proteins controlling initiation of DNA replication in the growth of the high-pressure-loving bacterium *Photobacterium profundum* SS9. *J Bacteriol.* 191, 6383-93.
- Fang, F.C., Durland, R.H. and Helinski, D.R., 1993. Mutations in the gene encoding the replication-initiation protein of plasmid RK2 produce elevated copy numbers of RK2 derivatives in *Escherichia coli* and distantly related bacteria. *Gene.* 133, 1-8.
- Fuller, R.S., Funnell, B.E. and Kornberg, A., 1984. The DnaA protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites. *Cell.* 38, 889-900.
- Galanie, S., Thodey, K., Trenchard, I.J., Filsinger Interrante, M. and Smolke, C.D., 2015. Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science.* 349, 1095-100.
- Gerdes, K., Larsen, J.E. and Molin, S., 1985. Stable inheritance of plasmid R1 requires two different loci. *J Bacteriol.* 161, 292-8.
- Gerding, M.A., Chao, M.C., Davis, B.M. and Waldor, M.K., 2015. Molecular Dissection of the Essential Features of the Origin of Replication of the Second *Vibrio cholerae* Chromosome. *MBio.* 6, e00973.
- Gibson, D.G., Benders, G.A., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E.A., Baden-Tillson, H., Zaveri, J., Stockwell, T.B., Brownley, A., Thomas, D.W., Algire, M.A., Merryman, C., Young, L., Noskov, V.N., Glass, J.I., Venter, J.C., Hutchison, C.A., 3rd and Smith, H.O., 2008. Complete chemical

- synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*. 319, 1215-20.
- Gibson, D.G., Glass, J.I., Lartigue, C., Noskov, V.N., Chuang, R.Y., Algire, M.A., Benders, G.A., Montague, M.G., Ma, L., Moodie, M.M., Merryman, C., Vashee, S., Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E.A., Young, L., Qi, Z.Q., Segall-Shapiro, T.H., Calvey, C.H., Parmar, P.P., Hutchison, C.A., 3rd, Smith, H.O. and Venter, J.C., 2010. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. 329, 52-6.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., 3rd and Smith, H.O., 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*. 6, 343-5.
- Guha, S. and Guschlbauer, W., 1992. Expression of *Escherichia coli* *dam* gene in *Bacillus subtilis* provokes DNA damage response: N6-methyladenine is removed by two repair pathways. *Nucleic Acids Res*. 20, 3607-15.
- Haldimann, A. and Wanner, B.L., 2001. Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *J Bacteriol*. 183, 6384-93.
- Hansen, F.G., Christensen, B.B. and Atlung, T., 1991. The initiator titration model: computer simulation of chromosome and minichromosome control. *Res Microbiol*. 142, 161-7.
- Harrison, P.W., Lower, R.P., Kim, N.K. and Young, J.P., 2010. Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol*. 18, 141-8.
- Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Colwell, R.R., Mekalanos, J.J., Venter, J.C. and Fraser, C.M., 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*. 406, 477-83.
- Helmstetter, C.E., Thornton, M., Zhou, P., Bogan, J.A., Leonard, A.C. and Grimwade, J.E., 1997. Replication and segregation of a miniF plasmid during the division cycle of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 179, 1393-9.
- Hiasa, H. and Marians, K.J., 1994. Tus prevents overreplication of *oriC* plasmid DNA. *J Biol Chem*. 269, 26959-68.
- Hiraga, S., 1976. Novel F prime factors able to replicate in *Escherichia coli* Hfr strains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73, 198-202.
- Hiraga, S., 2000. Dynamic localization of bacterial and plasmid chromosomes. *Annu Rev Genet*. 34, 21-59.
- Holloway, B., Low, K.B. and Neidhardt, F.C., 1987. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : Cellular and Molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA. pp. 1145-1153.
- Hutchison, C.A., 3rd, Chuang, R.Y., Noskov, V.N., Assad-Garcia, N., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Gill, J., Kannan, K., Karas, B.J., Ma, L., Pelletier, J.F., Qi, Z.Q., Richter, R.A., Strychalski, E.A., Sun, L., Suzuki, Y., Tsvetanova, B., Wise, K.S., Smith, H.O., Glass, J.I., Merryman, C., Gibson, D.G. and Venter, J.C., 2016. Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*. 351, aad6253.
- Jain, A. and Srivastava, P., 2013. Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol Lett*. 348, 87-96.
- Jang, K.H. and Britz, M.L., 2000. Improved electrotransformation frequencies of *Corynebacterium glutamicum* using cell-surface mutants. *Biotechnol Lett*. 22, 539-545.
- Jang, K.H., Chambers, P.J. and Britz, M.L., 1996. Analysis of nucleotide methylation in DNA from *Corynebacterium glutamicum* and related species. *FEMS Microbiol Lett*. 136, 309-15.
- Jha, J.K., Demarre, G., Venkova-Canova, T. and Chatteraj, D.K., 2012. Replication regulation of *Vibrio cholerae* chromosome II involves initiator binding to the origin both as monomer and as dimer. *Nucleic Acids Res*. 40, 6026-38.

- Jha, J.K., Ghirlando, R. and Chattoraj, D.K., 2014. Initiator protein dimerization plays a key role in replication control of *Vibrio cholerae* chromosome 2. *Nucleic Acids Res.* 42, 10538-49.
- Jones, K.L. and Keasling, J.D., 1998. Construction and characterization of F plasmid-based expression vectors. *Biotechnol Bioeng.* 59, 659-65.
- Jones, K.L., Kim, S.W. and Keasling, J.D., 2000. Low-copy plasmids can perform as well as or better than high-copy plasmids for metabolic engineering of bacteria. *Metab Eng.* 2, 328-38.
- Jones, S.A. and Melling, J., 1984. Persistence of Pbr322-Related Plasmids in *Escherichia-Coli* Grown in Chemostat Cultures. *FEMS Microbiol Lett.* 22, 239-243.
- Juhas, M., Reuss, D.R., Zhu, B. and Commichau, F.M., 2014. *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* essential genes and minimal cell factories after one decade of genome engineering. *Microbiology.* 160, 2341-51.
- Kano, Y., Ogawa, T., Ogura, T., Hiraga, S., Okazaki, T. and Imamoto, F., 1991. Participation of the histone-like protein HU and of IHF in minichromosomal maintenance in *Escherichia coli*. *Gene.* 103, 25-30.
- Kaplan, D.L. and Bastia, D., 2009. Mechanisms of polar arrest of a replication fork. *Mol Microbiol.* 72, 279-85.
- Keasling, J.D., Palsson, B.O. and Cooper, S., 1992. Replication of mini-F plasmids during the bacterial division cycle. *Res Microbiol.* 143, 541-8.
- Kennedy, S.P., Chevalier, F. and Barre, F.X., 2008. Delayed activation of Xer recombination at *dif* by FtsK during septum assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 68, 1018-28.
- Koch, B., Ma, X. and Lobner-Olesen, A., 2010. Replication of *Vibrio cholerae* chromosome I in *Escherichia coli*: dependence on Dam methylation. *J Bacteriol.* 192, 3903-14.
- Koch, B., Ma, X. and Lobner-Olesen, A., 2012. *rctB* mutations that increase copy number of *Vibrio cholerae oriCII* in *Escherichia coli*. *Plasmid.* 68, 159-69.
- Krabbe, M., Zabielski, J., Bernander, R. and Nordstrom, K., 1997. Inactivation of the replication-termination system affects the replication mode and causes unstable maintenance of plasmid R1. *Mol Microbiol.* 24, 723-35.
- Krawiec, S. and Riley, M., 1990. Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol Rev.* 54, 502-39.
- Kroll, J., Klintner, S., Schneider, C., Voss, I. and Steinbuchel, A., 2010. Plasmid addiction systems: perspectives and applications in biotechnology. *Microb Biotechnol.* 3, 634-57.
- Kück U, B.A., Holländer-Czytko H, Jeske S, Klämbt C, Klapper R, Kubigsteltig I, Meinhardt F, Nickelsen J, Nowrousian M, Pollmann S, Pöggeler S, Strasser T, Weiler E, Wolff G, Wolff K, 2005. *Praktikum der Molekulargenetik*, Springer Verlag, Berlin.
- Lajoie, M.J., Rovner, A.J., Goodman, D.B., Aerni, H.R., Haimovich, A.D., Kuznetsov, G., Mercer, J.A., Wang, H.H., Carr, P.A., Mosberg, J.A., Rohland, N., Schultz, P.G., Jacobson, J.M., Rinehart, J., Church, G.M. and Isaacs, F.J., 2013. Genomically recoded organisms expand biological functions. *Science.* 342, 357-60.
- Lee, J.Y., Chang, J., Joseph, N., Ghirlando, R., Rao, D.N. and Yang, W., 2005. MutH complexed with hemi- and unmethylated DNAs: coupling base recognition and DNA cleavage. *Mol Cell.* 20, 155-66.
- Leonard, A.C. and Helmstetter, C.E., 1986. Cell cycle-specific replication of *Escherichia coli* minichromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 5101-5.
- Leonard, A.C. and Helmstetter, C.E., 1988. Replication patterns of multiple plasmids coexisting in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 170, 1380-3.
- Lessie, T.G., Hendrickson, W., Manning, B.D. and Devereux, R., 1996. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiol Lett.* 144, 117-28.
- Li, G.M., 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.* 18, 85-98.
- Liang, X., Baek, C.H. and Katzen, F., 2013. *Escherichia coli* with Two Linear Chromosomes. *ACS Synth Biol.*
- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U. and Schleifer, K.H., 1989. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol Lett.* 53, 299-303.

- Lin, Z., Xu, Z., Li, Y., Wang, Z., Chen, T. and Zhao, X., 2014. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of riboflavin. *Microb Cell Fact.* 13, 104.
- Lobner-Olesen, A., 1999. Distribution of minichromosomes in individual *Escherichia coli* cells: implications for replication control. *EMBO J.* 18, 1712-21.
- Lobner-Olesen, A. and Boye, E., 1992. Different effects of *mioC* transcription on initiation of chromosomal and minichromosomal replication in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 20, 3029-36.
- Lobner-Olesen, A., Skovgaard, O. and Marinus, M.G., 2005. Dam methylation: coordinating cellular processes. *Curr Opin Microbiol.* 8, 154-60.
- Lobner-Olesen, A. and von Freiesleben, U., 1996. Chromosomal replication incompatibility in Dam methyltransferase deficient *Escherichia coli* cells. *EMBO J.* 15, 5999-6008.
- Lowe, J., Ellonen, A., Allen, M.D., Atkinson, C., Sherratt, D.J. and Grainge, I., 2008. Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Mol Cell.* 31, 498-509.
- Lu, M., Campbell, J.L., Boye, E. and Kleckner, N., 1994. SeqA: a negative modulator of replication initiation in *E. coli*. *Cell.* 77, 413-26.
- Messer, W., 2002. The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and *oriC*, the bacterial mode to initiate DNA replication. *FEMS Microbiol Rev.* 26, 355-74.
- Messer, W. and Weigel, C., 1997. DnaA initiator--also a transcription factor. *Mol Microbiol.* 24, 1-6.
- Messerschmidt, S.J., Kemter, F.S., Schindler, D. and Waldminghaus, T., 2015. Synthetic secondary chromosomes in *Escherichia coli* based on the replication origin of chromosome II in *Vibrio cholerae*. *Biotechnol J.* 10, 302-14.
- Messerschmidt, S.J., Schindler, D., Zumkeller, C.M., Kemter, F.S., Schalopp, N. and Waldminghaus, T., 2016. Optimization and characterization of the synthetic secondary chromosome synVicII in *Escherichia coli*. *Front. Bioeng. Biotechnol.*
- Messerschmidt, S.J. and Waldminghaus, T., 2014. Dynamic organization: chromosome domains in *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 24, 301-15.
- Mettrick, K.A. and Grainge, I., 2016. Stability of blocked replication forks *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* 44, 657-68.
- Milbredt, S., Farmani, N., Sobetzko, P. and Waldminghaus, T., 2016. DNA Replication in Engineered *Escherichia coli* Genomes with Extra Replication Origins. *ACS Synth Biol.*
- Mitchell, L.A. and Boeke, J.D., 2014. Circular permutation of a synthetic eukaryotic chromosome with the telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111, 17003-10.
- Moyed, H.S., Nguyen, T.T. and Bertrand, K.P., 1983. Multicopy Tn10 tet plasmids confer sensitivity to induction of *tet* gene expression. *J Bacteriol.* 155, 549-56.
- Mulcair, M.D., Schaeffer, P.M., Oakley, A.J., Cross, H.F., Neylon, C., Hill, T.M. and Dixon, N.E., 2006. A molecular mousetrap determines polarity of termination of DNA replication in *E. coli*. *Cell.* 125, 1309-19.
- Noack, D., Roth, M., Geuther, R., Muller, G., Undisz, K., Hoffmeier, C. and Gaspar, S., 1981. Maintenance and genetic stability of vector plasmids pBR322 and pBR325 in *Escherichia coli* K12 strains grown in a chemostat. *Mol Gen Genet.* 184, 121-4.
- Ochman, H., 2002. Bacterial evolution: chromosome arithmetic and geometry. *Curr Biol.* 12, R427-8.
- Okada, K., Iida, T., Kita-Tsukamoto, K. and Honda, T., 2005. *Vibrios* commonly possess two chromosomes. *J Bacteriol.* 187, 752-7.
- Oldenburg, K.R., Vo, K.T., Michaelis, S. and Paddon, C., 1997. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. *Nucleic Acids Res.* 25, 451-2.
- Olsson, J., Dasgupta, S., Berg, O.G. and Nordstrom, K., 2002. Eclipse period without sequestration in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 44, 1429-40.
- Oshima, T., Wada, C., Kawagoe, Y., Ara, T., Maeda, M., Masuda, Y., Hiraga, S. and Mori, H., 2002. Genome-wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 45, 673-95.

- Ostrov, N., Landon, M., Guell, M., Kuznetsov, G., Teramoto, J., Cervantes, N., Zhou, M., Singh, K., Napolitano, M.G., Moosburner, M., Shrock, E., Pruitt, B.W., Conway, N., Goodman, D.B., Gardner, C.L., Tyree, G., Gonzales, A., Wanner, B.L., Norville, J.E., Lajoie, M.J. and Church, G.M., 2016. Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome. *Science*. 353, 819-22.
- Pal, D., Venkova-Canova, T., Srivastava, P. and Chatteraj, D.K., 2005. Multipartite regulation of rctB, the replication initiator gene of *Vibrio cholerae* chromosome II. *J Bacteriol*. 187, 7167-75.
- Perals, K., Cornet, F., Merlet, Y., Delon, I. and Louarn, J.M., 2000. Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: the *dif* site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Mol Microbiol*. 36, 33-43.
- Posfai, G., Plunkett, G., 3rd, Feher, T., Frisch, D., Keil, G.M., Umenhoffer, K., Kolisnychenko, V., Stahl, B., Sharma, S.S., de Arruda, M., Burland, V., Harcum, S.W. and Blattner, F.R., 2006. Emergent properties of reduced-genome *Escherichia coli*. *Science*. 312, 1044-6.
- Ramachandran, R., Jha, J. and Chatteraj, D.K., 2014. Chromosome segregation in *Vibrio cholerae*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 24, 360-70.
- Rasmussen, T., Jensen, R.B. and Skovgaard, O., 2007. The two chromosomes of *Vibrio cholerae* are initiated at different time points in the cell cycle. *Embo J*. 26, 3124-31.
- Ravasi, P., Peiru, S., Gramajo, H. and Menzella, H.G., 2012. Design and testing of a synthetic biology framework for genetic engineering of *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact*. 11, 147.
- Raymond, C.K., Pownder, T.A. and Sexson, S.L., 1999. General method for plasmid construction using homologous recombination. *Biotechniques*. 26, 134-8, 140-1.
- Ren, S.X., Fu, G., Jiang, X.G., Zeng, R., Miao, Y.G., Xu, H., Zhang, Y.X., Xiong, H., Lu, G., Lu, L.F., Jiang, H.Q., Jia, J., Tu, Y.F., Jiang, J.X., Gu, W.Y., Zhang, Y.Q., Cai, Z., Sheng, H.H., Yin, H.F., Zhang, Y., Zhu, G.F., Wan, M., Huang, H.L., Qian, Z., Wang, S.Y., Ma, W., Yao, Z.J., Shen, Y., Qiang, B.Q., Xia, Q.C., Guo, X.K., Danchin, A., Saint Girons, I., Somerville, R.L., Wen, Y.M., Shi, M.H., Chen, Z., Xu, J.G. and Zhao, G.P., 2003. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 422, 888-93.
- Rodriguez, A., Martinez, J.A., Flores, N., Escalante, A., Gosset, G. and Bolivar, F., 2014. Engineering *Escherichia coli* to overproduce aromatic amino acids and derived compounds. *Microb Cell Fact*. 13, 126.
- Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A., 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol*. 5, 172.
- Russell, D.W. and Zinder, N.D., 1987. Hemimethylation prevents DNA replication in *E. coli*. *Cell*. 50, 1071-9.
- San Millan, A., Heilbron, K. and MacLean, R.C., 2014. Positive epistasis between co-infecting plasmids promotes plasmid survival in bacterial populations. *ISME J*. 8, 601-12.
- Schafer, A., Kalinowski, J. and Puhler, A., 1994. Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergeneric matings with *Escherichia coli* after stress exposure. *Appl Environ Microbiol*. 60, 756-9.
- Schafer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.H. and Puhler, A., 1990. High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J Bacteriol*. 172, 1663-6.
- Schafer, A., Tauch, A., Droste, N., Puhler, A. and Kalinowski, J., 1997. The *Corynebacterium glutamicum* *cglIM* gene encoding a 5-cytosine methyltransferase enzyme confers a specific DNA methylation pattern in an McrBC-deficient *Escherichia coli* strain. *Gene*. 203, 95-101.
- Schindler, D. and Waldminghaus, T. Synthetic secondary chromosomes to study chromosome maintenance systems.
- Schindler, D. and Waldminghaus, T., 2015. Synthetic chromosomes. *FEMS Microbiol Rev*. 39, 871-91.
- Schmidt, M. and de Lorenzo, V., 2012. Synthetic constructs in/for the environment: managing the interplay between natural and engineered Biology. *FEBS Lett*. 586, 2199-206.
- Sengupta, M. and Austin, S., 2011. Prevalence and significance of plasmid maintenance functions in the virulence plasmids of pathogenic bacteria. *Infect Immun*. 79, 2502-9.

- Sherratt, D.J., 1982. The maintenance and propagation of plasmid genes in bacterial populations. The Sixth Fleming Lecture. *J Gen Microbiol.* 128, 655-61.
- Sivanathan, V., Allen, M.D., de Bekker, C., Baker, R., Arciszewska, L.K., Freund, S.M., Bycroft, M., Lowe, J. and Sherratt, D.J., 2006. The FtsK gamma domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nat Struct Mol Biol.* 13, 965-72.
- Skarstad, K., Boye, E. and Steen, H.B., 1986. Timing of initiation of chromosome replication in individual *Escherichia coli* cells. *EMBO J.* 5, 1711-7.
- Skarstad, K. and Lobner-Olesen, A., 2003. Stable co-existence of separate replicons in *Escherichia coli* is dependent on once-per-cell-cycle initiation. *EMBO J.* 22, 140-50.
- Slater, S., Wold, S., Lu, M., Boye, E., Skarstad, K. and Kleckner, N., 1995. *E. coli* SeqA protein binds *oriC* in two different methyl-modulated reactions appropriate to its roles in DNA replication initiation and origin sequestration. *Cell.* 82, 927-36.
- Slater, S.C., Goldman, B.S., Goodner, B., Setubal, J.C., Farrand, S.K., Nester, E.W., Burr, T.J., Banta, L., Dickerman, A.W., Paulsen, I., Otten, L., Suen, G., Welch, R., Almeida, N.F., Arnold, F., Burton, O.T., Du, Z., Ewing, A., Godsy, E., Heisel, S., Houmiel, K.L., Jhaveri, J., Lu, J., Miller, N.M., Norton, S., Chen, Q., Phoolcharoen, W., Ohlin, V., Ondrusek, D., Pride, N., Stricklin, S.L., Sun, J., Wheeler, C., Wilson, L., Zhu, H. and Wood, D.W., 2009. Genome sequences of three *agrobacterium* biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *J Bacteriol.* 191, 2501-11.
- Starkenburger, S.R., Larimer, F.W., Stein, L.Y., Klotz, M.G., Chain, P.S., Sayavedra-Soto, L.A., Poret-Peterson, A.T., Gentry, M.E., Arp, D.J., Ward, B. and Bottomley, P.J., 2008. Complete genome sequence of *Nitrobacter hamburgensis* X14 and comparative genomic analysis of species within the genus *Nitrobacter*. *Appl Environ Microbiol.* 74, 2852-63.
- Steiner, W.W. and Kuempel, P.L., 1998. Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the *dif* locus of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 27, 257-68.
- Stokke, C., Waldminghaus, T. and Skarstad, K., 2011. Replication patterns and organization of replication forks in *Vibrio cholerae*. *Microbiology.* 157, 695-708.
- Sturino, J.M. and Klaenhammer, T.R., 2006. Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nat Rev Microbiol.* 4, 395-404.
- Suwanto, A. and Kaplan, S., 1989. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes. *J Bacteriol.* 171, 5850-9.
- Tanaka, M. and Hiraga, S., 1985. Negative control of *oriC* plasmid replication by transcription of the *oriC* region. *Mol Gen Genet.* 200, 21-6.
- Thomason, L., Court, D.L., Bubunencko, M., Costantino, N., Wilson, H., Datta, S. and Oppenheim, A., 2007. Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination. *Curr Protoc Mol Biol.* Chapter 1, Unit 1 16.
- Thompson, J.R., Randa, M.A., Marcelino, L.A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E. and Polz, M.F., 2004. Diversity and dynamics of a north atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl Environ Microbiol.* 70, 4103-10.
- Touzain, F., Petit, M.A., Schbath, S. and El Karoui, M., 2011. DNA motifs that sculpt the bacterial chromosome. *Nat Rev Microbiol.* 9, 15-26.
- Trucksis, M., Michalski, J., Deng, Y.K. and Kaper, J.B., 1998. The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 14464-9.
- Val, M.E., Kennedy, S.P., El Karoui, M., Bonne, L., Chevalier, F. and Barre, F.X., 2008. FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 4, e1000201.
- Val, M.E., Kennedy, S.P., Soler-Bistue, A.J., Barbe, V., Bouchier, C., Ducos-Galand, M., Skovgaard, O. and Mazel, D., 2014. Fuse or die: how to survive the loss of Dam in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* 91, 665-78.
- Val, M.E., Marbouty, M., de Lemos Martins, F., Kennedy, S.P., Kemble, H., Bland, M.J., Possoz, C., Koszul, R., Skovgaard, O. and Mazel, D., 2016. A checkpoint control orchestrates the replication of the two chromosomes of *Vibrio cholerae*. *Sci Adv.* 2, e1501914.

- Val, M.E., Skovgaard, O., Ducos-Galand, M., Bland, M.J. and Mazel, D., 2012. Genome engineering in *Vibrio cholerae*: a feasible approach to address biological issues. *PLoS Genet.* 8, e1002472.
- van Steensel, B. and Henikoff, S., 2000. Identification of *in vivo* DNA targets of chromatin proteins using tethered Dam methyltransferase. *Nat Biotechnol.* 18, 424-8.
- Venkova-Canova, T., Baek, J.H., Fitzgerald, P.C., Blokesch, M. and Chattoraj, D.K., 2013. Evidence for two different regulatory mechanisms linking replication and segregation of *Vibrio cholerae* chromosome II. *PLoS Genet.* 9, e1003579.
- Venkova-Canova, T. and Chattoraj, D.K., 2011. Transition from a plasmid to a chromosomal mode of replication entails additional regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 6199-204.
- Venkova-Canova, T., Saha, A. and Chattoraj, D.K., 2012. A 29-mer site regulates transcription of the initiator gene as well as function of the replication origin of *Vibrio cholerae* chromosome II. *Plasmid.* 67, 102-10.
- Von Freiesleben, U., Rasmussen, K.V., Atlung, T. and Hansen, F.G., 2000. Rifampicin-resistant initiation of chromosome replication from *oriC* in *ihf* mutants. *Mol Microbiol.* 37, 1087-93.
- Wadood, A., Dohmoto, M., Sugiura, S. and Yamaguchi, K., 1997. Characterization of copy number mutants of plasmid pSC101. *J Gen Appl Microbiol.* 43, 309-316.
- Waldminghaus, T. and Skarstad, K., 2009. The *Escherichia coli* SeqA protein. *Plasmid.* 61, 141-50.
- Wendisch, V.F., Jorge, J.M., Perez-Garcia, F. and Sgobba, E., 2016. Updates on industrial production of amino acids using *Corynebacterium glutamicum*. *World J Microbiol Biotechnol.* 32, 105.
- Westers, L., Westers, H. and Quax, W.J., 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research.* 1694, 299-310.
- White, O., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Dodson, R.J., Haft, D.H., Gwinn, M.L., Nelson, W.C., Richardson, D.L., Moffat, K.S., Qin, H., Jiang, L., Pamphile, W., Crosby, M., Shen, M., Vamathevan, J.J., Lam, P., McDonald, L., Utterback, T., Zalewski, C., Makarova, K.S., Aravind, L., Daly, M.J., Minton, K.W., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Nelson, K.E., Salzberg, S., Smith, H.O., Venter, J.C. and Fraser, C.M., 1999. Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science.* 286, 1571-7.
- Woelker, B. and Messer, W., 1993. The structure of the initiation complex at the replication origin, *oriC*, of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 21, 5025-33.
- Yamaichi, Y., Fogel, M.A., McLeod, S.M., Hui, M.P. and Waldor, M.K., 2007a. Distinct centromere-like *parS* sites on the two chromosomes of *Vibrio* spp. *J Bacteriol.* 189, 5314-24.
- Yamaichi, Y., Fogel, M.A. and Waldor, M.K., 2007b. *par* genes and the pathology of chromosome loss in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 630-5.
- Zakrzewska-Czerwinska, J., Jakimowicz, D., Zawilak-Pawlik, A. and Messer, W., 2007. Regulation of the initiation of chromosomal replication in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 31, 378-87.
- Zhang, G., Wang, W., Deng, A., Sun, Z., Zhang, Y., Liang, Y., Che, Y. and Wen, T., 2012. A mimicking-of-DNA-methylation-patterns pipeline for overcoming the restriction barrier of bacteria. *PLoS Genet.* 8, e1002987.
- Zielenkiewicz, U. and Ceglowski, P., 2005. The toxin-antitoxin system of the streptococcal plasmid pSM19035. *J Bacteriol.* 187, 6094-105.
- Zirpel, B., Stehle, F. and Kayser, O., 2015. Production of Delta9-tetrahydrocannabinolic acid from cannabigerolic acid by whole cells of *Pichia (Komagataella) pastoris* expressing Delta9-tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *Biotechnol Lett.* 37, 1869-75.
- Zyskind, J.W., Cleary, J.M., Brusilow, W.S., Harding, N.E. and Smith, D.W., 1983. Chromosomal replication origin from the marine bacterium *Vibrio harveyi* functions in *Escherichia coli*: *oriC* consensus sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80, 1164-8.

Erklärung der selbständigen Erarbeitung der Dissertation

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Konstruktion, Charakterisierung und Optimierung des synthetischen, sekundären Chromosoms synVicII in *Escherichia coli*“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinem sonstigen Prüfungszweck gedient.

Marburg, den

Sonja Messerschmidt