

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Modifikation des *E. coli* Genoms:
rpsL-basierte Gegenselektion**

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Mario Röpcke

Matrikelnummer: [REDACTED]

Hamburg

am 11. Februar 2019

Erstgutachter: Prof. Dr. Stephan Noll (HAW Hamburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich (HAW Hamburg)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor für Angewandte Mikrobiologie
an der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg



Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG	2
1 EINFÜHRUNG	2
1.1 <i>red</i> -Rekombination	4
1.2 Die <i>rpsL</i> -Gegenselektion	6
2 MATERIAL UND CHEMIKALIEN	8
3 METHODEN	12
3.1 Mikrobiologische Verfahren	12
3.2 Molekularbiologische Methoden	14
3.3 Elektrophoresen	16
4 ERGEBNISSE	17
4.1 Vorversuche	17
4.1.1 Sensitivitätstest auf Streptomycin bei <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	17
4.1.2 Sensitivitätstest auf Kanamycin und Ampicillin bei <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	17
4.2 Einfügen einer Str ^R -Punktmutation in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	18
4.2.1 Transformation von pRed/ET in <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	18
4.2.2 <i>red</i> -Rekombination von <i>E. coli</i> BL21(DE3) mit Str ^R -Oligo.....	18
4.2.3 Patch-screening von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R auf Str ^R und Amp ^S	19
4.2.4 Sequenzanalyse des <i>rpsL</i> -Gens von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R	20
4.2.5 Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R	22
4.3 Wahl des genomischen Integrationsorts	23
4.4 Einfügen der <i>rpsL</i> -Gegenselektionskassette	25
4.4.1 Herstellung der <i>rpsL</i> -Gegenselektionskassette	25
4.4.2 <i>red</i> -Rekombination von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R mit CS- <i>rpsL</i> _{neo}	26
4.4.3 Screening von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R _CS- <i>rpsL</i> _{neo} auf Kan ^R und Str ^S	27
4.4.4 Sequenzanalyse der integrierten Gegenselektionskassette.....	27
4.5 Rekombination von <i>eGFP</i> -Cas in den <i>glmS-pstS</i> -Locus	29
4.5.1 Herstellung der <i>eGFP</i> -Genkassette	29
4.5.2 <i>red</i> -Rekombination des <i>RSS</i> mit <i>eGFP</i> -Expressionskassette	30
4.5.3 Physiologische Charakterisierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R _eGFP	31
4.5.4 Sequenzanalyse der integrierten Expressionskassette.....	31
4.5.5 Wachstumsverhalten von BL21(DE3)str ^R _eGFP.....	33
4.5.6 Genom und Plasmid-basierte Expression von eGFP	34
5 DISKUSSION	36
6 AUSBLICK	39
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	40
TABELLENVERZEICHNIS	40
LITERATURVERZEICHNIS	41
ERKLÄRUNGEN	42
ANHANG	43



Abkürzungsverzeichnis

amp	Ampicillin
BAC	<i>bacterial artificial chromosom</i>
bp	Basenpaare
DDDP	<i>DNA-depended-DNA-Polymerase</i>
DDRP	<i>DNA-depended-RNA-Polymerase</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dsDNA	<i>double strand Deoxyribonucleic Acid</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eGFP	<i>enhanced grün-fluorezierendes Protein</i>
Exo	λ -Exonuklease
gDNA	<i>genomic Deoxyribonucleic Acid</i>
GFP	Grün-fluorezierendes Protein
GOI	<i>gen of interest</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
km	Kanamycin
LB-Medium	<i>Luria-Bertani-Medium</i>
<i>nt</i>	Nukleotide
Oligo	Oligonukleotid
<i>ori</i>	<i>origen of replication</i>
<i>oriC</i>	<i>chromosomal origen of replication</i>
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
red	<i>recombination defect</i>
RRS	<i>recomination shuttle strain</i>
SSAP	<i>ssDNA-annealing-protein</i>
ssDNA	<i>single strand Deoxyribonucleic Acid</i>
str	Streptomycin
Str ^R	Streptomycinresistenz
<i>ter</i>	<i>terminus of replication</i>



Zusammenfassung

Seit den 1970er Jahren bildet die Plasmid-basierte Modifikation von Bakterien einen Grundpfeiler der prokaryotischen Gentechnik. In der Biotechnologie werden Plasmide hauptsächlich für die Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt. Dies ist mit Vor- und Nachteilen verbunden. Eine Alternative stellt die genomische Rekombination des Expressionssystems dar. Die Genom-codierte Expression rekombinanter Proteine bietet einige Vorteile gegenüber Plasmid-basierten Systemen. Die genomische Integration einer Expressionskassette macht den Einsatz eines Plasmid-basierten Resistenzgens überflüssig, da durch den stabilen Einbau kein selektiver Druck gegen den Verlust aufgebaut werden muss. Zum anderen werden nur die absolut notwendigen genetischen Elemente (Promoter, *GOI*, Terminator) in die Zelle integriert.

Ziel dieser Bachelorarbeit war es, den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) genomisch zu modifizieren und eine Gegenselektion auf Basis des *rpsL*-Gens durchzuführen. Hier wurde die *red*-Rekombination eingesetzt, um zunächst ein Streptomycin-resistentes BL21(DE3)-Derivat zu erzeugen, in welchen nacheinander eine Gegenselektionskassette und eine Expressionskassette in den *glmS* → *pstS*-Locus inseriert wurden. Durch die Gegenselektion auf Basis von Streptomycin ist man in der Lage eine Selektion auf markerlose Modifikationen am Genom durchzuführen. Zur Evaluation der *rpsL*-basierten Gegenselektion wurde eine *eGFP*-Expressionskassette in den *glmS* → *pstS*-Locus integriert.



1 Einführung

Plasmide bestehen aus zirkulärer, extrachromosomaler dsDNA und werden vom Wirtsorganismus repliziert. Natürliche Plasmide codieren in der Regel für Gene, welche für die Zelle nicht essenziell sind, aber einen evolutionären Vorteil verleihen können (z.B. Antibiotikaresistenzen). Sie sind in Prokaryoten und wenigen Hefen zu finden. Durch den Einsatz von Restriktionsenzymen und DNA-Ligasen ist man seit den 1970er Jahren fähig, *in vitro* gezielte Manipulationen an Plasmiden durchzuführen (Cohen et al., 1972^[1], 1973^[2]). So kann ein Plasmid als Fährer für ein rekombinantes Gen dienen, welches anschließend in der Wirtszelle exprimiert werden kann. Plasmide können aus ihren parental Zellen isoliert und in andere Empfängerzellen überführt werden. Diese Eigenschaften machen Plasmide zu wichtigen Werkzeugen der Gentechnik.

In der Biotechnologie werden Plasmide hauptsächlich für die Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt. Dies ist mit Vor- und Nachteilen verbunden. Plasmide besitzen eine Größe 1 – 1000 kbp und können *in vitro* modifiziert werden. Dabei liegen sie meist in einer höheren Kopienzahl in der Zelle vor. Dies erhöht die Gen-Dosis und kann zu einer verstärkten Expression des rekombinanten Proteins führen. Allerdings handelt es sich bei Plasmiden um extrachromosomale Vektoren, die während der Teilung - insbesondere nach Induktion der Zielgenexpression - verloren gehen können. Aus diesem Grund ist häufig ein selektiver Marker notwendig, welche eine Kultivierung unter selektiven Bedingungen erlaubt.

Ziel dieser Bachelorarbeit war es, einen *E. coli* BL21(DE3) Expressionsstamm zu entwickeln, bei dem mittels Gegenselektion eine geeignete Expressionskassette in das bakterielle Genom integriert werden kann. Die genomische Integration der Expressionskassette macht den Einsatz eines Plasmid-basierten *ori* und Resistenzgens überflüssig, da durch den stabilen Einbau kein selektiver Druck gegen den Verlust aufgebaut werden muss. Auch die Gefahr der Verbreitung des rekombinanten Gens durch horizontalen Gentransfer wird so auf ein Minimum reduziert. Die Kopienzahl des rekombinanten Gens ist definiert (in diesem Fall 1) und stabil. Zudem werden in das Genom nur die absolut nötigen genetischen Elemente (Promoter, *GOI*, Terminator) integriert. Diese Eigenschaften sind für die Zulassung eines biotechnologischen Prozesses, speziell im Pharmasektor, sehr von Vorteil. Dieses Ziel sollte mittels *red*-Rekombination (1.1) und *rpsL*-basierter Gegenselektion (1.2) erreicht werden.



1.1 *red*-Rekombination

Im Gegensatz zu der *in vitro* Modifikation von Plasmiden, die im Wesentlichen auf dem Einsatz von Restriktionsenzymen und DNA-Ligase basiert, erfordert die Modifikation des *E. coli* Genoms eine *in vivo* Technologie. In dieser Arbeit wurde die *red*-Rekombination verwendet (Murphy, K. C., 1998^[3]). Diese Technologie verwendet ssDNA-Oligomere (H. M. Ellis et al., 2001^[4]) oder doppelsträngige (ds) DNA-Kassetten (D. L. Court et al. 2002^[5]), welche mit den entsprechenden genomischen Zielsequenzen flankiert sind. Über diese terminalen Homologiearme erfolgt eine basengenaue Integration in das Genom. Somit ist diese Technik unabhängig von der Verfügbarkeit geeigneter Restriktionsschnittstellen. Mittels PCR ist es zudem möglich, 50 bp lange Homologiearme durch entsprechende Primer an dsDNA-Kassetten anzufügen. Durch die Verwendung der *red*-Rekombination können gezielt Insertionen, Deletionen und Punktmutationen in das *E. coli* Genom eingefügt werden (Abb. 1).

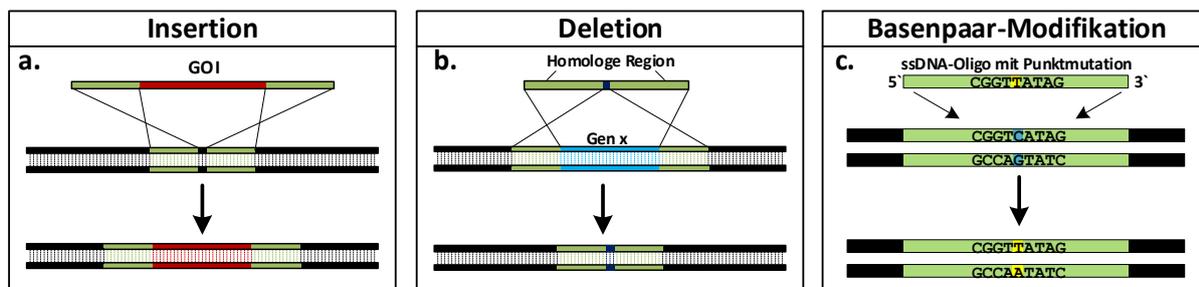


Abb. 1: Darstellung der *E. coli* Genommanipulation via *red*-Rekombination; a. Insertion eines *GOI*. Die homologen Regionen flankieren das *GOI*. Im Insertionslocus liegen die komplementären Bereiche beieinander, zwischen dem das *GOI* rekombiniert wird. b. Bei einer Deletion besteht das Template aus zwei homologen Regionen, welche das zu deletierende Gen flankieren. c. Basenpaar-Modifikationen können mit Einzelstrang-DNA durchgeführt werden. Dabei wird das auszutauschende Nucleotid auf beiden Seiten von etwa 30 nt zielsequent flankiert

Die *red*-Rekombination beruht auf dem Rekombinationsmechanismus des Bakteriophage λ welcher fähig ist, sich in Abwesenheit von *RacA* ins Genom zu integrieren (Brooks K, Clark AJ. 1967^[6]). Um das λ -Rekombinationssystem vom *E. coli* eigenen abzugrenzen, wird es *red* (*recombination defect*)-System genannt. Die *red*-Rekombination basiert auf den Proteinen: Beta, Exo und Gam. Die λ -Exonuklease (kurz Exo) besitzt die Fähigkeit am 5'-phosphorylierten Ende der dsDNA zu binden und die Nucleotide des 5'-Stranges abzuspalten (Korn et al., 1963^[7]). Dabei hinterlässt die λ -Exonuklease einen intakten ssDNA-Überhang des 3'-Stranges. Beta gehört zur Gruppe der ssDNA-Annealing-Proteine (SSAPs). Es bindet an von Exo erzeugte ssDNA und vermittelt die homologe Rekombination mit den entsprechenden Zielbereichen im Genom (Kmiec E, Holloman WK. 1981^[8]). Gam besitzt die Eigenschaft, die *E. coli* eigene Exonuklease *RecBCD* zu inhibieren (A.E. Karu et al., 1975^[9]). Auf diese Weise werden lineare dsDNA-Moleküle in der *E. coli* Zelle stabilisiert. Der Einsatz von Plasmiden, die *E. coli* eine transiente λ -*red* Aktivität verleihen (z.B. pRed/ET), ermöglicht die stammübergreifende Nutzung der Technologie.



Die ursprüngliche Annahme, dass die *red*-Rekombination an dsDNA-Strangbrüchen im Genom stattfindet (Kellenberger G et al., 1961^[10]), wurde durch die Veröffentlichung von Ellis et al. 2001^[4] auf eine neue Fährte geführt. Sie fanden heraus, dass die Rekombination von ssDNA-Oligos eine größere Präferenz zum *lagging-strand* als zum *leading-strand* besitzt. Dies rückte die Replikationsgabel als Zielstruktur der *red*-Rekombination in den Fokus. Die Annahme ist, dass ssDNA-Oligos, sobald sie in die Zelle gelangen, von Beta gebunden werden. Der Beta-ssDNA-Komplex lokalisiert sich in die Replikationsgabel, wo Beta das Annealing an temporärer, ssDNA, der komplementären genomischen Sequenz, fördert. Das ssDNA-Oligo wird anschließend, ähnlich eines Okazaki-Fragmentes, durch den wirtseigenen DNA-Syntheseweg ins Genom rekombiniert (Abb. 2). Somit ist die ssDNA-Rekombination über das *red*-System nur von Beta abhängig.

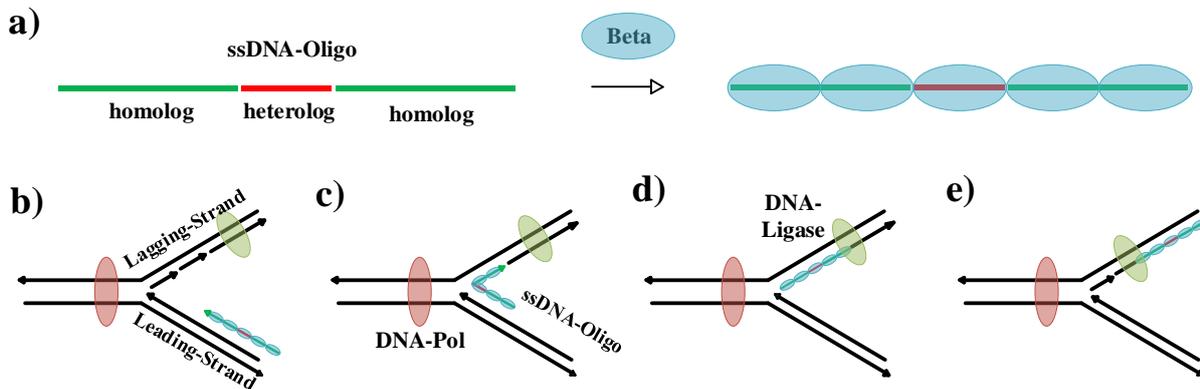


Abb. 2: Modell der *red*-Rekombination eines ssDNA-Oligos; a. Das ssDNA-Oligo besteht aus einer heterologen DNA-Sequenz, welche von zum Genom homologen Sequenzen flankiert ist. Beta bindet am Oligo. b. Der Beta-ssDNA-Komplex migriert in die Replikationsgabel der Wirtszelle. Beta fördert das *annealing* des ssDNA-Oligos an der homologen Region. c. ssDNA-Oligo *anneals*, ähnlich eines Okazaki-Fragmentes, auf den *lagging-strand*. d-e Das Oligo wird vom wirtseigenen DNA-Syntheseweg ins Genom rekombiniert. Das rote Oval stellt die DNA-abhängige-DNA-Polymerase und das grüne Oval die DNA-Ligase dar.

Im Gegensatz zur *red*-ssDNA-Rekombination, existiert kein allgemein anerkanntes Modell der dsDNA-Rekombination. In den vergangenen 20 Jahren stellten Forschungsgruppen mehrere Modelle auf, welche diesen Mechanismus darstellen sollen. Allen gemein ist die Tatsache, dass bei der Rekombination dsDNA neben Beta auch die λ -Proteine Gam und Exo essentiell sind. Erwähnenswert sind vor allem das Stranginvasions-Modell nach Court (D. L. Court, 2002^[5]) oder die Rekombination von dsDNA-Kassetten über ssDNA-Intermediate (Mosberg, J. A., 2010^[11]).



1.2 Die *rpsL*-Gegenselektion

Die *red*-Rekombination besitzt eine Rekombinationsfrequenz von deutlich weniger als 1 % (Mosberg, J. A., 2013^[12]). Die Suche nach erfolgreich rekombinierten Zellen ohne Selektion stellt damit ein zeit- und materialaufwendiges Vorgehen dar. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Gegenselektion auf Basis von Streptomycin durchgeführt, um das *E. coli* Genom markerlos modifizieren zu können. Bei Streptomycin handelt es sich um ein Aminoglycosid-Antibiotikum der Gattung *Streptomyces*. Streptomycin blockiert die Translation von prokaryotischen 70S-Ribosomen, indem es an die 30S-Untereinheit bindet und zu einer Konformationsänderungen führt (A. P. Carter et al., 2000^[13]) (Abb. 3).

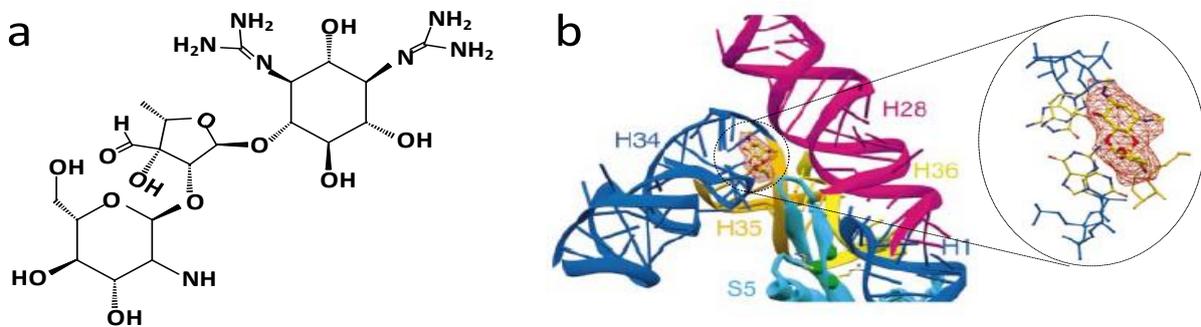


Abb. 3: Streptomycin und dessen Bindung an die ribosomale 30S-Untereinheit; a. Strukturformel von Streptomycin **b.** Bindung von Streptomycins in der ribosomalen 30S-Untereinheit. Diese Interaktion führt zu einer Konformationsänderung, welche die Proteinbiosynthese hemmt (Abbildung nach Carter et al., Nature, vol. 407, 2000^[13]).

Das *rpsL*-Gen codiert für das ribosomale Protein S12 (Bulkley D., 2014^[14]). Der Austausch der Aminosäure Lysin durch Arginin an der 43. Position des von *rpsL*-codierten *E. coli* Proteins S12 führt dazu, dass die Bindung von Streptomycin an die 30S Untereinheit blockiert wird. Dies verleiht dem Bakterium eine Resistenz gegenüber Streptomycin (Y. Tsai, 2014^[15]).

Um die Streptomycin-Resistenz als Gegenselektionsmarker einzusetzen, muss der parentale *E. coli* Stamm zunächst entsprechend modifiziert werden. Im zweiten Schritt wird mittels *red*-Rekombination eine Gegenselektionskassette bestehend aus einem Kanamycin-Resistenzgen und einem Wildtyp *rpsL*-Gen (Abb. 4) in das Genom von *E. coli* eingebracht. Rekombinanden können dann über ihre Kanamycin-Resistenz (positiv) selektioniert werden. Die Gegenwart eines *wt-rpsL*-Gens und eines entsprechend mutiertem *rpsL*-Gens führt in der Regel dazu, dass es zu einer Mischpopulation aus Streptomycin-sensitiven und -resistenten ribosomalen 30S Untereinheiten kommt. Dies führt zu einem Wachstumsdefizit der Rekombinanden in Streptomycin-haltigem Milieu.



Die Gegenselektion erfolgt durch die Insertion der Expressionskassetten, wobei es simultan zur Deletion der Gegenselektionskassette kommt. Somit kann die Gegenselektion über die verlorene Kanamycin-Resistenz und der wiedergewonnenen Streptomycin-Resistenz erfolgen.

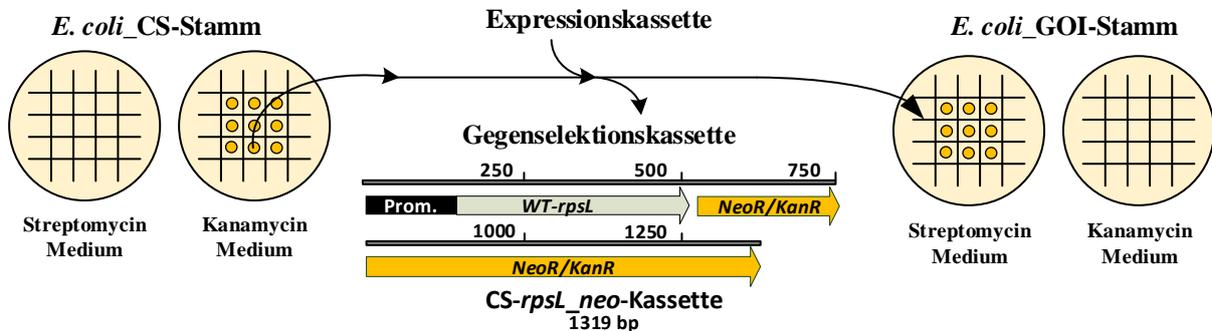


Abb. 4: Darstellung der *rpsL*-Gegenselektion; In dem Streptomycin-resistenten *E. coli* befindet sich die Gegenselektionskassette, die die Streptomycin-sensitive Variante des *rpsL*-Gens enthält, sowie eine Kanamycin-Resistenz verleiht. Aufgrund der zwei *rpsL*-Gen-Varianten kommt es in der Zelle zu einer Mischpopulation aus Streptomycin-resistenter und -sensitiver Ribosomen, was das Wachstum der Zelle stark hemmt. Erfolgt nun eine Rekombination, bei welcher die Gegenselektionskassette durch die Expressionskassette ersetzt wird, kehren sich die Antibiotikatoleranzen um. Durch das Deletieren der Gegenselektionskassette gewinnt der Stamm seine Streptomycin-Resistenz zurück und verliert seine Kanamycin-Resistenz.

Ziel der Bachelorarbeit war es einen *recombination-shuttle-strain* (*RRS*) zu konstruieren, in welchen über *red*-vermittelte Rekombination eine Expressionskassette in einen geeigneten Locus integriert werden kann. Die Detektion der positiv rekombinierten Zellen erfolgte über eine *rpsL*-basierte Gegenselektion. Als parentalen Stamm wurde *E. coli* BL21(DE3) gewählt. Zur Nutzung der *rpsL*-Gegenselektion wurde *E. coli* BL21(DE3), über eine Punktmutation im *rpsL*-Gen eine Streptomycin-Resistenz verliehen. Die Punktmutation wurde über *red*-Rekombination eines ssDNA-Oligonukleotides eingefügt. In den erzeugten Streptomycin-resistenten Stamm - BL21(DE3)str^R - wurde anschließend eine Gegenselektionskassette (*CS-rpsL-neo*) integriert. Diese besitzt das Streptomycin-sensitive, Wildtyp-*rpsL*-Gen und ein Kanamycin-Resistenzgen.

Der erzeugte *RRS* - BL21(DE3)str^R_CS-*rpsL-neo* - ist Kanamycin-resistent und wird von Streptomycin stark im Wachstum gehemmt. Durch Gegenselektion kann die *rpsL*-Gegenselektionskassette durch eine beliebige, markerlose DNA-Sequenz, z.B. eine Expressionskassette, ersetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *rpsL*-basierte Gegenselektion erfolgreich eingesetzt, um eine *eGFP*-Expressionskassette, welche ein IPTG-induzierbares T7-Expressionssystem trägt, in das *E. coli* Genom zu integrieren.



2 Material und Chemikalien

2.1 Bakterienstämme

Tabelle 1: Liste der verwendeten Bakterienstämme. Quelle des Genotyp: openwetware.org

Bakterien	Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3)	<i>E. coli</i> str. B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S)</i>

2.2 Plasmide/BAC

Tabelle 2: Liste der verwendeten Vektoren

Vektor	Hersteller:
pRed/ET	Gene Bridges GmbH, Heidelberg
pET30a <i>ccdB</i> GG	HAW-Hamburg, Hamburg
pET30a_ <i>eGFP</i> _GG	HAW-Hamburg, Hamburg
BAC pBeloBac11_ <i>rpsL</i> _neo	Gene Bridges GmbH, Heidelberg

*Sequenzen und Karten der Plasmide sind dem Anhang in beigelegt

2.3 Primer und Oligonukleotide

Tabelle 3: Liste der verwendeten Primer, synthetisiert von Biomers GmbH

Name	Primersequenz (5' → 3')	N _{Nukl.}	GC-Gehalt	θ _m
<i>rpsL</i> _fwd	GCGTCCTCATATTGTGTGA	19	47,4 %	54,5 °C
<i>rpsL</i> _rev	CAGGATTGTCCAAAACCTCTACG	22	45,5 %	58,4 °C
CS-cas-HA_fwd	ACAGAATGAAAATTTTTCTGTCTCTCTTCGTTATT AATGTTTGTAATTGAGGCCTGGTGATGATGGCGG	70	68,4 %	63,1 °C
CS-cas-HA_rev	ACAGAGAGATAAAGTCTTCAGTCTGATTTAAATAAG CGTTGATATTCAGTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGG	73	68,4 %	63,1 °C
HA_ <i>eGFP</i> _fwd:	CAGAATGAAAATTTTTCTGTCTCTCTTCGTTATT ATGTTTGTAATTGATAATACGACTCACTATAGGG	70	30,0 %	63,0 °C
HA_ <i>eGFP</i> _rev	GACAGAGAGATAAAGTCTTCAGTCTGATTTAAATAA GCGTTGATATTCAGCAAAAACCCCTCAAGACCC	70	39,0 %	61,0 °C
glmS-pstS_fwd	ACCTGGCAAAATCGGTTACG	20	50,0 %	56,0 °C
glmS-pstS_rev	GTTTGTGGCTACGAGAAGC	20	50,0 %	56,0 °C
strR-Oligo	CACGGCATACTTTACGCAGCGCGGAGTTCGGTTTAC GTGGAGTGGTAGTATATACACGAGTACATACGCCA	71	50,0 %	

2.4 Nährmedien und Lösungen

Tabelle 4: Liste der verwendeten Kultivierungsmedien

Nährmedium	Substanz	Endkonz.	Hersteller
Luria Bertani (LB) (flüssig, pH: 7,0)	Trypton	10 g L ⁻¹	BD Biosciences
	Hefeextrakt	5 g L ⁻¹	Carl Roth
	NaCl	5 g L ⁻¹	Carl Roth
Luria Bertani (LB) (fest, pH: 7,0)	Trypton	10 g L ⁻¹	BD Biosciences
	Hefeextrakt	5 g L ⁻¹	Carl Roth
	NaCl	5 g L ⁻¹	Carl Roth
	Agar-Agar	15 g L ⁻¹	Carl Roth
Luria Bertani (LB)+amp50 (fest, pH: 7,0)	Trypton	10 g L ⁻¹	BD Biosciences
	Hefeextrakt	5 g L ⁻¹	Carl Roth
	NaCl	5 g L ⁻¹	Carl Roth
	Agar-Agar	15 g L ⁻¹	Carl Roth
	Ampicillin	50 mg L ⁻¹	Carl Roth



Tabelle 5: Liste der verwendeten Kultivierungsmedien (Fortsetzung)

Nährmedium	Substanz	Endkonz.	Hersteller
Luria Bertani (LB)+str50 (fest, pH: 7,0)	Trypton	10 g L ⁻¹	BD Biosciences
	Hefeextrakt	5 g L ⁻¹	Carl Roth
	NaCl	5 g L ⁻¹	Carl Roth
	Agar-Agar	15 g L ⁻¹	Carl Roth
	Streptomycin	50 mg L ⁻¹	Carl Roth
Luria Bertani (LB)+str25 (fest, pH: 7,0)	Trypton	10 g L ⁻¹	BD Biosciences
	Hefeextrakt	5 g L ⁻¹	Carl Roth
	NaCl	5 g L ⁻¹	Carl Roth
	Agar-Agar	15 g L ⁻¹	Carl Roth
	Streptomycin	25 mg L ⁻¹	Carl Roth
Luria Bertani (LB)+str25+IPTG48 (fest, pH: 7,0)	Trypton	10 g L ⁻¹	BD Biosciences
	Hefeextrakt	5 g L ⁻¹	Carl Roth
	NaCl	5 g L ⁻¹	Carl Roth
	Agar-Agar	15 g L ⁻¹	Carl Roth
	IPTG	48 mg L ⁻¹	Carl Roth
	Streptomycin	25 mg L ⁻¹	Carl Roth
Luria Bertani (LB)+kan15 (fest, pH: 7,0)	Trypton	10 g L ⁻¹	BD Biosciences
	Hefeextrakt	5 g L ⁻¹	Carl Roth
	NaCl	5 g L ⁻¹	Carl Roth
	Agar-Agar	15 g L ⁻¹	Carl Roth
	Kanamycin	15 mg L ⁻¹	Carl Roth

2.5 Mikrobiologische Verfahren

Ansetzen einer mikrobiellen Dauerkultur

Reagenz	Hersteller
Glycerin	Carl Roth

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Schüttelinkubator	K15/500	Axon Labortechnik
Kryoröhrchen	Reaktionsgefäße 2,0 mL, steril mit Deckel, freistehend	Carl Roth
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS	Thermo scientific

Patchen von Bakterien auf Antibiotikaresistenz

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Inkubator		Binder
Sterile Zahnstocher		
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS	Thermo scientific

Verdünnungsausstriche zur Erzeugung von Einzelkolonien

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Inkubator		Binder
Ein-weg-Impföse	Einmal-Impfösen, PS, steril	Carl Roth
Sicherheitswerkbank	HERAsafe KS	Thermo scientific



Transformation von Bakterien via Elektroporation

Reagenz		Hersteller
Glycerin		Carl Roth
Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Schüttelinkubator	K15/500	Axon Labortechnik
Mikroreaktionsgefäße (2 mL)	Rotilabo®-Reaktionsgefäße	Roth
Schüttelinkubator (2 mL-Gefäße)	ThermoMixer F2.0	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Cenrifuge 5418R	Eppendorf
Elektroporator	Eporator	Eppendorf
Elektroporationsküvette	Electroporation Cuvette	Bulldog Bio

λ -red-Rekombination

Reagenz		Hersteller
Glycerin		Carl Roth
L (+) - Arabinose		Carl Roth
Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Schüttelinkubator	K15/500	Axon Labortechnik
Mikroreaktionsgefäße (2 mL)	Rotilabo®-Reaktionsgefäße	Carl Roth
Schüttelinkubator (2 mL-Gefäße)	ThermoMixer F2.0	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Cenrifuge 5418R	Eppendorf
Elektroporator	Eporator	Eppendorf
Elektroporationsküvette	Electroporation Cuvette	Bulldog Bio

Aufnahme einer Wachstumskurve

Reagenz		Hersteller
LB-Medium		Eigenproduktion
Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Schüttelinkubator	K15/500	Axon Labortechnik
Mikroreaktionsgefäße (2 mL)	Rotilabo®-Reaktionsgefäße	Carl Roth
Schüttelinkubator (2 mL-Gefäße)	ThermoMixer F2.0	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Cenrifuge 5418R	Eppendorf
Spektralphotometer	Genesys 10S UV-Vis	Thermo Fisher
Küvette	UV Küvette halbmikro	Brand

Bakterielle Expression

Reagenz		Hersteller
LB-Medium		Eigenproduktion
IPTG		Carl Roth
Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Schüttelinkubator	K15/500	Axon Labortechnik
Mikroreaktionsgefäße (2 mL)	Rotilabo®-Reaktionsgefäße	Roth
Schüttelinkubator (2 mL-Gefäße)	ThermoMixer F2.0	Eppendorf
Kühlzentrifuge	Cenrifuge 5418R	Eppendorf
Spektralphotometer	Genesys 10S UV-Vis	Thermo Fisher
Küvette	UV Küvette halbmikro	Brand



2.6 Molekularbiologische Methoden

PCR

Reagenz		Hersteller
Phusion Hot Start II DNA-Polymerase		Thermo scientific
5x Phusion Buffer		Thermo scientific
Roti-Mix PCR 3 (10 mM)		Carl Roth
Dnpi		New England Biolabs
Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Thermocycler	FlexCycler ²	Analytik jena
Thermocycler (Gradient)	Realplex ⁴	Eppendorf
Laborzentrifuge	Centrifuge 5418 R	Eppendorf
Thermoschüttler	ThermoMixer F2.0	Eppendorf
Kit	Bezeichnung	Hersteller
PCR-Aufreinigungskit	Microspin Cycle Pure Kit	peqlab

2.7 Elektrophoresen

Agarosegelelektrophorese

Reagenz		Hersteller
Agarose Broad Range (Roti@garose BioScience-Grade)		Carl Roth
Rotiphorese® 50x TAE Puffer		Carl Roth
6 x Gelladepuffer -Bromphenolblau		Carl Roth
SYBR® Safe DNA Stain		Edvotek
Gelgreen		Biotium
250 bp-DNA Ladder		Carl Roth
Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoresekammer	Compact XS/S	Biometra
Low voltage Power Supply	PS 305T XL	Analytik jena
Gel-Dokumentation	GelStick Imager	Intas

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Reagenz		Hersteller
Probenpuffer (Roti@-Load 2)		Carl Roth
Clelands Reagenz (DTT)		Carl Roth
Laufpuffer (Rotiphorese® 10x SDS-PAGE)		Carl Roth
Seebblue®Plus2 Pre-Strained Protein Standard		Carl Roth
Roti@Blue (5x)		Carl Roth
Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Thermoschüttler	ThermoMixer F2.0	eppendorf
SDS-Polyacrylgele	SERVAGel™ TG PRiME™ 12%	SERVA
Elektrophoresekammer	XCell SureLock™ Electrophoresis	novex
Gel-Dokumentation	Gel Doc™ EZ Gel Documentation	Biorad



3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Verfahren

Alle Medien und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Medien und andere Lösungen mit einem Volumen von mehr als 100 mL wurden in einem unsterilen Gefäß angesetzt und steril autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen und Lösungen mit kleinem Volumen (< 100 mL) wurden mittels eines Spritzenvorsatzfilters (10 µm) in sterile Gefäße sterilfiltriert. Wurde eine Vorkultur angesetzt, wurden 25 mL LB-Medium in einem 100 mL Kulturkolben mit einer entsprechenden Einzelkolonie oder mikrobiellen Dauerkultur angeimpft. Besitzt der entsprechende Bakterienstamm eine Antibiotikaresistenz, so wurde dem Medium zur Selektion das Antibiotikum beigefügt. Die Kultivierung erfolgte in der Regel bei 37 °C bei 200 rpm.

3.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung von *E. coli*

Die Erzeugung von Einzelkolonien erfolgte durch Drei-Strich-Verdünnungsausstriche des entsprechenden Bakterien-Stammes auf LB-Medium, unter Umständen mit geeigneten Antibiotikazusatz. In der Regel erfolgte die Inkubation bei 37 °C über Nacht. Gelagert wurden die Zellen bei 4 °C und wurden bis zu einem Monat genutzt.

3.1.2 Ansetzen einer mikrobiellen Dauerkultur

Um während der Durchführung aus jedem Stadium des Projektes einen *Backup* des modifizierten Bakterienstammes zu besitzen, wurden von allen Zwischenprodukten mikrobielle Dauerkulturen erstellt. Dazu wurde eine Einzelkolonie des zu konservierenden Bakterienstammes in einem Kulturkolben (100 mL) in 25 mL Nährmedium überführt. Diese Flüssigkultur wurde über Nacht bei geeigneter Temperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 15 %) und in einem Kryoröhrchen bei – 80 °C eingelagert.

3.1.3 *Patchen* von Bakterien auf Antibiotikasensitivität

Die Überprüfung einer Bakterienkultur auf Antibiotikasensitivität erfolgte über ein *Patch*-Verfahren. Dabei wurde eine zu prüfende Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und auf mehrere Medienplatten übertragen, wobei die erste stets ein Medium war, auf dem das Wachstum bestätigt wurde, z.B. antibiotikafreies LB-Medium. Diese Platten wurden anschließend bei geeigneten Bedingungen inkubiert und am Folgetag ausgewertet.



3.1.4 Reinigen von Kulturplatten zur Erzeugung von Einzelkolonien

Waren nach einer Rekombination keine klar abgegrenzten Einzelkolonien zu erkennen, so wurde die Kulturplatte gereinigt. Dabei wurde mittels einer *single-use*-Impföse Probenmaterial entnommen und auf einem Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei geeigneten Kultivierungsbedingungen über Nacht.

3.1.5 Transformation von Bakterien *via* Elektroporation

Um Vektoren in Bakterienzellen zu transformieren, wurde das Verfahren der Elektroporation gewählt. Dafür wurde eine Vorkultur aus einer Einzelkolonie des zu transformierenden Stammes angesetzt und über Nacht bei geeigneter Temperatur inkubiert. Am Folgetag wurden je 1,4 mL LB-Medium mit 50 µL der Vorkultur inokuliert und für zwei Stunden bei geeigneter Temperatur in einem für 2 mL Mikroreaktionsgefäß geeigneten Schüttelinkubator bei 700 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 5000 rpm in einer auf 4 °C gekühlten Kühlzentrifuge pelletiert. Für die Elektroporation müssen die Zellen vom Medium befreit und in Glycerin aufgenommen werden. Dazu wurden die Zellen zweimal in Glycerin (10% w/V) gewaschen und schlussendlich in 50 – 100 µL Glycerin (10 % w/V) aufgenommen. Anschließend wurde 50 – 100 ng des Vektors hinzugefügt. Nach vorsichtigem Mischen der Bakteriensuspension, wurde der Transformationsansatz in eine auf -20 °C gekühlte Elektroporationsküvette mit einer Spaltbreite von 1 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1700 V, 10 µF, 600 Ω. Die elektroporierten Zellen wurden daraufhin, in der Elektroporationsküvette, in 1 mL 4 °C kaltem LB-Medium aufgenommen und in ein 2 mL Mikroreaktionsgefäß überführt. Da sich in der Regel auf eingebrachte Vektoren ein Selektionsmarker befinden, wurden die transformierten Zellen 30 Minuten bei geeigneter Temperatur bei 700 rpm inkubiert, um die Expression des entsprechenden Resistenzgens zu ermöglichen. Am Ende wurden die Zellen auf geeignete Nährmedien-Platten ausplattiert und über Nacht inkubiert. Bei diesem Verfahren wird eine Negativkontrolle durchgeführt, in der der Vektor durch $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ ersetzt wird.

Transformation von BL21(DE3) mit pRed/ET

Das Plasmid pRed/ET ist essenziell für die *red*-Rekombination. Es dient der Expression der *red*-Proteine, deren Gene über ein Arabinose-induzierbares Operon-System reguliert werden. Die *E. coli* BL21(DE3)-Vorkultur wurde in 25 mL LB-Lennox-Medium in einem 100 mL Kulturkolben bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Für die Transformation wurden 40 ng Plasmid eingesetzt. Zusätzlich besitzt dieses Plasmid ein thermosensitiven *ori*, welcher den Zweck hat, dass Plasmide - nach erfolgreicher Rekombination - durch eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur entfernt werden können. Diesbezüglich muss darauf geachtet werden, dass mit pRedt/ET transformierte Zellen bei Temperaturen $\leq 30^\circ\text{C}$ inkubiert werden



3.1.6 *red*-Rekombination

Der zu rekombinierende Bakterienstamm, wurde im Vorfeld mit dem pRed/ET Plasmid transformiert. Aus einer Einzelkolonie der transformierten Zellen wurde eine Vorkultur angesetzt und über Nacht bei maximal 30 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 100 µL der Vorkultur in 1,4 mL LB-Medium aufgenommen und bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase bei gleichbleibenden Kultivierungsbedingungen inkubiert. Nach Auftreten deutlicher Schlierenbildung wurde die Kultur mit 50 µL 10 % (w/V) L-Arabinose Lösung induziert und die Kultivierungstemperatur auf 37 °C erhöht. Das pRed/ET-Plasmid besitzt einen Arabinose-induzierbaren Operator, welcher die Expression der *red*-Gene (*exo*, *bet* und *gam*) reguliert. Die Expression der *red*-Proteine erfolgte über eine Stunde. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C zweimal mit Glycerin gewaschen, um den Elektrolytgehalt zu reduzieren. Die elektrokompenten Zellen wurden mit 100 ng der entsprechenden linearen DNA versetzt und elektroporiert (1700 V, 10 µF, 600 Ω). Nach der Elektroporation wurden die rekombinierten Zellen in LB-Medium aufgenommen, vor der Selektion eine Stunde bei 37 °C, 700 rpm inkubiert und anschließend auf geeigneten Medien ausplattiert. Bei diesem Verfahren wurde immer eine Negativkontrolle durchgeführt, in der die lineare DNA durch $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ ersetzt wurde. Zusätzlich wurde die Regulation des Arabinose-Operons überprüft, indem bei einem zusätzlichen Ansatz keine Arabinose-Induktion erfolgte.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Plasmid-DNA-Präparation

Plasmide wurden mittels Mini-Plasmid-Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben isoliert. Das Kit beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Aufreinigung über eine SPE-Säule. Es wurden pro Säule 2 mL Bakteriensuspension verwendet. Die Elution erfolgte jeweils mit 10 µL $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$, welches zweimal auf die Säulenmembran pipettiert wurde.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl: *polymerase chain reaction*) ist ein molekular-biologisches Verfahren, zur Vervielfältigung von DNA. Sie wurde genutzt, um Homologiearme anzufügen oder definierte DNA-Sequenzen - Zwecks der Analyse - zu amplifizieren. Zur Erzeugung fehlerfreier Amplifikate wurde eine DNA-abhängige DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität (*proof-reading*) verwendet (Phusion Hot Start II von Thermo Fisher). Templates, welche aus Bakterien stammen (colony PCR), wurden erzeugt, indem eine Einzelkolonie gepickt und



in eine 20 μL $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ -Kultur überführt wurde, wovon 5 μL für eine PCR verwendet wurde. Die Parameter des Temperaturprogrammes der jeweiligen PCR wurden der Länge des Templates, der Enzymeigenschaften der DNA-Polymerase und der Schmelztemperaturen der Primer angepasst. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte über das Microspin Cycle Pure Kit (Peqlab) nach Herstellerangaben.

Herstellung der Gen-Kassetten

Die Gen-Kassetten wurden von Plasmiden oder BACs mittels Primern PCR-amplifiziert. Dabei wurden an das Produkt flankierende Homologiearme angefügt. Die Herstellung der Genkassette erfolgte über eine Gradienten-PCR, da die Annealingtemperatur der Primer, aufgrund der Homologiearme, schwierig zu kalkulieren ist. Um falsch positive Rekombinationsergebnisse zu vermeiden, wurden die PCR-Produkte mit *DpnI* verdaut. Das Restriktionsenzym *DpnI* hydrolysiert ausschließlich methylierte Erkennungssequenzen. Das bedeutet, dass die von Bakterien vervielfältigten, sprich methylierten, Templates verdaut werden, wohingegen die in der PCR synthetisch erzeugten PCR-Produkte unversehrt bleiben. Andernfalls könnten in der späteren Rekombinationen positive Ereignisse suggeriert werden, welche allerdings auf das Transformieren intakter Templates zurückzuführen sind.

Herstellung von PCR-Produkten zur Sequenzierung

Um gewählte Gensequenzen auf Nukleotidebene zu überprüfen, wurden diese über PCR vervielfältigt und bei der Firma eurofins genomics sequenziert.

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte über spektralphotometrischer Messung am Nanodrop 2000c (Thermo Fisher). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Reinheitsbestimmung erfolgte durch das Verhältnis der Adsorptionskoeffizienten von 260/280. Hier werden vor allem Proteinverunreinigungen detektiert, wobei eine Probe bei einem Wert von 1,8 – 2,0 als verunreinigungsfrei bezeichnet werden kann. Der Relationswert 260/230 sagt zusätzlich etwas über die Reinheit aus. Hier werden Verunreinigungen von z.B. organischen Lösungsmittel wie Phenol gemessen.



3.3 Elektrophoresen

3.3.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde eingesetzt, um Nukleinsäuren aufzutrennen. Dazu wurde eine submarine Apparatur verwendet, in dem sich 1-1,5 %-ige (w/V) Agarosegele horizontal, bedeckt mit TAE-Puffer, in einem elektrischen Feld befinden. Die Analyseproben wurden vor dem Beladen mit einem 6x Ladepuffer (Carl Roth) versetzt. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern entlang des angeschlossenen elektrischen Feldes in Richtung der Anode. Je nach Basenpaaranzahl und Porengröße des Agarosegels besitzen die Nukleinsäurefragmente eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität, was zu einer Auftrennung der Fragmente nach Größe führt. Um eine relative Größenbestimmung vorzunehmen, wurde ein Standard-Marker (250 bp DNA Ladder, Carl Roth) mitgeführt. Durch Hinzufügen von Sybr® Safe DNA Stain (Edvotek) beim Gießen des Gels, können die Nukleinsäurefragmente durch Anregung mit UV-Strahlung detektiert werden. Die angelegte Laufspannung betrug 80-120 V und die Laufzeit betrug 30 – 45 Minuten.

3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Biomolekülen entlang eines elektrischen Feldes, innerhalb eines Acrylamidträgers. Sie diente dazu, die Expression des rekombinanten Proteins im Proteom von *E. coli* BL21(DE3)str^R_{eGFP} nachzuweisen. Dazu wurde die Probe zu gleichen Teil mit Probenpuffer (5 Teile Roti®-Load 2 + 0,1 Teile Clelands Reagenz (DTT) + 4,9 Teile ddH₂O) versetzt, fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht und auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach einer Zentrifugation (30 Sekunden bei 13.000 rpm) wurde die Probe auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel (Serva) geladen, welches sich in einer vertikalen Elektrophoresekammer befand. Der verwendete Laufpuffer war Rotiphorese® SDS-PAGE (Carl Roth). Zur indirekten Bestimmung der Molekülmassen wurde ein Standard-Marker (Seebblue®Plus2 Pre-Strained Protein Standard) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte jeweils bei einer Laufspannung von 150 V für 1,5 Stunden. Nach erfolgreicher Auftrennung wurde das Polyacrylamidgel unter leichtem Schwenken über Nacht in einer Färbelösung (1 Teil Roti®Blue (5x) + 1 Teil Ethanol (>99,8%) + 3 Teile ddH₂O) inkubiert. Das Entfärben erfolgte schonend über fünf Tage in ddH₂O, wobei dieses täglich ausgetauscht wurde. Die abschließende Detektion erfolgte über das Gel Doc™ EZ Gel Documentations System (Biorad).



4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche

4.1.1 Sensitivitätstest auf Streptomycin bei *E. coli* BL21(DE3)

Die Resistenz gegen Streptomycin kann in *E. coli* durch eine spontane Punktmutation im *rpsL*-Gen hervorgerufen werden. Es ist für den Versuchsablauf essenziell, dass der Ausgangsstamm gegenüber Streptomycin sensitiv ist. Dies wurde durch Ausstreichen einer *E. coli* BL21(DE)-Einzelkolonie auf Streptomycin-haltigen (25 mg/L) LB-Agar-Platten überprüft. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es konnte in Gegenwart von Streptomycin kein Wachstum beobachtet werden (Abb. 5).

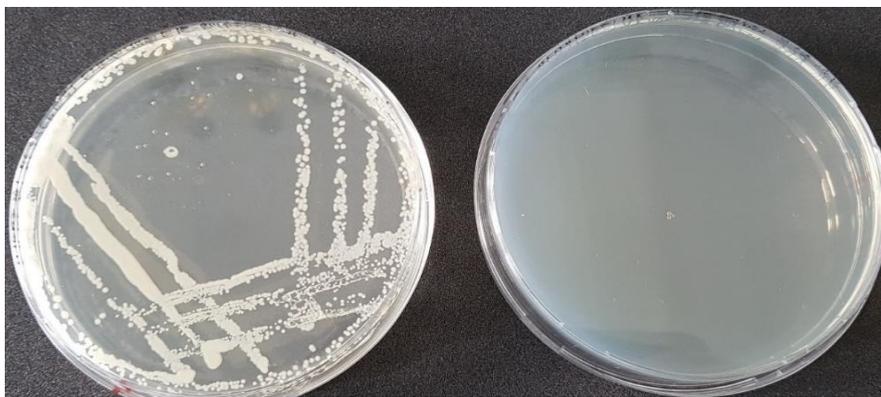


Abb. 5: Ergebnis des Streptomycin-Sensitivitäts-Tests von *E. coli* BL21(DE3); *E. coli* BL21(DE3) wurde via Drei-Strich-Verdünnungsausstrich-Verfahren jeweils auf LB-Medium (links) und auf LB+Str25 (rechts) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 C.

4.1.2 Sensitivitätstest auf Kanamycin und Ampicillin bei *E. coli* BL21(DE3)

Des Weiteren ist es für die Selektion der mit pRed/ET-transformierten Zellen von Nöten, dass *E. coli* BL21(DE3) eine Sensitivität gegenüber Ampicillin besitzt. Ebenfalls von Bedeutung für die Gegenselektion ist die Sensitivität gegenüber Kanamycin. Dies wurde analog zu 4.1.1 überprüft. Für *E. coli* BL21(DE3) konnte in Gegenwart von Ampicillin und Kanamycin kein Wachstum beobachtet werden (Abb. 6 u. 7).



Abb. 6: Ampicillin-Sensitivitäts-Test von *E. coli* BL21(DE3); Drei Stämme wurden jeweils auf LB-Medium (links) und auf LB+Amp50 (rechts) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 C. I: *E. coli* BL21(DE3); II: *E. coli* BL21(DE3)+pRed/ET; III: *E. coli* DH10B +pRed/ET; IV: *E. coli* DH10B

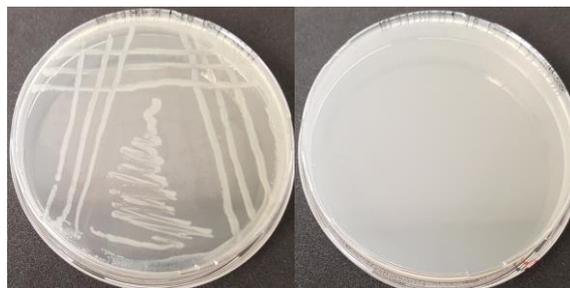


Abb. 7: Kanamycin-Sensitivitäts-Test von *E. coli* BL21(DE3); *E. coli* BL21(DE3) wurde via Drei-Strich-Verdünnungsausstrich-Verfahren jeweils auf LB-Medium (links) und auf LB+Kan15 (rechts) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 C.

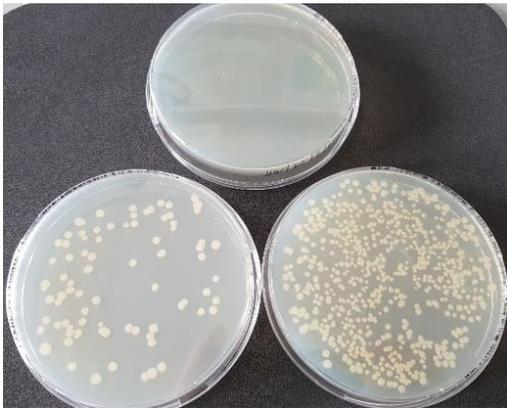


4.2 Einfügen einer Str^R-Punktmutation in *E. coli* BL21(DE3)

Zur Durchführung einer *rpsL*-basierten Gegenselektion, muss dem parental Stamm eine Genom-codierte Streptomycin-Resistenz verliehen werden. Dies erfolgte durch eine *red*-Rekombination mit dem Str^R-Oligo, welches das *rpsL*-Gen entsprechend modifiziert.

4.2.1 Transformation von pRed/ET in *E. coli* BL21(DE3)

Für die Rekombination von *E. coli* BL21(DE3) mittels *red*-Rekombination wurde der Stamm mit pRed/ET transformiert (3.1.5). Die Transformation von pRed/ET war erfolgreich (Abb. 8).



Agarplatte	CFU
Ø-H ₂ O-Kontrolle	0
100 µL BL21(DE3) + pRed/ET	88
900 µL BL21(DE3) + pRed/ET	< 400

Abb. 8: LB-Amp50-Agarplatten von *E. coli* BL21(DE3)+pRed/ET; Oben: Ø-H₂O-Kontrolle; Unten links: 100 µL BL21(DE3) +pRed/ET; Unten rechts: 900 µL BL21(DE3) +pRed/ET. Links die Ergebnistabelle der Auszählung der colony forming units (CFU).

4.2.2 *red*-Rekombination von *E. coli* BL21(DE3) mit Str^R-Oligo

Zur Erzeugung der zur Streptomycin-Resistenz führenden genomischen *rpsL* Mutation, wurde das ssDNA-Oligodesoxynukleotid - Str^R-Oligo - verwendet. Dieses Str^R-Oligo bewirkt einen Austausch des Nukleotidquartetts "TAAA" an den Positionen 126-129 des *rpsL*-Gens zu "ACGT" (Abb. 9). Dies führt zu einem Aminosäureaustausch an der 43. Position der Aminosäuresequenz von Lysin zu Arginin. Aufgrund der Erkenntnis, dass *red*-Rekombinationen auf dem *lagging-strand* eine bis zu 80 % höhere Rekombinationsfrequenz besitzen (Ellies et al., 2003^[4]), wurde das Str^R-Oligo als *reverse complement* entworfen.

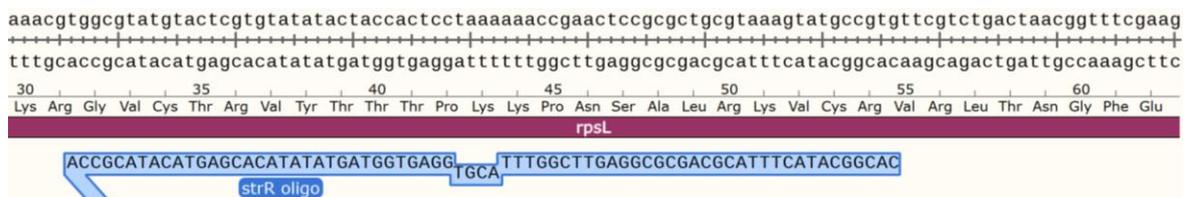


Abb. 9: *Alignment*: Str^R-Oligos und genomisches *rpsL*-Gens; Gezeigt ist ein Ausschnitt der *rpsL*-Gensequenz von *E. coli* BL21(DE3). Vergleichend wurde die Sequenz des Str^R-Oligos angelegt, welche die vier nicht-komplementären Basen enthält, die zu einer Streptomycin-Resistenz der bakteriellen Ribosomen führt. Das Str^R-Oligo ist als *reverse complement* ausgelegt und zielt während der Rekombination auf den *lagging-strand* der Replikationsgabel.

Für die *red*-vermittelte Rekombination wurden 100 ng des Str^R-Oligos eingesetzt (3.1.6). Die rekombinierten Zellen wurden auf LB-str25 Medien ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Der modifizierte Stamm wird im Folgendem als *E. coli* BL21(DE3)str^R bezeichnet.



In Gegenwart von Streptomycin konnte *E. coli* BL21(DE3)str^R kultiviert werden, wohingegen ohne den Einsatz des Str^R-Oligos keine koloniebildenden Einheiten zu erkennen sind (Abb. 10). Auch ohne Arabinose-Induktion der *red*-Expression wurden Kolonien beobachtet. (Abb. 11).

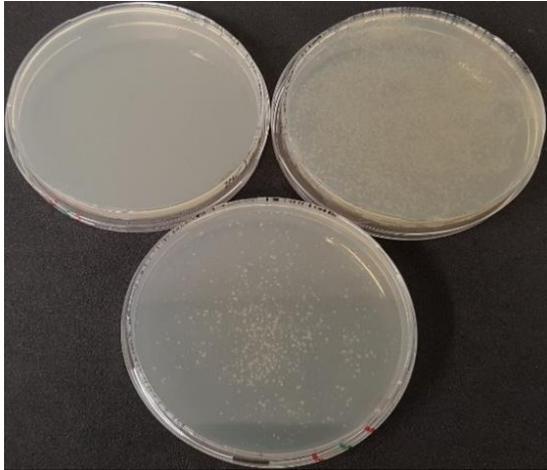


Abb. 10: LB-str25-Agarplatten von BL21 (DE3)str^R; Oben links: Ø-H₂O-Kontrolle; Unten: 100 µL BL21 (DE3)str^R; Oben rechts: 900 µL BL21(DE3)str^R; Inkubiert bei 30 °C über Nacht

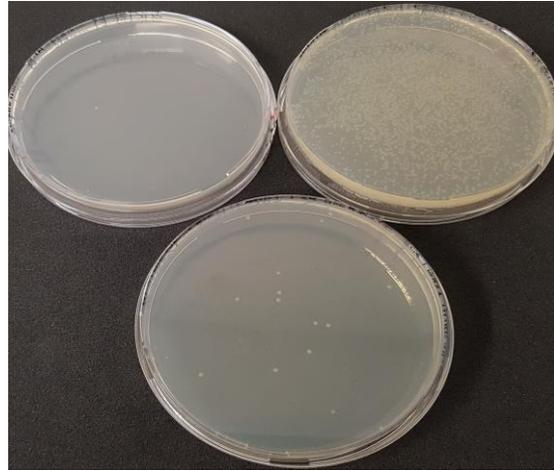


Abb. 11: LB-str25-Agarplatten von BL21 (DE3)str^R ohne Arabinose-Induktion; Oben links: Ø-H₂O-Kontrolle; Unten: 100 µL BL21(DE3)str^R; Oben rechts: 900 µL BL21 (DE3)str^R; Inkubiert bei 30 °C über Nacht

4.2.3 Patch-screening von *E. coli* BL21(DE3)str^R auf Str^R und Amp^S

Die rekombinierten *E. coli* BL21(DE3)str^R-Zellen wurden anschließend auf Selektionsmedien übertragen. Dies diente der Sicherstellung, dass die Zellen die gewünschte *rpsL*-Punktmutation besitzen (Patch auf LB-str25). Zusätzlich wurden dieselben Kolonien auf Ampicillin-Sensitivität hin überprüft. Dies sollte zum einen den thermosensitiven *ori* des pRed/ET-Plasmids überprüfen. Da eine Temperaturerhöhung von 30 °C auf 37 °C nach Arabinose-Induktion für die *red*-Rekombination notwendig ist muss sichergestellt werden, dass der weiterverwendete Klon keine Plasmid-Artefakte übernimmt. Es wurden 16 Kolonien überprüft. Dafür wurden jeweils eine LB+str25-Platte und eine LB+amp50-Platte in 16 Kompartimente unterteilt und mit *E. coli* BL21(DE3)str^R beladen (3.1.3). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Das Ergebnis zeigt, dass 16 von 16 ausgewählten Einzelkolonien eine Streptomycin-Resistenz und 14 von 16 keine Ampicillin-Resistenz besitzen (Abb. 12).

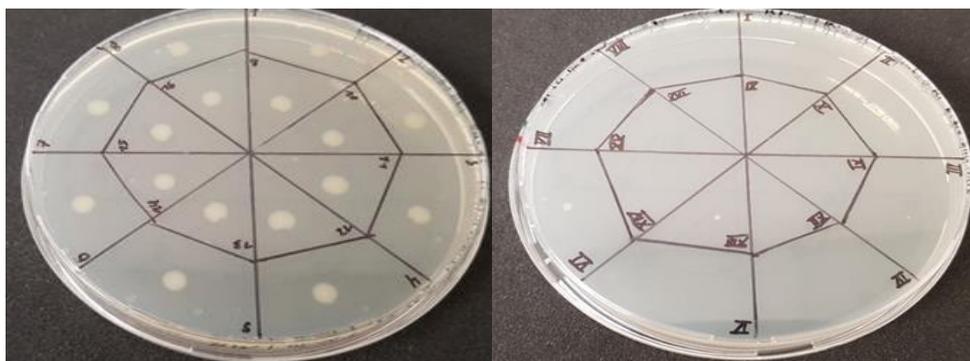


Abb. 12: Patch-screening von *E. coli* BL21(DE3)str^R auf Str^R und Amp^S; (links) LB+str25-Platte mit 16 Kolonien der *E. coli* BL21(DE3)str^R; 16. (rechts) LB+amp50-Platte mit 16 Kolonien der *E. coli* BL21(DE3)str^R



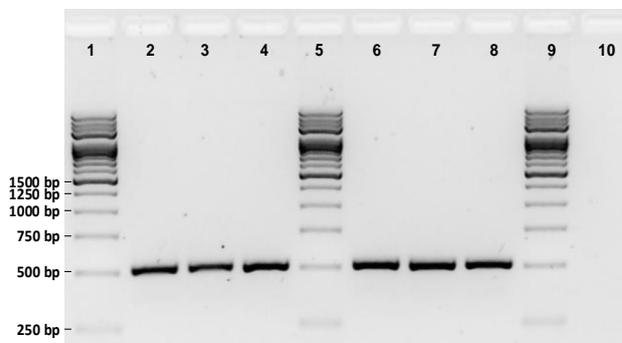
4.2.4 Sequenzanalyse des *rpsL*-Gens von *E. coli* BL21(DE3)*str*^R

Zum Nachweis der gewünschten Punktmutationen im *rpsL*-Gen von *E. coli* BL21(DE3)*str*^R wurde der entsprechende Abschnitt sequenziert und mit dem des parentalem Stamms verglichen. Es wurde eine *colony*-PCR (3.2.2) bei *E. coli* BL21(DE3) eines Klons im Dreifachansatz und bei *E. coli* BL21(DE3)*str*^R von sieben Klonen durchgeführt (Abb. 13). Dazu wurde das Primerpaar *rpsL*_fwd und *rpsL*_rev verwendet.

<u>Ansatz</u>		<u>Temp. Programm</u>	
HF-Buffer (5x)	: 10,0 µL	98 °C : 120s	
dNTP's (2,5 mM each)	: 1,0 µL	98 °C : 45 s	← 5x
HA_eGFP_fwd (10 pM)	: 0,25 µL	56 °C : 15 s	
HA_eGFP_rev (10 pM)	: 0,25 µL	72 °C : 15s	
Phusion Hotstart II (2 U/µL)	: 0,5 µL	98 °C : 10 s	← 25x
ddH ₂ O-Kultur	: 5,0 µL	72 °C : 15s	
ddH ₂ O	: ad. 50,0 µL	72C : 300 s	
		4 °C : Pause	

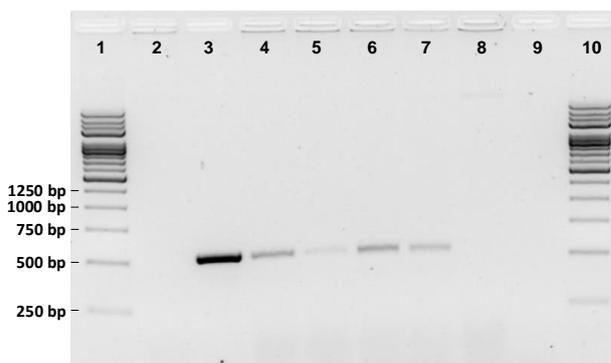
Abb. 13: PCR-Konditionen für die Sequenzierung des *rpsL*-Gens von *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21(DE3)*str*^R

Der Nachweis der Basenpaarlänge der PCR-Amplifikate erfolgte über eine Agarosegelelektrophorese (3.3.1). Die Größe des zu erwartenden PCR-Produktes beträgt: 521 bp. Dies konnte durch Gelelektrophorese bestätigt werden (Abb. 14 u. 15).



Nr.	Probe	V _{Probe}
1:	250 bp Marker (Carl Roth)	5 µL
2:	cPCR-Produkt BL21(DE3)	5 µL
3:	cPCR-Produkt BL21(DE3)	5 µL
4:	cPCR-Produkt BL21(DE3)	5 µL
5:	250 bp Marker (Carl Roth)	5 µL
6:	cPCR-Produkt DH10B	5 µL
7:	cPCR-Produkt DH10B	5 µL
8:	cPCR-Produkt DH10B	5 µL
9:	250 bp Marker (Carl Roth)	5 µL
10:	∅-H ₂ O-Kontrolle	5 µL

Abb. 14: Analyse der *rpsL*-PCR-Amplifikate von *E. coli* BL21(DE3) mittels Gelelektrophorese; 1,5 %iges Agarose-gel angesetzt mit 50 mL TAE-Puffer; DNA-Strain: SYBR-Safe; Laufbedingungen: 100 V Laufspannung, Laufzeit: 45 Minuten; Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt; Die Proben 6 – 9 sind für diese Arbeit nicht relevant.



Nr	Probe	V _{Probe}
1:	250 bp Marker (Carl Roth)	5 µL
2:	cPCR-Produkt BL21(DE3) <i>str</i> ^R	5 µL
3:	cPCR-Produkt BL21(DE3) <i>str</i> ^R	5 µL
4:	cPCR-Produkt BL21(DE3) <i>str</i> ^R	5 µL
5:	cPCR-Produkt BL21(DE3) <i>str</i> ^R	5 µL
6:	cPCR-Produkt BL21(DE3) <i>str</i> ^R	5 µL
7:	cPCR-Produkt BL21(DE3) <i>str</i> ^R	5 µL
8:	cPCR-Produkt BL21(DE3) <i>str</i> ^R	5 µL
9:	∅-H ₂ O-Kontrolle	5 µL
10:	250 bp Marker (Carl Roth)	5 µL

Abb. 15: Analyse der *rpsL*-PCR-Amplifikate von *E. coli* BL21(DE3)*str*^R mittels Gelelektrophorese 1,5 %iges Agarosegel angesetzt mit 50 mL TAE-Puffer; DNA-Strain: SYBR-Safe; Laufbedingungen: 120 V Laufspannung, Laufzeit: 30 Minuten; Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt.



4.2.5 Wachstumsverhalten von *E. coli* BL21(DE3)str^R

Um zu überprüfen, ob das Einfügen der Punktmutationen in das *rpsL*-Gen einen signifikanten Einfluss auf das Wachstum der Zellen ausübt, wurde die Wachstumskurve von *E. coli* BL21(DE3)str^R aufgenommen. Das Wachstum wurde vergleichend mit dem parentalem Stamm aufgezeichnet. Dafür wurde aus *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21(DE3)str^R eine 25 mL Vorkultur in LB-Medium angesetzt. Nach einer Inkubation bei 37 °C bei 200 rpm über Nacht, wurde jeweils eine 50 mL in LB-Kultivierungskultur in einem 500 mL Schikanenkolben auf eine OD₆₀₀ von 0,05 mit den zu analysierenden Stämmen inokuliert. Die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm erfolgte alle 20 Minuten über einen Zeitraum von fünf Stunden. Die Wachstumskurven sind in Abb. 17 dargestellt. Es konnten keine gravierenden Unterschiede hinsichtlich der Verdopplungszeit ($\Delta\mu$: 0,01 h⁻¹) und der daraus berechneten Wachstumsrate (Δt_d : 0,36 min) festgestellt werden.

Phase	Zeit t [min]	OD ₆₀₀		Wachstumsrate μ [h ⁻¹]		Verdopplungszeit t_d [min]	
		BL21 (DE3)	BL21 (DE3)str ^R	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)str ^R	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)str ^R
lag	0	0,052	0,053	-0,06	-0,06	-713,92	-727,78
	20	0,051	0,052	0,73	0,80	57,15	51,68
	40	0,065	0,068	1,35	1,44	30,77	28,82
	60	0,102	0,110	1,39	1,39	29,97	29,86
exponentiell	80	0,162	0,175	1,43	1,43	29,07	29,06
	100	0,261	0,282	1,21	1,19	34,30	35,01
	120	0,391	0,419	1,15	1,10	36,11	37,91
	140	0,574	0,604	1,40	1,39	29,80	29,92
	160	0,914	0,960	0,94	0,86	44,06	48,19
	180	1,252	1,280	1,17	1,23	35,51	33,76
stationär	200	1,850	1,930	0,41	0,25	101,76	164,22
	220	2,120	2,100	0,26	0,22	161,51	188,80
	240	2,310	2,260	0,06	0,10	647,37	398,52
	260	2,360	2,340	0,03	0,01	1642,75	3250,86
	280	2,380	2,350	0,05	0,03	831,76	1635,82
	300	2,420	2,370	-	-	-	-
	Mittel:	-	-	1,26	1,25	33,70	34,06

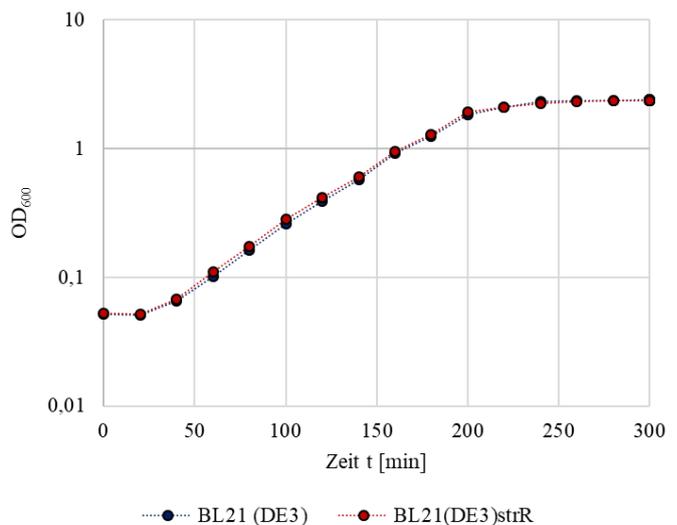


Abb. 17: Wachstumsverhalten von *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21(DE3)str^R. Die Batch-Kultivierung erfolgte in einem 500 mL Schikanenkulturkolben. Dabei wurde jeweils 50 mL eines Antibiotikafreien Komplexmediums (LB, pH: 7,0) initial mit einer OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert. Die Kultivierung erfolgte in einem Schüttelinkubator bei konstant 37 °C und 200 rpm. Die Aufnahme der Messwerte erfolgte in 20 Minuten Intervallen über einen Zeitraum von 5 Stunden.



4.3 Wahl des genomischen Integrationsorts

Ziel dieser Arbeit war es über Gegenselektion eine markerlose Expressionskassette in das Genom von *E. coli* BL21(DE3) zu integrieren. Eine Literaturrecherche zeigte, dass es einige wichtige Merkmale für einen geeigneten Integrationsort im Genom von *E. coli* gibt (N.J. Gay, 1986^[16], J. A. Sawitzke, 2011^[17], G. Striedner, 2009^[18]).

Integrationsort nahe am chromosomalen *origin of replication*

Die Replikation von Prokaryonten beginnt am chromosomalen *origin of replication* (*oriC*). Am *oriC* kommt es zur Ausbildung zweier bidirektionaler Replikationsgabeln. Diese bilden eine Replikationsblase. Dabei bewegt sich die Replikationsgabel von *E. coli* mit einer Geschwindigkeit von 600 - 1000 bp s⁻¹ (Marians, K. J., 1992^[19]) fort. Setzt man dies in Verhältnis zur Länge des *E. coli* BL21(DE3) Genoms, mit einer Länge von ~4,5 Millionen Nukleotiden, benötigt eine Bakterienzelle 37,5 - 62,5 Minuten um ihr Chromosom zu replizieren. Allerdings besitzt *E. coli* BL21(DE3) in LB-Medium eine maximale Verdopplungszeit von 22,5 Minuten (Liang ST, 1999^[20]), weswegen geschlussfolgert wurde, dass in *E. coli* in der exponentiellen Wachstumsphase mehrere Replikationsblasen existieren müssen (Rocha et al., 2004^[21]). Diese Erkenntnis führt zu der These, dass Gene, welche nahe des *oriC* lokalisiert sind, in exponentiell wachsenden Zellen einer Gen-Kopienzahl größer als 1 zu finden sind (J. A. Bryant et al., 2014^[22]).

Codogene Gensequenz auf dem *leading-strand*

DNA-abhängigen-DNA-Polymerasen besitzen genau wie die DNA-abhängigen-RNA-Polymerasen eine 5' nach 3' Syntheserichtung. Dies führt zu Frontalzusammenstößen zwischen den beiden Polymerasen, wenn sich der codierende Strang eines Gens auf dem *lagging strand* befindet (Abb. 18). Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit für einen Transkriptionsabbruch (Rocha et al., 2004^[18]).

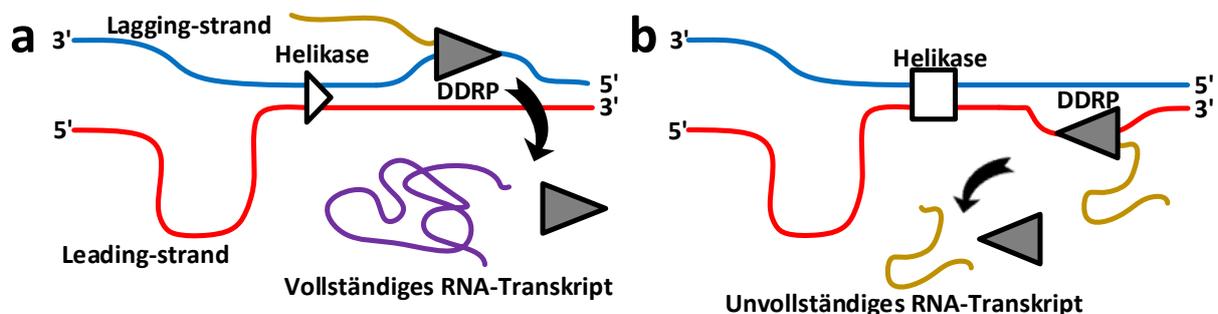


Abb. 18: Darstellung der Unterschiede zwischen *lagging strand* und *leading strand* bezogen auf die Genexpression; a. Stellt die gleichgerichtete Kollision dar, in welcher die Helikase mit einer DNA-abhängigen-RNA-Polymerase (DDRP) kollidiert. Aufgrund der identischen Bewegungsrichtung kommt es lediglich zu einer Verlangsamung der Replikationsgabel und das RNA-Transkript wird i.d.R. vollständig transkribiert. b. Zeigt die Frontalkollision zwischen DDRP und Helikase. Im Gegensatz zur gleichgerichteten Kollision führt diese zum Stillstand der Replikation. Die DDRP löst sich vom Template und hinterlässt ein unvollständiges Transkript.



Zusätzlich wurde das Genom von *E. coli* BL21(DE3) mit einer Sammlung von essenziellen Genen von *E. coli* verglichen (Gerdes et al., 2003^[23]). Dabei wurde speziell der Bereich von 500.000 bp um das *oriC* analysiert, wobei der Großteil der essenziellen Gene auf dem *leading-strand* lokalisiert sind. Dies wurde von weiteren Wissenschaftlern ebenfalls bestätigt (Brewer 1988^[24]; Rocha & Danchin 2003^[25]; Mao et al. 2012^[26]; Merrikh et al. 2012^[27]). Diese Erkenntnisse prädestinieren den *leading-strand* als Träger der codogenen Sequenz des Expressionssystems.

Locus in unmittelbarer Nähe eines essenziellen Gens

Im *E. coli* Genom kann es zu Deletionen kommen. Daher empfiehlt es sich die Expressionskassette in räumliche Nähe zu einem essenziellen Gen zu bringen. Auf diese Weise steigt die Wahrscheinlichkeit, dass ein *Ausloopen* der Kassette mit dem Verlust des essenziellen Gens verbunden ist und die entsprechende Zelle nicht mehr lebensfähig ist. Dies verhindert, dass sich diese Zelle nicht im Fermenter durchsetzen kann.

Unter diesen Gesichtspunkten wurde die intergenomische *glmS/pstS* Region gewählt (Abb. 19), welche sich nahe der attTn7-Site von *E. coli* befindet, die von anderen Wissenschaftlern bereits als Integrationsort genutzt wurde (G. Striedner, 2009^[18]). Das *glmS*-Gen codiert für die Glutamin-Fuctose-6-Phosphat-Aminotransferase, dass unter anderem in der Glykolyse, Gluconeogenese und dem Fructose-Metabolismus involviert ist (Nicholas J. Gay et al., 1986^[16]). Dabei handelt es sich bei *glmS* - laut Gerdes et al., 2003^[27] - um ein essenzielles Gen.

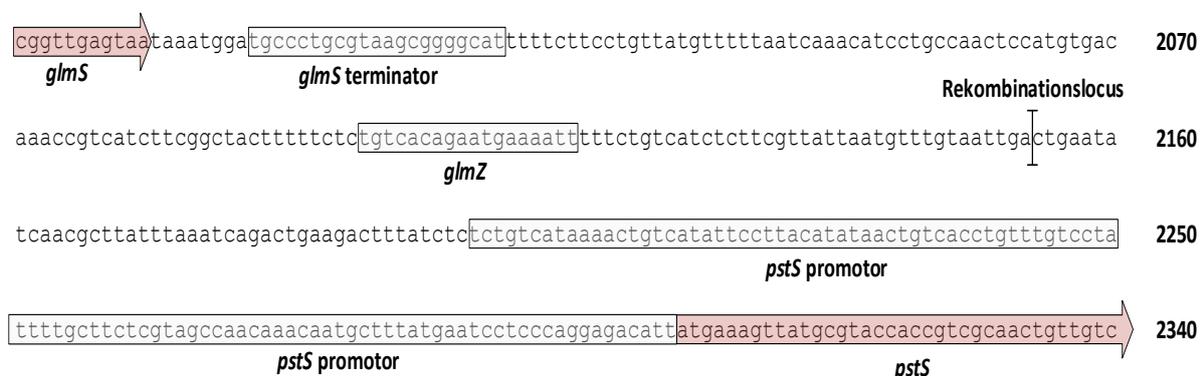


Abb. 19: Darstellung des ausgewählten Integrationsorts von *E. coli* BL21(DE3); Die Abbildung zeigt die Genregion 2070 bp – 2340 bp, bezogen auf den *oriC*, von *E. coli* BL21(DE3). Es ist nur der *leading-strand* in 5´-3´ Orientierung dargestellt. Farblich markiert sind die codierenden Sequenzen für die Gene *glmS* und *pstS*. Farblos markiert sind regulatorische Nukleotidsequenzen. Zwischen der *glmZ*- und der *pstS*-promoter-Sequenz liegt an der Position 2152/2153 bp der für diese Arbeit gewählte Integrationsort, in welcher die verschiedenen Genkassetten integriert werden.



4.4 Einfügen der *rpsL*-Gegenselektionskassette

Zur Erzeugung eines *recombination-shuttle-strain* (*rrs*) wurde am *glmS-pstS*-Locus die Gegenselektionskassette *CS-rpsL_neo* integriert. Die *CS-rpsL_neo*-Kassette besteht aus einem konstitutiven Promoter, welcher nachfolgend das Wildtyp-*rpsL*-Gen und ein Kanamycinresistenzgen exprimieren lässt (Abb. 20). Sie dient dazu, in einer späteren Gegenselektion die positiv mit dem *GOI* rekombinierten, markerlosen *E. coli* BL21(DE3)-Zellen zu identifizieren. Der entstandene Stamm wird im Folgendem als *E. coli* BL21(DE3)str^R_{*CS-rpsL_neo*} benannt.

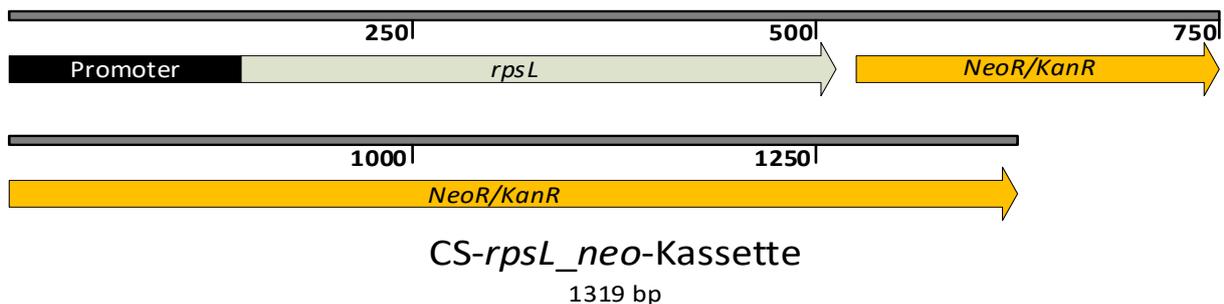


Abb. 20: Schematische Darstellung der Gegenselektionskassette *CS-rpsL_neo*; Gezeigt werden die Gen- und genregulatorischen Sequenzen der *CS-rpsL_neo*-Genkassette. Integriert ins Genomkann über einen konstitutiven Promoter die Streptomycin-sensitive Wildtypvariante des *rpsL*-Gens, als auch eine Kanamycin-Resistenz (NeoR/KanR) transkribiert werden.

4.4.1 Herstellung der *rpsL*-Gegenselektionskassette

Die Gensequenz der *CS-rpsL_neo*-Genkassette befindet sich auf einem BAC (BAC pBe-loBac11). Zur Herstellung der *CS-rpsL_neo*-Kassette wurden die Primer *CS-cas-HA_fwd* und *CS-cas-HA_rev* verwendet. Diese Primer sind ca. 70 bp lange Oligonukleotide, welche mit 20 bp das Ende einer *CS*-Kassetten-Flanke binden und bei der PCR 50 bp Homologiearme anfügen. Diese Homologiearme zielen auf den ausgewählten *glmS-pstS*-Locus (Abb. 19). *Via* dieser Primer wurde die *CS-rpsL_neo*-Kassette über PCR amplifiziert (3.2.2) (Abb. 21).

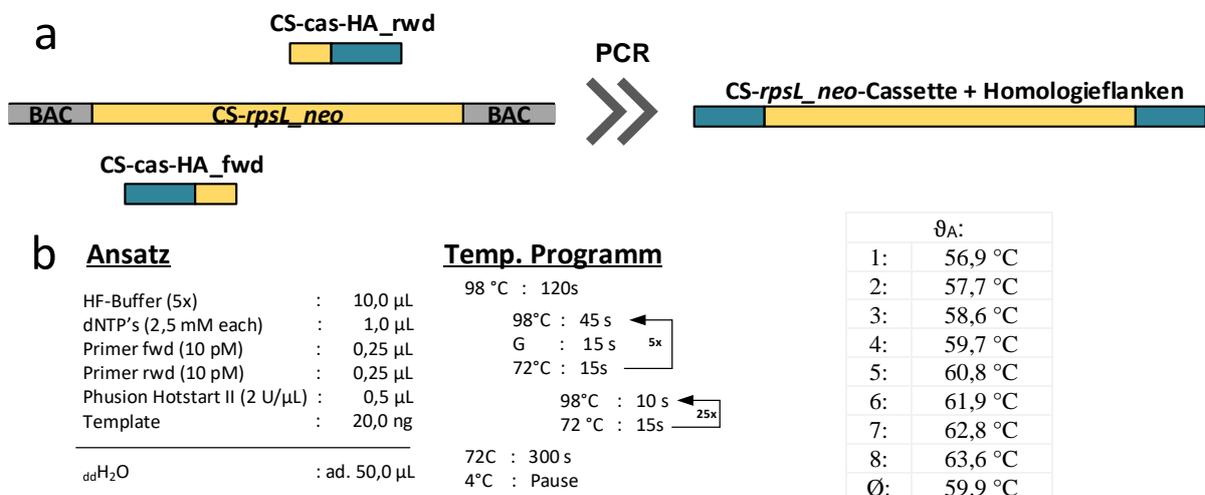


Abb. 21: Herstellung der Gegenselektionskassette *CS-rpsL_neo*; **a.** Anfügen der Homologiearme durch PCR. Dabei werden Primer eingesetzt, welche neben der üblichen, am Template bindende Sequenz, eine weitere Region enthalten, welche das erstellte PCR-Produkt jeweils an beiden Enden, um die zum Rekombinationslocus homologen Sequenzen verlängert. **b.** PCR-Bedingungen unter welchen die Genkassetten erzeugt wurden. G steht für einen Temperaturgradienten, dessen Werte in der Tabelle (rechts) angegeben sind. .



Die PCR-Amplifikate wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (3.3.1). Die erwartete Größe der PCR-Amplifikate liegt bei 1419 bp. Dies konnte in Abb. 22 bestätigt werden.

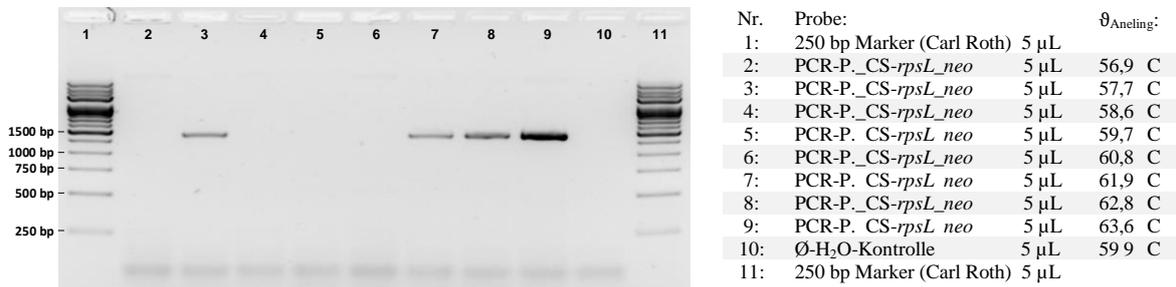


Abb. 22: Agarosegelelektrophorese der PCR-Amplifikate der *CS-rpsL-neo*-Genkassette; 1,5 %iges Agarosegel angesetzt mit 50 mL TAE-Puffer; DNA-Strain: SYBR-Safe; Laufbedingungen: 100 V, Laufspannung, Laufzeit: 45 Minuten; Die Proben wurden mit 6x La-depuffer versetzt.

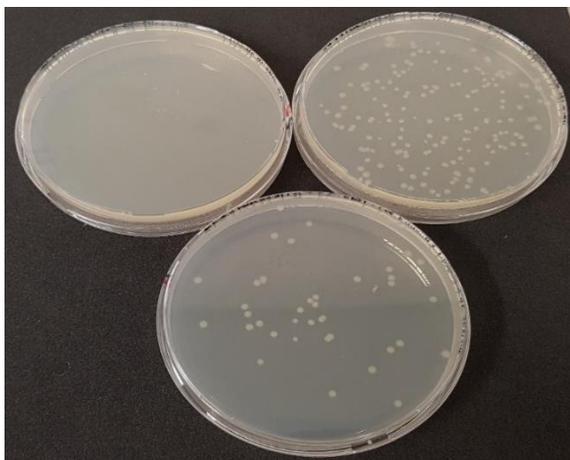
Nach *DpnI*-Verdau und Aufreinigung der PCR-Produkte (Microspin Cycle Pure Kit) erfolgte die spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung (3.2.3) (Tab 7).

Tabelle 7: Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der aufgereinigten PCR-Produkte der Herstellung der *CS-rpsL neo*-Genkassette

Probe	cdNA [ng µL ⁻¹]	A260	A280	260/280	260/230
PCR-P._CS-rpsL_neo Bande 8	24,2	0,484	0,255	1,90	1,30
PCR-P._CS-rpsL_neo Bande 9	44,8	0895	0,463	1,93	1,51

4.4.2 *red*- Rekombination von *E. coli* BL21(DE3)str^R mit *CS-rpsL_neo*

Die Herstellung des *RRS* für den Rekombinationslocus *glmS-pstS* erfolgte durch eine *red*-Rekombination, mit *CS-rpsL_neo* (PCR-P._CS-rpsL_neo | Bande 9) in den mit pRed/ET transformierten *E. coli* BL21(DE3)str^R (3.1.6). Anschließend wurden die rekombinierten Zellen auf LB-kan15-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (Abb. 23) Der entstandene Stamm wird im Folgendem als *E. coli* BL21(DE3)str^R_CS-rpsL_neo bezeichnet.



Agarplatte	CFU
∅-H ₂ O-Kontrolle	0
100 µL BL21(DE3)str ^R	35
900 µL BL21(DE3)str ^R	160

Abb. 23: LB-kan15-Agarplatten mit *E. coli* BL21(DE3)str^R-CS-rpsL_neo; Oben links: ∅-H₂O-Kontrolle; Unten: 100 µL BL21(DE3)str^R_CS-rpsL_neo-Zellen; Oben rechts: 900 µL *E. coli* BL21(DE3)str^R_CS-rpsL_neo-Zellen; Inkubiert bei 30°C über Nacht



4.4.3 Screening von *E. coli* BL21(DE3)str^R_CS-*rpsL*_neo auf Kan^R und Str^S

Aufgrund des Einbringens des Wildtyp-*rpsL*-Gens in *E. coli* BL21(DE3)str^R, werden beide Varianten des *rpsL*-Gen exprimiert. Dies sollte zu einer gewissen Streptomycin-Sensitivität führen, da ~50% der ribosomalen 30S-Untereinheiten wieder von Streptomycin inhibiert werden können. Aufgrund dieser Verhältnisresistenz ist zu erwarten, dass die Zellen nicht bakteriozid gehemmt, sondern im Wachstum verlangsamt werden. Tatsächlich waren kleinere Kolonien auf Streptomycin-haltigem Medium zu erkennen (siehe Abb. 24). Zusätzlich erhalten Rekombinanten durch die Gegenselektionskassette eine Kanamycin-Resistenz, auf welche ebenfalls selektioniert wurde. Durch eine Selektion auf Ampicillin wurde sichergestellt, dass die Zellen keine pRed/ET mehr enthalten (Anmerkung: kein Wachstum auf Ampicillin-haltigen Medien, Bild nicht vorhanden). Es wurden insgesamt 16 Kolonien überprüft.

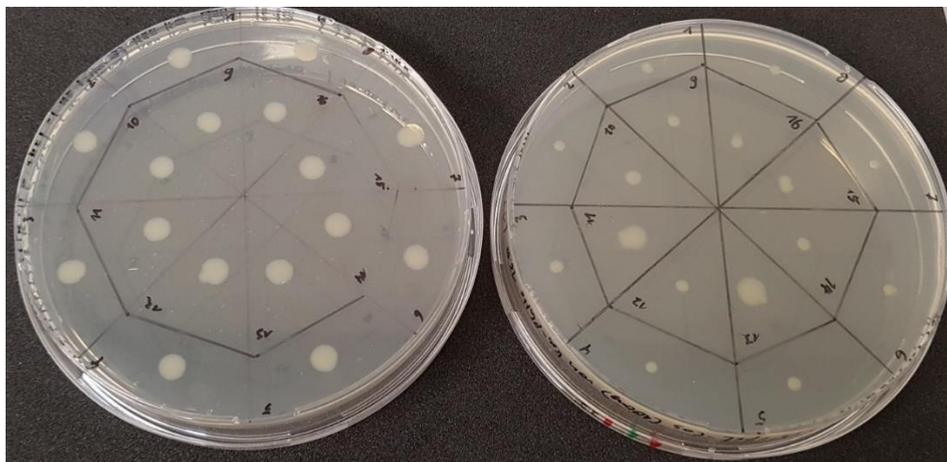


Abb. 24: Selektion von *E. coli* BL21(DE3)str^R_CS-*rpsL*_neo auf Kanamycin-Resistenz und Analyse der Streptomycin-Sensitivität; Links: LB+kan15_BL21(DE3)str^R_CS-*rpsL*_neo (16 von 16 Kolonien positiv auf Kanamycin-Resistenz); Rechts: LB+str25_BL21(DE3)str^R_CS-*rpsL*_neo (14 von 16 Kolonien zeigen ein vermindertes Wachstum in Gegenwart von Streptomycin); Inkubiert: ~ 17 Stunden, 37 °C

4.4.4 Sequenzanalyse der integrierten Gegenselektionskassette

Für den Nachweis der erfolgreichen Rekombination wurde der *glmS-pstS*-Locus von *E. coli* BL21(DE3) WT und *E. coli*, BL21(DE3)str^R_CS-*rpsL*_neo via PCR amplifiziert (3.3.2) und sequenziert. Es wurden drei Klone analysiert (Abb. 24 Klon 1-3). Dazu wurden die Primer *glmS-pstS*_fwd / *glmS-pstS*_rev verwendet (Abb. 25).

Ansatz

HF-Buffer (5x)	: 10,0 µL
dNTP's (2,5 mM each)	: 1,0 µL
<i>glmS-pstS</i> -fwd (10 pM)	: 0,25 µL
<i>glmS-pstS</i> -rwd (10 pM)	: 0,25 µL
Phusion Hotstart II (2 U/µL)	: 0,5 µL
_{ad} H ₂ O-Kultur	: 5,0 µL
_{ad} H ₂ O	: ad. 50,0 µL

Temp. Programm

98 °C	: 30s
98 °C	: 10 s
56 °C	: 15 s
72 °C	: 40 s
72 °C	: 300 s
4 °C	: Pause

Abb. 25: PCR-Konditionen für die Amplifikation des *glmS-pstS*-Locus der BL21(DE3)-Derivate für die Sequenzierung



Die Primer sind so designt, dass sie jeweils vor den Zielsequenzen der Homologiearme auf dem Genom von *E. coli* binden. Damit kann die Position am *glmS-pstS*-Locus und die nahtlose Integration der Gegenselektionskassette überprüft werden (Abb. 26).

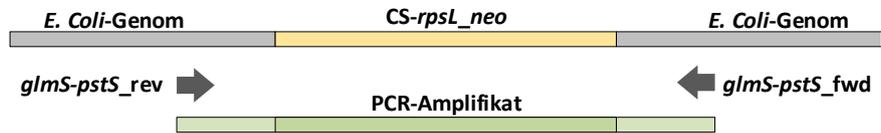


Abb. 26: Binderegionen der Primer *glmS-pstS_rev/fwd* bei der PCR der Gegenselektionskassette

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (3.3.1). Die Größe der zu erwartenden PCR-Amplifikate beträgt 1632 bp. Dies konnte bei Klon 7 experimentell bestätigt werden (Abb. 27).

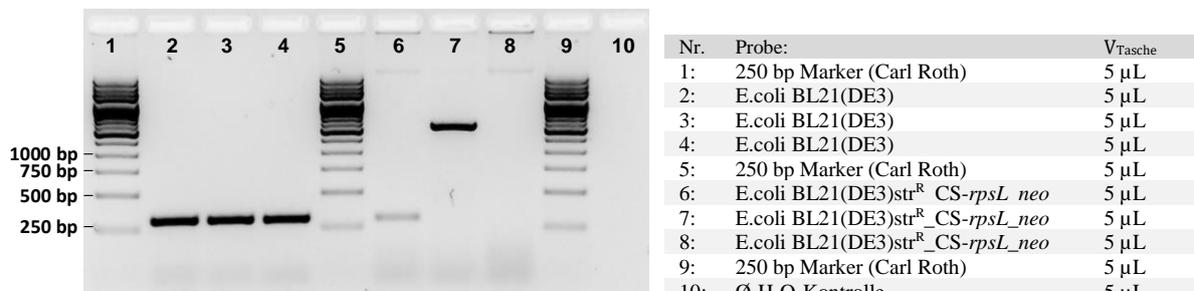


Abb. 27: Analyse der *glmS*→*pstS*-PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese; 1,5 %iges Agarosegel angesetzt mit 50 µL TAE-Puffer; DNA-Strain: Sybr® Safe; Laufbedingungen: 100 V Laufspannung, Laufzeit: 45 Minuten; Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt;

Nach Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte die spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung (3.2.3) (Tab: 8).

Tabelle 8: Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der aufgereinigten PCR-Amplifikate des *glmS*→*pstS*-Locus von *E. coli* BL21(DE3)*str^R_CS-rpsL_neo* und *E. coli* BL21(DE3)

Probe	cdNA [ng µL ⁻¹]	A260	A280	260/280	260/230
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Bande 2	71,9	1,438	0,764	1,88	1,58
<i>E. coli</i> BL21(DE3) <i>str^R_CS-rpsL_neo</i> Bande 7	93,5	1,870	1,041	1,80	1,24

Die erzeugten *glmS*→*pstS*-PCR-Amplifikate wurden sequenziert. Diese Sequenzen wurden hinsichtlich ihrer Qualität und Richtigkeit über die Software SnapGene überprüft. Der Vergleich erfolgte gegen den parentalen BL21(DE3)-Stamm und eines *in silico* rekombinierten BL21(DE3)*str^R_CS-rpsL_neo*. Das *Alignment* der Sequenzen erfolgte über die Website mafft.cbrc.jp mittels MAFFT-Algorithmus und zeigte keine Unterschiede zwischen dem *in silico* rekombinierten Template und der Sequenz des erzeugten *E. coli* BL21(DE3)*str^R_CS-rpsL_neo*. Der Sequenzierungsreport und das *Alignment* sind dem Anhang beigelegt.



4.5 Rekombination von *eGFP-Cas* in den *glmS-pstS*-Locus

Zur Erprobung der Gegenselektion wurde eine *eGFP*-Genkassette (Abb. 28) in den *glmS-pstS*-Locus rekombiniert. Das *eGFP* ist ein Derivat des GFPs. Das *eGFP* besitzt zwei Aminosäurenänderungen (Position 64: Phe → Leu, Position 65: Ser → Thr), die zu einer erhöhten Intensität der Fluoreszenz führt. Das *eGFP*-Gen (codonoptimiert für *Pichia pastoris*) wird in einem T7-Expressionsystem - T7-Promotor, IPTG-induzierbares *lac*-Operon und T7-Terminator - in die Zelle rekombiniert. Der in der Sequenz vorhandene His₆-Tag ist nicht verfügbar, da dieser durch ein Stopp-Codon-Duo vom *eGFP* getrennt ist.

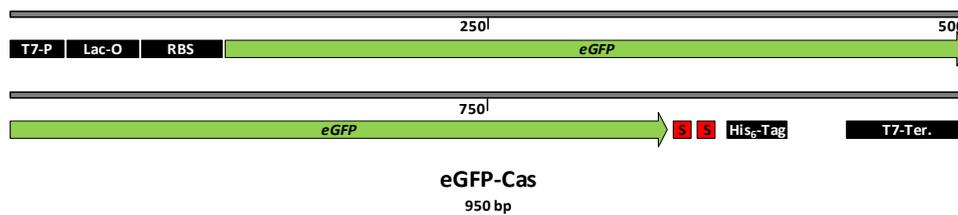


Abb. 28: Darstellung der Expressionskassette *eGFP-Cas*; Gezeigt werden die Gen- und genregulatorischen Sequenzen der *eGFP*-Genkassette. Integriert ins Genom kann über einen mit IPTG-induzierbaren Promoter *eGFP* transkribiert werden. Das His₆-Tag wurde durch ein doppeltes Stopp-codon (rotes S) vom *eGFP* getrennt.

4.5.1 Herstellung der *eGFP*-Genkassette

Die Gensequenz der *eGFP*-Expressionskassette stammt aus pET30a_*eGFP*_GG und wurde mittels PCR amplifiziert (3.2.2). Dazu wurden die Primer, HA_*eGFP*_fwd und HA_*eGFP*_rev verwendet, die dem Amplifikat definierte Homologiearme anfügten (Abb. 29).

Ansatz

HF-Buffer (5x)	:	10,0 µL
dNTP's (2,5 mM each)	:	1,0 µL
HA_ <i>eGFP</i> _fwd (10 pM)	:	0,25 µL
HA_ <i>eGFP</i> _rev (10 pM)	:	0,25 µL
Phusion Hotstart II (2 U/µL)	:	0,5 µL
BL21(DE3)str ^R	:	0,5 µL

ddH₂O : ad. 50,0 µL

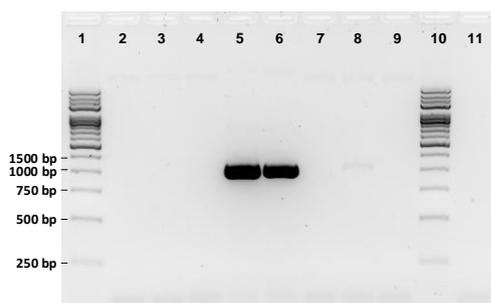
Temp. Programm

98 °C : 120s	
98°C : 45 s	← 5x
G : 15 s	
72°C : 15s	
98°C : 10 s	← 25x
72 °C : 15s	
72C : 300 s	
4°C : Pause	

θA:	
1:	56,9 °C
2:	57,7 °C
3:	58,6 °C
4:	59,7 °C
5:	60,8 °C
6:	61,9 °C
7:	62,8 °C
8:	63,6 °C
Ø:	59.9 °C

Abb. 29: PCR-Bedingungen zur Herstellung von *eGFP*-Expressionskassetten

Die Größe der PCR-Amplifikate wurde durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft (3.3.1). Nach dem Anfügen der Homologiearme beträgt die Größe des erwarteten PCR-Amplifikats 1050 bp. Dies konnte experimentell bestätigt werden (Abb.30).



Band:	Probe:	θAnneling:
1:	250 bp Marker (Carl Roth)	5 µL
2:	PCR-P_ <i>eGFP</i> -Cas,	5 µL 56,9 C
3:	PCR-P_ <i>eGFP</i> -Cas	5 µL 57,7 C
4:	PCR-P_ <i>eGFP</i> -Cas	5 µL 58,6 C
5:	PCR-P_ <i>eGFP</i> -Cas,	5 µL 59,7 C
6:	PCR-P_ <i>eGFP</i> -Cas,	5 µL 60,8 C
7:	PCR-P_ <i>eGFP</i> -Cas,	5 µL 61,9 C
8:	PCR-P_ <i>eGFP</i> -Cas,	5 µL 62,8 C
9:	PCR-P_ <i>eGFP</i> -Cas,	5 µL 63,6 C
10:	Ø-H ₂ O-Kontrolle	5 µL 59.9 C
11:	250 bp Marker (Carl Roth)	5 µL

Abb. 30: Analyse der *eGFP*-PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese; 1,5 %iges Agarosegel angesetzt mit 50 µL TAE-Puffer; DNA-Strain: Sybr-Safe; Laufbedingungen: 100 V Laufspannung, Laufzeit: 45 Minuten; Die Proben wurden mit 6x Ladebuffer versetzt



Es folgte ein *DpnI*-Verdau, welcher das PCR-Template inaktivierte. Nach einer Aufreinigung der PCR-Produkte in welcher die Proben der Banden 5 + 6 gepoolt wurden, folgte die spektral-photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung (3.2.3) (Tab. 9).

Tabelle 9: Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der aufgereinigten PCR-Produkte zur Herstellung der *eGFP*-Genkassette

Probe	cdNA [ng μL^{-1}]	A260	A280	260/280	260/230
PCR-Produkt_ <i>eGFP</i> -Cas	70,6	1,413	0,751	1,88	1,71

4.5.2 *red*-Rekombination des *RSS* mit *eGFP*-Expressionskassette

Die Genkassette *eGFP*-Cas wurde mittels *red*-Rekombination am *glmS* \rightarrow *pstS*-Locus ins Genom des *RSS* integriert (3.1.6). Die eingesetzte Menge an Template betrug 100 ng. Dabei ersetzte die *eGFP*-Expressionskassette die *rpsL*-Gegenselektionskassette an diesem Locus. Aufgrund dessen erfolgte eine Streptomycin-Selektion. Hierbei wurden in Gegenwart von Streptomycin große und kleine Kolonien erhalten (Abb. 31, Pfeile). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass es aufgrund der Verhältnisresistenz gegen Streptomycin - wegen des Streptomycin-sensitiven Wildtyp-*rpsL*-Gens und des Streptomycin-resistent-modifizierten *rpsL*-Gens - kein binäres Selektionsergebnis (Resistenz = vital, Sensitivität = letal) zu beobachten ist, sondern im Fall der Sensitivität stark im Wachstum eingeschränkte Zellen.

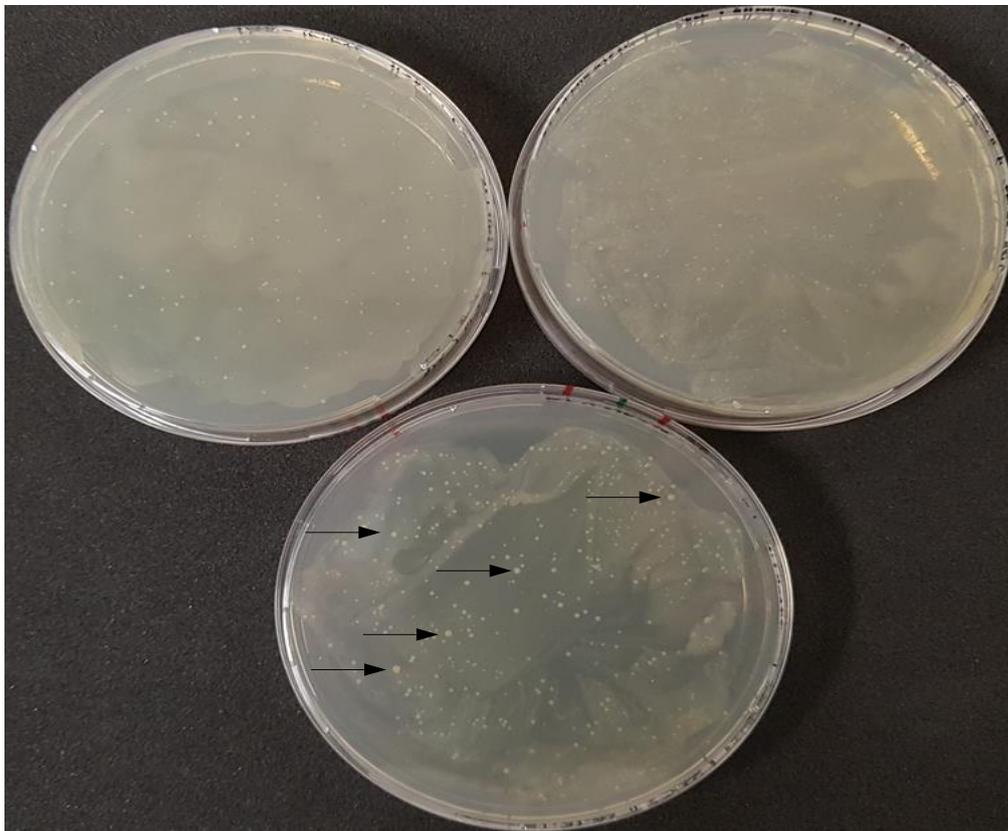


Abb. 31: LB-str25-Agarplatten von *E. coli* BL21(DE3)*str*^R*eGFP*; Oben links: \emptyset -H₂O-Kontrolle Unten: 100 μL *E. coli* BL21(DE3)*str*^R*eGFP*-Zellen. Oben rechts: 900 μL BL21(DE3)*str*^R*eGFP*-Zellen, Inkubiert bei 30°C über Nacht (~17h). Mit Pfeilen markiert sind die Klone, welche als positiv rekombiniert eingestuft und weiter analysiert wurden.



4.5.3 Physiologische Charakterisierung von *E. coli* BL21(DE3)str^R_eGFP

Da die primäre Streptomycin-Selektion keine eindeutigen Ergebnisse lieferte, wurden fünf Reinigungsplatten aus den mit Pfeilen markierten Kolonien (Abb. 31) angefertigt. Anschließend erfolgte eine *Patch*-Reihe, indem die positiv Rekombinanten isoliert wurden (3.1.3). Der Patch erfolgte auf folgenden Medien: LB+str25, LB+str50, LB+amp50, LB+kan15, LB+str25+IPTG48 (Abb.32). Es wurden jeweils fünf der Kolonien der fünf Reinigungsplatten überprüft. Zum Nachweis des eGFPs, wurde LB +str25+IPTG48 mit UV-Licht bestrahlt und zeigte in Reihe III und V ein deutliches Fluoreszenzsignal.

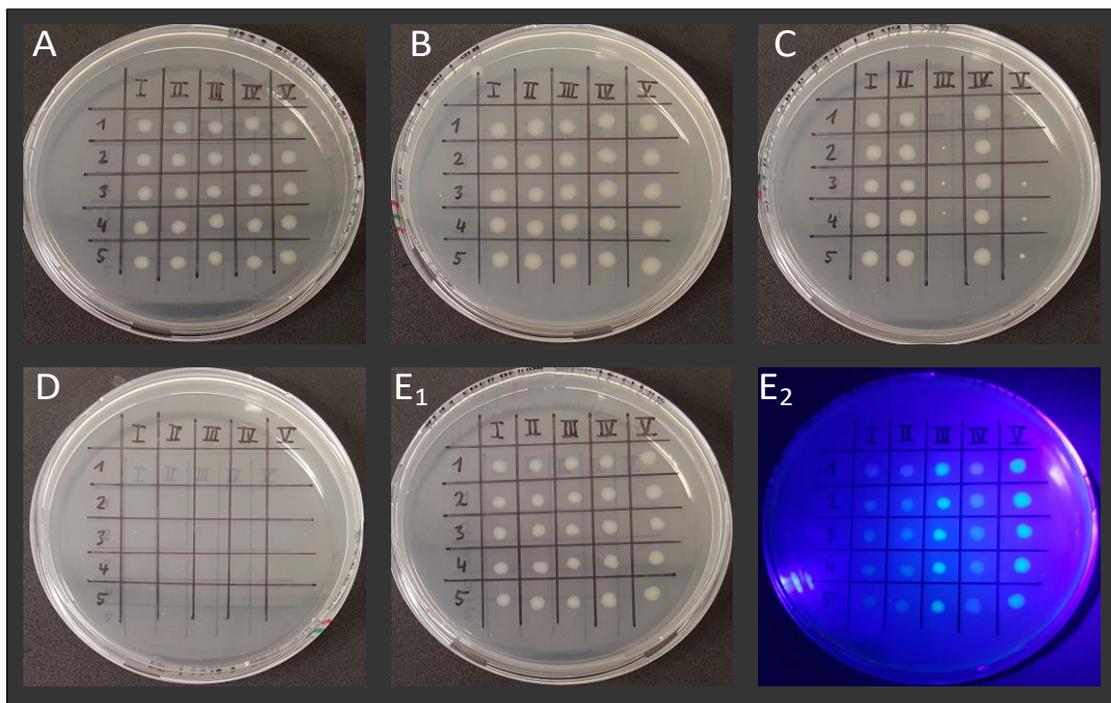


Abb. 32: Physiologische Charakterisierung von *E. coli* BL21(DE3)str^R_eGFP; Die Abbildung zeigt je fünf Kolonien (1-5) von fünf Reinigungsplatten (I – V). A: LB+str25; B: LB+str50; C: LB+kan15; D: LB+amp50; E₁: LB+str25+IPTG48; E₂:LB+str25+IPTG48 unter UV-Anregung

4.5.4 Sequenzanalyse der integrierten Expressionskassette

Für den Nachweis der erfolgreichen Rekombination wurde der *glmS-pstS*-Locus von *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli*, BL21(DE3)str^R_CS-*rpsL_neo* mittels PCR amplifiziert (3.2.2) und sequenziert. Es wurde Klon 1|III in einem Dreifachansatz analysiert (Abb. 32). Dazu wurden die Primer *glmS-pstS_fwd* / *glmS-pstS_rev* verwendet (Abb. 33)

Ansatz

HF-Buffer (5x)	:	10,0 µL
dNTP's (2,5 mM each)	:	1,0 µL
<i>glmS-pstS</i> -fwd (10 pM)	:	0,25 µL
<i>glmS-pstS</i> -rwd (10 pM)	:	0,25 µL
Phusion Hotstart II (2 U/µL)	:	0,5 µL
Template	:	0,5 µL

ddH₂O : ad. 50,0 µL

Temp. Programm

98 °C : 30s

98 °C : 10 s ← 30x

56 °C : 15 s

72 °C : 40 s

72 °C : 300 s

4 °C : Pause

Abb. 33: PCR-Konditionen der Amplifikation des *glmS-pstS*-Locus der BL21(DE3)-Derivate für die Sequenzierung



Die Primer sind so designt, dass sie jeweils vor den Zielsequenzen der Homologiearme auf dem Genom von *E. coli* binden. Damit kann die Position am *glmS-pstS*-Locus und die nahtlose Integration der Gegenselektionskassette überprüft werden (Abb. 34).

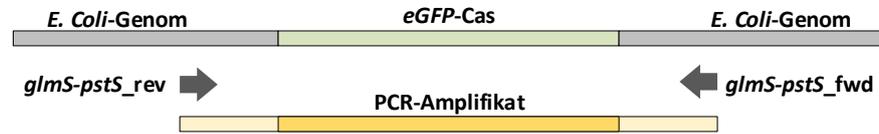


Abb. 34: Binderegionen der Primer *glmS_pstS_rev/fwd* bei der PCR der Expressionskassette

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (3.3.1). Die Größe des zu erwartenden PCR-Amplifikats beträgt: 1262 bp. Alle drei Reaktionsansätze von Klon 1|III zeigen eine Bande in der erwartenden Höhe (Abb. 35).

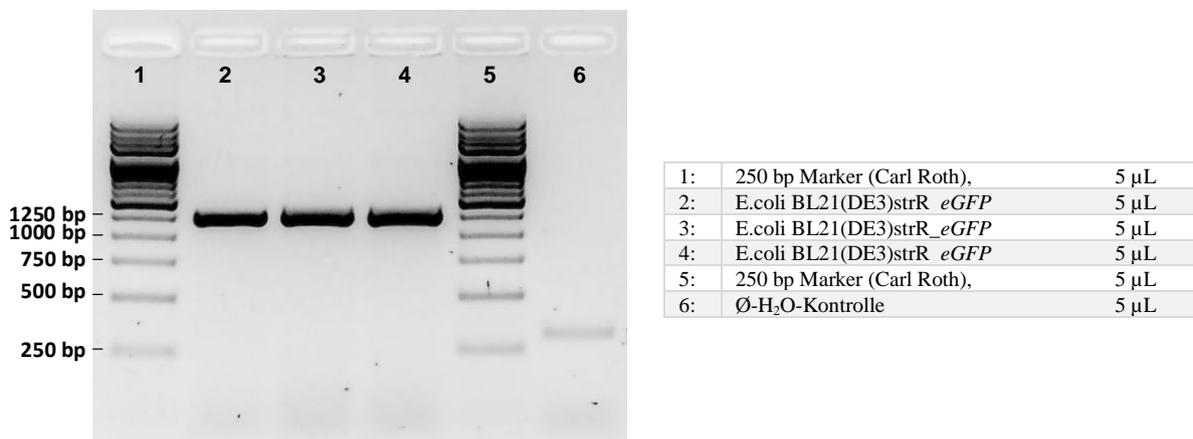


Abb. 35: Auftragung der *glmS*→*pstS*-PCR-Amplifikate aus einer cPCR von *E. coli* BL21(DE3)str^R *eGFP* auf einem Agarosegel; 1,5 %iges Agarosegel angesetzt mit 50 mL TAE-Puffer; DNA-Strain: SYBR@Safe; Laufbedingungen: 100 V Laufspannung, Laufzeit: 45 Minuten; Die Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt;

Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurden die Banden 1 - 3 gepoolt und es erfolgte die spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung (3.2.3) (Tab. 10).

Tabelle 10: Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der aufgereinigten PCR-Amplifikate des *glmS* → *pstS*-Locus von *E. coli* BL21(DE3)str^R *eGFP* zur Sequenzierung

Probe	cdNA [ng µL ⁻¹]	A260	A280	260/280	260/230
BL21(DE3)_ <i>eGFP</i> Bande 1-3	98,7	1,974	1,048	1,85	1,80

Die *glmS*→*pstS*-PCR-Amplifikate wurden sequenziert. Diese Sequenzen wurden hinsichtlich ihrer Qualität und Richtigkeit über die Software SnapGene überprüft. Der Vergleich erfolgte gegen den parentalen BL21(DE3)-Stamm und eines *in silico* rekombinierten BL21(DE3)str^R *eGFP*. Das *Alignment* der Sequenzen erfolgte über die Website mafft.cbrc.jp mittels MAFFT-Algorithmus und zeigte keine Unterschiede zwischen dem *in silico* rekombinierten Template und der Sequenz des erzeugten *E. coli* BL21(DE3)str^R *eGFP*. Der Sequenzierungsreport und das *Alignment* sind dem Anhang beigelegt.



4.5.5 Wachstumsverhalten von BL21(DE3)str^R_eGFP

Das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3)str^R_eGFP wurde, vergleichend mit dem parentalem Stamm, in einer Batch-Kultur, aufgezeichnet. Dafür wurde aus den zu prüfenden Stämmen eine 25 mL Vorkultur in LB-Medium angesetzt. Nach einer Inkubation bei 37 °C bei 200 rpm über Nacht, wurde eine 50 mL Kultivierungskultur in einem 500 mL Schikanenkolben auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert. Die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm erfolgte alle 20 Minuten über einen Zeitraum von 5 Stunden (Abb. 36). Es konnten keine gravierenden Unterschiede hinsichtlich der Verdopplungszeit ($\Delta\mu$: 0,02 h⁻¹) und der daraus berechneten Wachstumsrate (Δt_d : 0,66 min) festgestellt werden.

Phase	Zeit t [min]	OD ₆₀₀		Wachstumsrate μ [h ⁻¹]		Verdopplungszeit t_d [min]	
		BL21 (DE3)	BL21 (DE3)eGFP	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)eGFP	BL21 (DE3)	BL21 (DE3)eGFP
lag	0	0,055	0,054	0,05	0,06	769,37	755,51
	20	0,056	0,055	0,80	0,68	52,29	61,13
exponentiell	40	0,073	0,069	1,31	1,32	31,73	31,60
	60	0,113	0,107	1,31	1,37	31,69	30,33
	80	0,175	0,169	1,20	1,22	34,68	34,02
	100	0,261	0,254	1,38	1,26	30,21	32,92
	120	0,413	0,387	0,95	1,09	43,74	38,07
	140	0,567	0,557	1,03	1,06	40,27	39,10
	160	0,800	0,794	1,31	1,25	31,63	33,30
	180	1,240	1,204	0,79	0,82	52,84	51,01
	200	1,612	1,580	0,68	0,71	61,44	58,81
	220	2,020	2,000	0,35	0,27	118,81	152,75
stationär	240	2,270	2,190	0,10	0,09	400,25	440,61
	260	2,350	2,260	0,01	0,01	3264,72	3139,95
	280	2,360	2,270	-0,01	0,01	-3264,72	3153,81
	300	2,350	2,280	-	-	-	-
	Mittel:	-	-	1,21	1,23	34,85	34,19

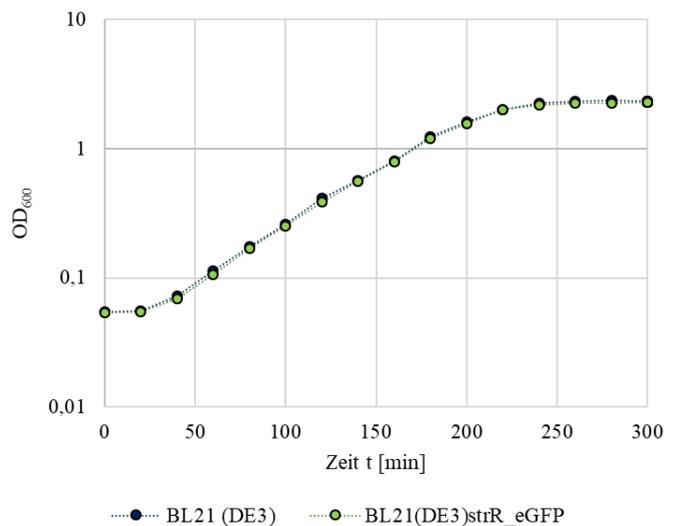


Abb. 36: Wachstumsverhalten von *E. coli* BL21(DE3)_eGFP und *E. coli* BL21(DE3). Die Batch-Kultivierung erfolgte in einem 500 mL Schikanenkulturkolben. Dabei wurde jeweils 50 mL eines antibiotikafreien Komplexmediums (LB, pH: 7,0) initial mit einer OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert. Die Kultivierung erfolgte in einem Schüttelinkubator bei konstant 37 °C und 200 rpm. Die Aufnahme der Messwerte erfolgte in 20 Minuten Intervallen über einen Zeitraum von 5 Stunden.

Nach der Aufnahme des Wachstumsverhalten, wurde die Kultur von *E. coli* BL21(DE3)str^R_eGFP mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert und über Nacht inkubiert. Die Bakteriensuspension, wurde in eine physiologische NaCl-Lösung überführt, auf eine OD₆₀₀ von ~22,5 aufkonzentriert und das eGFP mit UV-Licht angeregt. Vergleichend wurde der parentale *E. coli* BL21(DE3) Stamm auf eine OD₆₀₀ ~23 aufkonzentriert. Die Abbildung 37 zeigt die *E. coli* BL21(DE3)-Derivate im direktem Vergleich unter UV-Licht-Anregung.

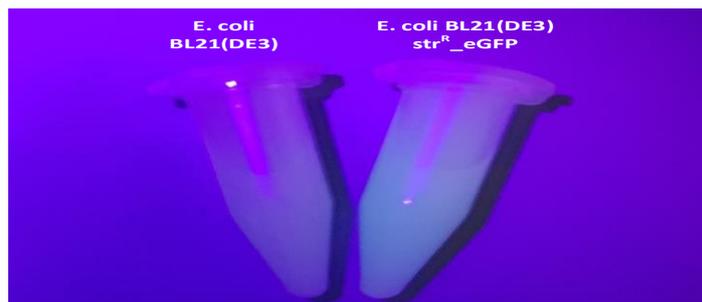


Abb. 37: Abbildung der über Nacht induzierten *E. coli* BL21(DE3) (OD₆₀₀: ~23) und BL21(DE3)str^R_eGFP (OD₆₀₀: ~22,5) Batchkulturen, 7-Fach aufkonzentriert in physiologischer NaCl-Lösung. Unter UV-Anregung.



4.5.6 Genom und Plasmid-basierte Expression von eGFP

Zum Vergleich wurde bei der Untersuchung des Expressionsverhaltens von *E. coli* BL21(DE3) str^R_eGFP, dieselbe Expressionskassette als Plasmid-basiertes System *E. coli* BL21(DE3) + pET30a_eGFP_GG - mitgeführt. Beginnend wurde je eine 25 mL Vorkultur in einem LB-Medium angesetzt und über Nacht bei 37 °C bei 200 rpm in einem Schüttelinkubator kultiviert. Die Expressionskulturen wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,1 in LB-Medium inokuliert. Die Messung der optischen Dichte bei 600 nm erfolgte alle 30 Minuten. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 – 0,6 wurde die Expression mit IPTG (1 mM) induziert. Die Probennahme erfolgte alle 60 Minuten, wobei die erste Probe zum Zeitpunkt t₀, unmittelbar vor der Induktion entnommen wurde. In Abb. 38 sind die Wachstumskurven dargestellt.

Zeit t [min]	OD ₆₀₀	
	BL21(DE3) str ^R _eGFP	BL21(DE3) + pET30a
0	0,107	0,111
30	0,135	0,149
60	0,259	0,294
90	0,451	0,517
120	0,671	0,751
150	0,995	0,926
180	1,708	1,160
210	2,130	1,196
240	2,380	1,224
270	2,540	1,220
300	2,620	1,240

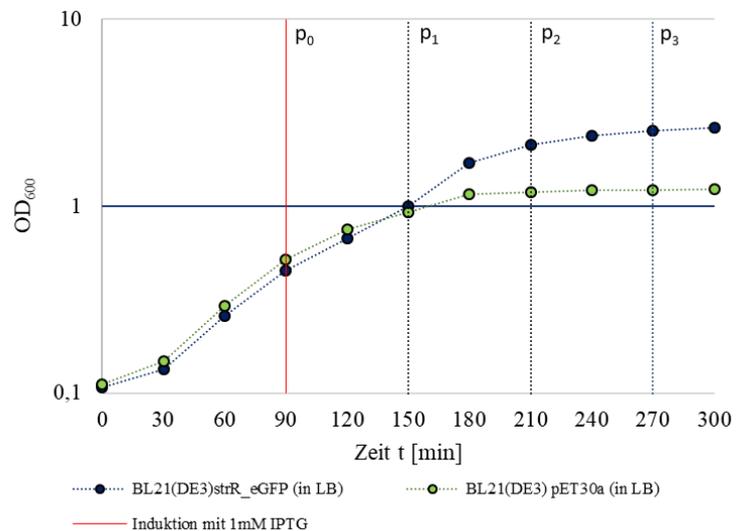


Abb. 38: Gegenüberstellung der Genom und Plasmid-basierten Expression von eGFP; Die Batch-Kultivierung erfolgte in einem 500 mL Schikankulturkolben. Dabei wurde jeweils 50 mL eines Komplexmediums (LB, pH: 7,0) initial mit einer OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Die Kultivierung erfolgte in einem Schüttelinkubator bei konstant 37 °C und 200 rpm. Die Aufnahme der Messwerte erfolgte in 30 Minuten Intervallen über einen Zeitraum von 5 Stunden. Die Probenahme erfolgte stündlich nach Induktion.

Die Proben wurden auf eine virtuelle OD₆₀₀ von 10,0 eingestellt, indem die Probe in einer Laborzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Die Einstellung erfolgte, indem das Bakterienpellet in einem zum aufgezeichneten OD₆₀₀-Wert korrelierenden Volumen in ddH₂O aufgenommen wurde (siehe Formel 1).

$$V_{\text{resuspendieren}} = \frac{V_{\text{Probe}}}{OD_{600,\text{mess}}} \cdot OD_{600,\text{virtuell}} \quad [1]$$



Zum ersten visuellen Nachweis der Expression von eGFP in den Expressionskulturen wurden Proben entnommen, in 0,9% iger Saline überführt und um den Faktor 2 und 10 aufkonzentriert. Das eGFP in den Proben wurde anschließend mit UV-Licht angeregt (siehe Abb. 39).

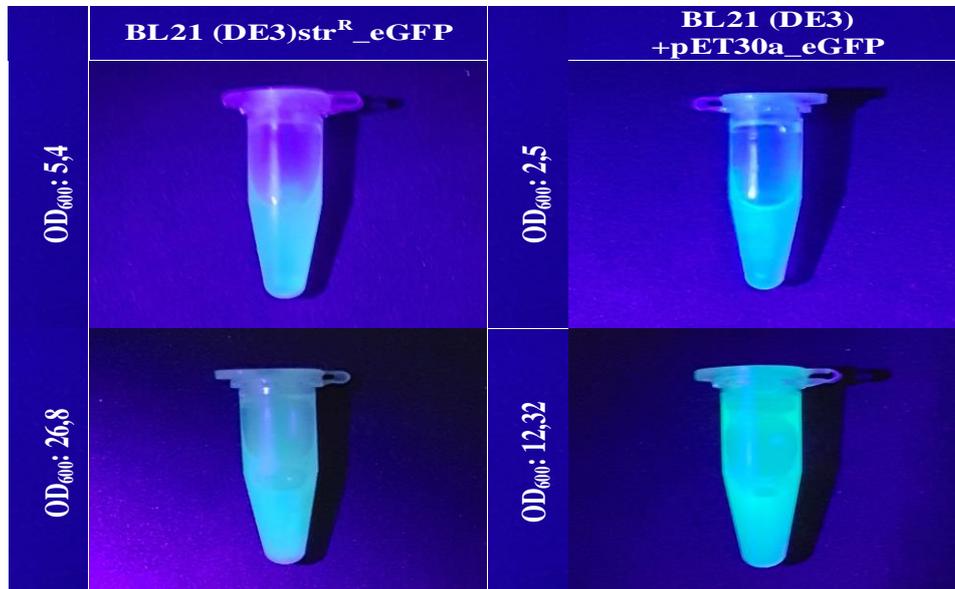


Abb. 39: Abbildung verschiedener Titer der Expressionskulturen unter UV-Licht in 0,9% NaCl-Lösung

Der Nachweis von eGFP in *E. coli* BL21(DE3)str^R-eGFP erfolgte über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.3.2). Dabei wurden die Proben p₀ - p₄ auf eine virtuelle OD₆₀₀ von 10 normiert (Abb. 40). Trotz eines deutlichen Fluoreszenzsignals (Abb. 39) konnte in der SDS-PAGE keine eindeutige eGFP-Bande (26,9 kDa) detektiert werden. Dies war ebenso bei eGFP durch Plasmid-basierte Expression der Fall (Bild nicht vorhanden).

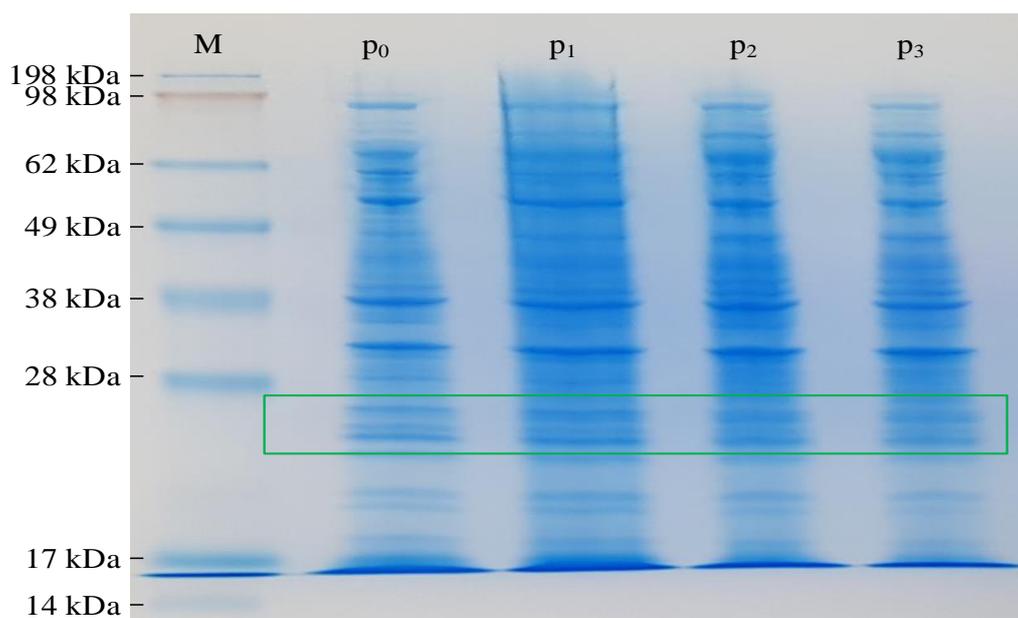


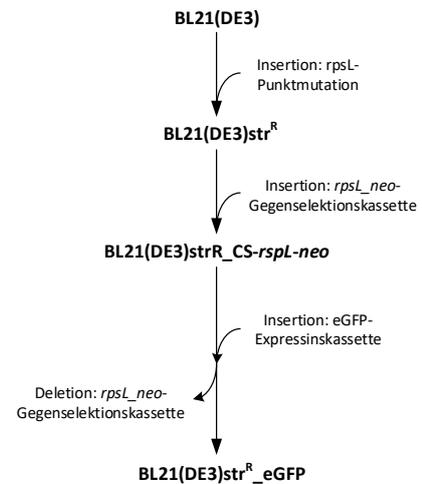
Abb. 40: SDS-PAGE-Analyse von *E. coli* BL21(DE3)str^R-eGFP; Abgebildet sind die Proben p₀-p₃, wobei Probe p₀ vor Induktion entnommen wurde. 12 %iges SDS-PAGE-Gel (Serva); Laufpuffer: Rotiphorese® SDS-PAGE; Laufbedingungen: 150 V Laufspannung, Laufzeit: 90 Minuten; M: Seebblue®Plus2 Pre-Strained Protein Standard, Färbelösung: Roti®Blue. Grün eingrahmt ist der Bereich in der das eGFP (26,9 kDs) zu erwarten ist.



5 Diskussion

Ziel dieser Bachelorarbeit war es, den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) genomisch zu modifizieren und eine Gegen Selektion auf Basis des *rpsL*-Gens durchzuführen. Es wurde die *red*-Rekombination eingesetzt, um zunächst ein Streptomycin-resistentes BL21(DE3)-Stamm zu erzeugen, in welchen nacheinander eine Gegenselektionskassette und eine Expressionskassette in den *glmS* → *pstS*-Locus inseriert wurden.

In Abb. 41 sind die Abschnitte der Modifikation an *E. coli* BL21(DE3) dargestellt. Im Ersten Schritt wurde durch Einfügen von Punktmutationen dem parental Stamm eine Streptomycin-Resistenz verliehen (*E. coli* BL21(DE3)^{str^R). Anschließend erfolgte die genomische Integration der *rpsL*-Gegenselektionskassette (*E. coli* BL21(DE3)^{str^R *CS-rpsL_{neo}*). Abschließend wurde die *eGFP*-Expressionskassette am selben Locus inseriert, was zu einer simultanen Deletion der *rpsL*-Gegenselektionskassette führte (*E. coli* BL21(DE3)^{str^R *eGFP*). Die Selektion erfolgte mittels einer *rpsL*-basierten Gegenselektion.}}}



Stamm	str ^R	kan ^R
BL21(DE3)	—	—
BL21(DE3) ^{str^R}	+	—
BL21(DE3) ^{str^R} _CS-rpsL-neo	—	+
BL21(DE3) ^{str^R} _eGFP	+	—

Abb. 41: Ablauf der Genommodifikationen an *E. coli* BL21(DE3). Ablauf der Veränderungen, am parental Stamm, um den Expressionsstamm zu modifizieren. Die Tabelle zeigt die Resistenz gegenüber Streptomycin und Kanamycin der *E. coli* BL21(DE3)-Derivate.

Einfügen der Streptomycin-Resistenz in *E. coli* BL21(DE3)

Um die *rpsL*-Gegenselektion anzuwenden, wurde dem Stamm *E. coli* BL21(DE3), eine Streptomycin-Resistenz mittels *red*-Rekombination verliehen. Das verwendete Str^R-Oligo bewirkt einen Austausch des Nukleotidquartetts “TAAA“ an den Positionen 126-129 des *rpsL*-Gens zu “ACGT“. Dies führt zu einem Aminosäureaustausch an der 43. Position der Aminosäuresequenz von Lysin zu Arginin. Das Einfügen der Streptomycin-Resistenz verlief ohne Probleme. Im Vergleich zur Transformation sind die Kolonien der Rekombination wesentlich kleiner. Ein Grund könnte sein, dass nur neugebildete Ribosomen eine Resistenz gegenüber Streptomycin besitzen und unmittelbar nach der Rekombination eine Mischpopulation beider Ribosomenvarianten in der Zelle enthalten sind, was wachstumsminimierend wirkt. Bei der *red*-Rekombination fällt auf, dass auch ohne Arabinose-Induktion Streptomycin-resistente Klone zu erkennen sind. Dies deutet darauf hin, dass die Repression der *red*-Proteine auf dem pRed/ET Plasmiden, im Komplex-Medium LB, undicht ist. Allerdings zeigt die Arabnose-Induktion einen deutlichen Effekt auf die Rekombinationsfrequenz.



Neben dem Nachweis der Streptomycin-Resistenz zeigt Abb. 12 (4.2.3), dass das pRed/ET-Plasmid nach einer Inkubation von 37 °C über Nacht aufgrund des thermosensitiven *ori* verschwunden ist. Die *red*-Rekombination war bei 30 °C nicht durchführbar, weswegen vor jeder weiteren Rekombination der pRed/ET Plasmid erneut transformiert werden musste. Die Sequenzanalyse in Abschnitt 4.2.4 zeigt, dass exakt die gewünschte Genommodifikation durchgeführt wurde und keine weiteren Veränderungen am *rpsL*-Gen entstanden sind. In einer Wachstumsanalyse (4.2.5) zeigt *E. coli* BL21(DE3)str^R dasselbe Wachstumsverhalten wie der parentale Stamm.

Genomische Integration der *rpsL*-Gegenselektionskassette

Die *rpsL*-Gegenselektionskassette wurde mittels *red*-Rekombination in den *glmS* → *pstS*-Locus integriert. Die Herstellung der *rpsL*_{neo}-Gegenselektionskassette erfolgte über PCR. Dies zeigt, dass die Amplifikation der Genkassette aus dem BAC, sowie das Anfügen der Homologiearme simultan durchzuführen ist. Die *red*-Rekombination von *E. coli* BL21(DE3)str^R+pRed/ET mit der *rpsL*-Gegenselektionskassette war erfolgreich. Die Rekombinanden zeigten die gewünschten physiologischen Eigenschaften (4.4.3, Abb. 24). Die Streptomycin-Sensitivität ist an dem eingeschränkten Wachstum zu erkennen, welches wahrscheinlich durch eine Mischpopulation an Streptomycin-sensitiven und -resistenten Ribosomen verursacht wird. Die Sequenzanalyse (4.4.4) zeigt die exakte und nahtlose Integration der CS-*rpsL*_{neo}-Gegenselektionskassette am *glmS* → *pstS*-Locus.

Genomische Integration der *eGFP*-Expressionskassette

Die *eGFP*-Expressionskassette wurde mittels *red*-Rekombination im gewählten *glmS* → *pstS*-Locus integriert. Aufgrund der identischen Homologiearme zur *rpsL*-Gegenselektionskassette kommt es zu einem Austausch beider Kassetten im *glmS* → *pstS*-Locus. Die Herstellung der *eGFP*-Expressionskassette erfolgte über PCR von pET30a_*eGFP*_GG (4.5.1). Die *red*-Rekombination von *E. coli* BL21(DE3)str^R-CS_*rpsL*_{neo}+pRed/ET mit der *eGFP*-Expressionskassette war erfolgreich (4.5.3, Abb. 32). Die Selektion erfolgte über *rpsL*-Gegenselektion. Die Sequenzanalyse (4.5.4) zeigt, dass der Austausch der dsDNA-Kassetten nahtlos vollzogen wurde und sich exakt am vorhergesehenen Locus befindet.

Die *rpsL*-basierte Gegenselektion

Positive Expressionszellen wurden durch *rpsL*-basierter Gegenselektion identifiziert (4.5.2 - 4.5.3). Diese Identifikation bringt allerdings auch seine Tücken mit sich. Für den Erstanwender ist das Rekombinationsergebnis auf dem ersten Blick schwer zu deuten, denn die Streptomycin-haltigen Medienplatten der Negativkontrolle sowie der rekombinierten Probe sind bewachsen (4.5.2 Abb. 31). Dies beruht höchstwahrscheinlich darauf, dass der *recombination shuttle strain*



eine Mischpopulation aus Streptomycin-resistenten und -sensitiven Ribosomuntereinheiten besitzt, weswegen der Stamm nicht letal reagiert, sondern lediglich im Wachstum gehemmt wird. Erfolgreich rekombinierte Zellen verlieren die Streptomycin-sensitive Variante. Aus diesem Grund besitzen positiv rekombinierte Zellen einen Wachstumsvorteil. Dieser Wachstumsvorteil zeigt sich in Form schneller wachsender Kolonien, auf der dicht bewachsenen Medienplatte (4.5.2 Abb. 31). Allerdings ist, aufgrund des dichten Wachstums mit vornehmlich negativ rekombinierten Zellen, eine Reinigung und ein Antibiotika-*patch* auf den Verlust der Kanamycin Resistenz für die exakte Identifikation essenziell. Die *rpsL*-basierte-Gegenselektion wurde am Beispiel eGFP, und später auch GFP (Daten nicht gezeigt), erfolgreich angewendet worden, um positiv rekombinierte Zellen zu identifizieren. Damit ist die *rpsL*-basierte-Gegenselektion anwendbar, um in Kombination mit der *red*-Rekombination markerlose Genommodifikationen vorzunehmen.

Eignung des *glmS* → *pstS*-Locus für die Expression von rekombinanten Proteinen

Um die *rpsL*-basierte Gegenselektion zu evaluieren, wurde in dieser Arbeit eine *eGFP*-Expressions-kassette verwendet. Mit dem Ziel eine möglichst hohe Produktausbeute für dieses Protein oder zukünftige Produkte zu erzielen, stellte sich die Frage nach einem geeigneten Integrationsort. Nach einer Literaturrecherche (4.3) wurde die intergentische *glmS-pstS*-Region gewählt. Entscheidende Punkte hierfür sind: Integrationsort nahe am chromosomalen *origin of replication* und unmittelbare Nähe eines essenziellen Gens. Die Rekombination der dsDNA-Genkassetten an diesem Locus hatten keinen Einfluss auf die Wachstumsrate der Zelle (4.5.5, Abb. 36). Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass die Insertion einer Expressionskassette keine codierenden oder regulatorischen Gensequenzen stört. Es wurde eine Batch-Expression durchgeführt, in der dieselbe Expressionskassette Plasmid-basiert mitgeführt wurde. Nach Induktion zeigte die Plasmid-basierte Expressionskultur einen starken Einbruch, wobei schnell die stationäre Phase erreicht wurde ($OD_{600} \sim 1,2$) (4.5.6, Abb. 38). Die Genom-codierte Expressionskultur zeigte nach Induktion einen geringen Abfall der Wachstumsrate, stabilisierte sich allerdings wieder und erreichte eine Zelldichte von $OD_{600} 2,6$. Anhand der vorliegenden Daten kann allerdings keine quantitative Aussage über die Expressionsrate getroffen werden. Aufgrund der beobachteten Fluoreszenz lässt sich jedoch sagen, dass eGFP ausgehend von der genomischen Expressionskassette gebildet wurde (4.5.6 Abb.39). Allerdings konnte mittels SDS-PAGE keine eindeutige Produktbande identifiziert werden (4.5.6 Abb.40). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Gensequenz des eGFPs codonoptimiert für Eukaryoten ist (genauer *Pichia Pastoris*). Dies könnte sich negativ auf die Expressionsrate des eGFP auswirken.



6 Ausblick

Die Etablierung eines Verfahrens, welches die Möglichkeit bietet, genomische Modifikationen mittels *rpsL*-basierter Gegenselektion markerlos zu selektionieren stellt ein nützliches Werkzeug dar. Die in dieser Arbeit zur Etablierung verwendete genomische Integration einer Expressionskassette stellt hierbei nur eine Möglichkeit der Anwendung vor. Die *red*-Rekombination bietet neben der genomischen Insertion von linearer dsDNA-Kassetten und den Einfügen von Punktmutationen, ebenso die Möglichkeit der Deletion von Prophagen oder der Reparatur inaktiver Gene. Ebenso besteht die Möglichkeit z.B. *E. coli* BL21(DE3) die Fähigkeit zurückzugeben, Galaktose zu metabolisieren. Dies würde ein System ermöglichen, welches eine Induktion eines T7-Expressionssystems durch Zugabe von Laktose erlaubt. Mit dieser Technologie ist man in der Lage das *E. coli* – Genom gezielt zu modifizieren und es an das gewünschte Vorhaben anzupassen.

Anschließend zu dieser Arbeit wäre zu untersuchen, in wie weit ein Genom-codiertes Expressionssystem als Alternative zu Plasmiden einsetzbar ist. Hierbei stellt sich die Frage, wie viele Plasmide in einer Zelle nach Induktion aktiv genutzt werden. In dieser Arbeit wurde nur eine Expressionskassette inseriert. Die Frage, die sich dabei stellt, ist wie sich die Expression verändert, wenn mehrere Expressionskassette in Reihe oder verteilt in Genom integriert werden und in wie weit die Ausbeute eines Plasmid-basierten Systems erreicht werden kann. Die Analyse anderer Integrationsorte könnte auch eine Überlegung wert sein, um verglichen mit dem *glmS*→*pstS*-Locus den geeignetsten Ort für die Integration einer Expressionskassette zu ermitteln.

Die *rpsL*-basierte Gegenselektion hat in dieser Arbeit gut funktioniert, aber die Gegenselektion könnte weiter optimiert werden. Denn die *rpsL*-basierte-Gegenselektion stellt für den unerfahrenen Mikrobiologen seine Tücken dar. Zusätzlich macht dieses Verfahren eine Reinigung der potenziellen Rekombinanten und ein Patch-Screening notwendig. Ebenso setzt dieses Verfahren eine Streptomycin-Resistenz im parentalem Stamm voraus, welche gegebenenfalls vor Nutzung der *rpsL*-Gegenselektion, erzeugt werden muss. Hier wäre die Überlegung zu einem dichteren System wechseln, wie z.B. durch die Verwendung eines Suizid-Gens (*sacB*-basierte-Gegenselektion (J.M. Reyrat et al., 1998^[28])).



Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der <i>E. coli</i> Genommanipulation via <i>red</i> -Rekombination	4
Abb. 2: Modell der <i>red</i> -Rekombination eines ssDNA-Oligos	5
Abb. 3: Streptomycin und dessen Bindung an die ribosomale 30S-Untereinheit	6
Abbildung nach Carter et al., Nature, vol. 407, 2000 ^[13]	
Abb. 4: Darstellung der <i>rpsL</i> -Gegenselektion.....	7
Abb. 5: Ergebnis des Streptomycin-Sensitivitäts-Tests von <i>E. coli</i> BL21(DE3)	17
Abb. 6: Ampicillin-Sensitivitäts-Test von <i>E. coli</i> BL21(DE3)	17
Abb. 7: Kanamycin-Sensitivitäts-Test von <i>E. coli</i> BL21(DE3)	17
Abb. 8: LB-Amp50-Agarplatten von BL21 (DE3)+pRed/ET.....	18
Abb. 9: <i>Alignment</i> : Str ^R -Oligos und genomisches <i>rpsL</i> -Gens.....	18
Abb. 10: LB-str25-Agarplatten von BL21 (DE3)str ^R	19
Abb. 11: LB-str25-Agarplatten von BL21 (DE3)str ^R ohne Arabinose-Induktion	19
Abb. 12: <i>Patch-screening</i> von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R auf Str ^R und Amp ^S	19
Abb. 13: PCR-Konditionen für die Sequenzierung des <i>rpsL</i> -Gens von <i>E. coli</i> BL21(DE3) und <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R	20
Abb. 14: Analyse der <i>rpsL</i> -PCR-Amplifikate von <i>E. coli</i> BL21(DE3) mittels Gelelektrophorese	20
Abb. 15: Analyse der <i>rpsL</i> -PCR-Amplifikate von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R mittels Gelelektrophorese.....	20
Abb. 16: Vergleich der <i>rpsL</i> -Gensequenzen von <i>E. coli</i> BL21(DE3) und <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R	21
Abb. 17: Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> BL21(DE3) und <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R	22
Abb. 18: Darstellung der Unterschiede zwischen <i>lagging strand</i> und <i>leading strand</i> bezogen auf die Genexpression.	23
Abb. 19: Darstellung des ausgewählten Integrationsorts von <i>E. coli</i> BL21(DE3)	24
Abb. 20: Schematische Darstellung der Gegenselektionskassette CS- <i>rpsL</i> - <i>neo</i>	25
Abb. 21: Herstellung der Gegenselektionskassette CS- <i>rpsL</i> - <i>neo</i>	25
Abb. 22: Agarosegelelektrophorese der PCR-Amplifikate der CS- <i>rpsL</i> - <i>neo</i> -Genkassette	26
Abb. 23: LB-kan15-Agarplatten mit <i>E. coli</i> BL21 (DE3)str ^R -CS- <i>rpsL</i> - <i>neo</i>	26
Abb. 24: Selektion von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R -CS- <i>rpsL</i> - <i>neo</i> auf Kanamycin-Resistenz und Analyse der Streptomycin-Sensitivität	27
Abb. 25: PCR-Konditionen für die Amplifikation des <i>glmS</i> - <i>pstS</i> -Locus der BL21(DE3)-Derivate für die Sequenzierung	27
Abb. 26: Binderegionen der Primer <i>glmS</i> - <i>pstS</i> - <i>rev</i> / <i> fwd</i> bei der PCR der Gegenselektionskassette.....	28
Abb. 27: Analyse der <i>glmS</i> → <i>pstS</i> -PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese	28
Abb. 28: Darstellung der Expressionskassette <i>eGFP</i> -Cas.....	29
Abb. 29: PCR-Bedingungen zur Herstellung von <i>eGFP</i> -Expressionskassetten.....	29
Abb. 30: Analyse der <i>eGFP</i> -PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese	29
Abb. 31: LB-str25-Agarplatten von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R - <i>eGFP</i>	30
Abb. 32: Physiologische Charakterisierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R - <i>eGFP</i>	31
Abb. 33: PCR-Konditionen der Amplifikation des <i>glmS</i> - <i>pstS</i> -Locus der BL21(DE3)-Derivate für die Sequenzierung	31
Abb. 34: Binderegionen der Primer <i>glmS</i> - <i>pstS</i> - <i>rev</i> / <i> fwd</i> bei der PCR der Expressionskassette	32
Abb. 35: Auftragung der <i>glmS</i> → <i>pstS</i> -PCR-Amplifikate aus einer cPCR von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R - <i>eGFP</i> auf einem Agarosegel ..	32
Abb. 36: Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> BL21(DE3)- <i>eGFP</i> und <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	33
Abb. 37: Abbildung der über Nacht induzierten <i>E. coli</i> BL21(DE3) und BL21(DE3)str ^R - <i>eGFP</i> Batchkulturen	33
Abb. 38: Gegenüberstellung der Genom und Plasmid-basierten Expression von <i>eGFP</i>	34
Abb. 39: Abbildung verschiedener Titer der Expressionskulturen unter UV-Licht in 0,9% NaCl-Lösung	35
Abb. 40: SDS-PAGE-Analyse von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R - <i>eGFP</i>	35
Abb. 41: Ablauf der Genommodifikationen an <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	36
Abb. 42: Ausschnitt des Sequenzvergleich der <i>rpsL</i> -Gensequenzen von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R und <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	36
Abb. 43: Ausschnitt des Sequenzvergleich der <i>glmS</i> → <i>pstS</i> -Gensequenzen von BL21(DE3)str ^R -CS- <i>rpsL</i> - <i>neo</i> und BL21(DE3)	36
Abb. 44: Ausschnitt des "Alignments" der <i>glmS</i> → <i>pstS</i> -Gensequenzen von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R - <i>eGFP</i> und <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	36
Abb. 45: Sequenzvergleich der Nukleotidsequenzen von <i>eGFP</i> (<i>P. pastoris</i> -optimiert) und <i>GFP</i> (<i>E. coli</i> -optimiert)	36
Abb. 46: Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen von <i>eGFP</i> (<i>P. pastoris</i> -optimiert) und <i>GFP</i> (<i>E. coli</i> -optimiert).....	36

Anmerkung: Wenn nicht weiter gekennzeichnet sind die Abbildungen Eigenanfertigungen

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Bakterienstämme. Quelle des Genotyp: openwetware.org	8
Tabelle 2: Liste der verwendeten Vektoren	8
Tabelle 3: Liste der verwendeten Primer, synthetisiert von Biomers GmbH	8
Tabelle 4: Liste der verwendeten Kultivierungsmedien.....	8
Tabelle 5: Liste der verwendeten Kultivierungsmedien.....	9
Tabelle 6: Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der aufgereinigten PCR-Amplifikate des <i>rpsL</i> -Gens von BL21(DE) und BL21(DE3)str ^R	21
Tabelle 7: Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der aufgereinigten PCR-Produkte der Herstellung der CS- <i>rpsL</i> - <i>neo</i> -Genkassette	26
Tabelle 8: Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der aufgereinigten PCR-Amplifikate des <i>glmS</i> → <i>pstS</i> -Locus von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R -CS- <i>rpsL</i> - <i>neo</i> und <i>E. coli</i> BL21(DE3)	28
Tabelle 9: Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der aufgereinigten PCR-Produkte zur Herstellung der <i>eGFP</i> -Genkassette	30
Tabelle 10: Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der aufgereinigten PCR-Amplifikate des <i>glmS</i> → <i>pstS</i> -Locus von <i>E. coli</i> BL21(DE3)str ^R - <i>eGFP</i> zur Sequenzierung	32



Literaturverzeichnis

1. Cohen, S. N., A. C. Y. Chang and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2110.
2. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB, 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Nov;70(11):3240-4. PMID: 4594039 PMCID: PMC427208
3. Murphy, K. C. (1998). Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 2063–2071
4. Hilary M. Ellis et al., 2001. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *PNAS* June 5, 2001 vol. 98 no. 12
5. Donald L. Court, James A. Sawitzke, and Lynn C. Thomason, 2002, GENETIC ENGINEERING USING HOMOLOGOUS RECOMBINATION, *Annu. Rev. Genet.* 2002. 36:361–88
6. Brooks K, Clark AJ. 1967. Behavior of lambda bacteriophage in a recombination deficient strain of *Escherichia coli*. *J Virol* 1:283–293.
7. Korn D, Weissbach A. 1963. The effect of lysogenic induction on the deoxyribonucleases of *Escherichia coli* K12-lambda. I. Appearance of a new exonuclease activity. *J Biol Chem* 238:3390–3394.
8. Kmiec E, Holloman WK. 1981. Beta protein of bacteriophage lambda promotes renaturation of DNA. *J Biol Chem* 256:12636–12639.
9. Karu AE, Sakaki Y, Echols H, Linn S. 1975. The gamma protein specified by bacteriophage gamma. Structure and inhibitory activity for the recBC enzyme of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 250: 7377–7387.
10. Kellenberger G, Zichichi ML, Weigle JJ. 1961. Exchange of DNA in the recombination of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci USA* 47:869–878.
11. Mosberg, J. A. 2010. Lambda Red Recombineering in *Escherichia coli* occurs through a fully single-stranded intermediate, 0.1534/genetics.110.120782
12. Mosberg, Joshua Adam Weintrob. 2013. Studying and Improving Lambda Red Recombination for Genome Engineering in *Escherichia coli*. Doctoral dissertation, Harvard University.
13. Andrew P. Carter et al., 2000, Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge, UK. NATURE |VOL 407 | 21 SEPTEMBER 2000
14. Bulkley D., Brandi L., Polikanov YS., Fabbretti A., O'Connor M., Gualerzi CO., Steitz TA., 2014, The antibiotics dityromycin and GE82832 bind protein S12 and block EF-G-catalyzed translocation., *Cell Rep* 6(2):357-65
15. Yu-Kuo Tsai, Ci-Hong Liou, Jung-Chung Lin, Ling Ma, Chang-Phone Fung, Feng-Yee Chang, L. Kristopher Siu. 2014. A Suitable Streptomycin-Resistant Mutant for Constructing Unmarked In-Frame Gene Deletions Using *rpsL* as a Counter-Selection Marker. PMCID: PMC4182516. PMID: 25268958
16. Nicholas J. Gay, Victor L. J. Tybulewicz and John E. Walker, 1986. Insertion of transposon Tn7 into the *Escherichia coli* gimS transcriptional terminator. *Biochem. J.* (1986) 234, 111-1 17
17. James A. Sawitzke, Nina Costantino, Xin-tian Li, Lynn C. Thomason, Mikhail Bubunencko, Carolyn Court and Donald L. Court, 2011. Probing Cellular Processes with Oligo-Mediated Recombination and Using the Knowledge Gained to Optimize Recombineering. *J. Mol. Biol.* (2011) 407, 45–59
18. Gerald Striedner, Irene Pfaffenzeller, Luchner Markus, Sabine Nemecek, Reingard Grabherr, Karl Bayer, 2009. Plasmid-Free T7-Based *Escherichia coli* Expression Systems. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 105, No. 4, March 1, 2010
19. Marians, K. J. (1992). Prokaryotic DNA replication. *Annu Rev Biochem* 61, 673–719.
20. Liang ST, Ehrenberg M, Dennis P, Bremer H. Decay of rplN and lacZ mRNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 1999 May 14 288(4):521-38. p.524
21. Eduardo P. C. Rocha. 2004, The replication-related organization of bacterial genomes. *Atelier de Bioinformatique, Université Pierre et Marie Curie*, 12, Rue Cuvier, 75005 Paris, *Microbiology* (2004), 150, 1609–1627
22. Bryant JA, Sellars LE, Busby SJ, Lee DJ, 2014. Chromosome position effects on gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 2014 Oct;42(18):11383-92. doi: 10.1093/nar/gku828. Epub 2014 Sep 10.
23. Gerdes, S. Y., M. D. Scholle, J. W. Campbell et al. (21 co-authors). 2003. Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *J. Bacteriol.* 185:5673–5684.
24. Brewer BJ. When polymerases collide: replication and the transcriptional organization of the *E. coli* chromosome. *Cell.* 1988;53:679–686.
25. Rocha EP, Danchin A. Gene essentiality determines chromosome organisation in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:6570–6577.
26. Mao X, Zhang H, Yin Y, Xu Y. The percentage of bacterial genes on leading versus lagging strands is influenced by multiple balancing forces. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:8210–8218.
27. Merrikh H, Zhang Y, Grossman AD, Wang JD. Replication–transcription conflicts in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10:449–458.
28. Jean-Marc Reyrat et al., 1998. Counterselectable Markers: Untapped Tools for Bacterial Genetics and Pathogenesis. *Unité de Génétique Mycobactérienne, Institut Pasteur*, 75724 Paris Cedex 15, France. PMCID: PMC108478 PMID: 9712740
29. Murphy, K. 2016. λ Recombination and Recombineering, *EcoSal Plus* 2016. doi:10.1128/ecosalplus.PubMed PMID: 27223821.



Erklärungen

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem oben angeführten formulierten Thema ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter der Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 11. Februar 2019

Erklärung zur Einsichtnahme

Weiterhin erkläre ich hiermit, dass in Fällen berechtigten Interesses, insbesondere zur Fortführung der Arbeit durch andere Studierende, Einsichtnahme in meine Ausarbeitung genommen werden kann. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass ein Exemplar meiner Bachelorthesis in die Bibliothek des Fachbereichs aufgenommen wird;

Hamburg, 11. Februar 2019

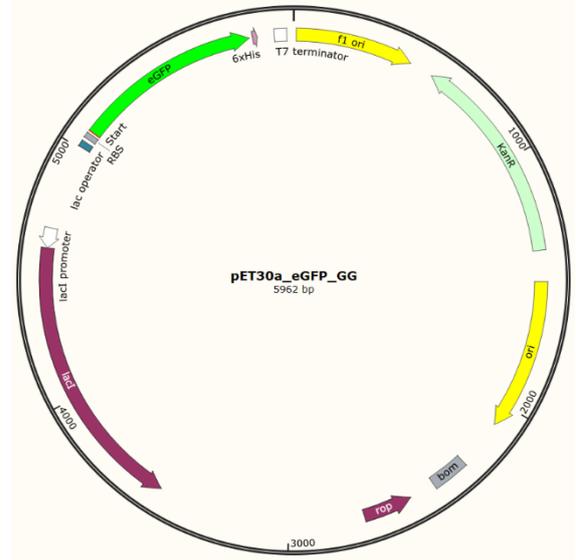


Anhang

I. Plasmidkarten

pET30a_eGFP_GG

- fl ori : fl bacteriophage origin of replication; arrow indicates direction of (+) strand synthesis
- KanR : Product: aminoglycoside phosphotransferase
- ori : High-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication
- bom : Basis of mobility region from pBR322
- rop : Product: Rop protein, which maintains plasmids at low copy number
- lacI : Product: lac repressor
- lacI promoter : Promoter for lacI
- lac operator : Operator for lac-operon
- T7-Promoter : Promoter for bacteriophage T7 RNA polymerase
- RBS: : Efficient ribosome binding site from bacteriophage T7 gene 10
- eGFP: : Product: enhanced GFP
- 6xHis : Product: 6xHis affinity tag (deactivated by two stop-codon)
- T7-Terminator : Transcription terminator for bacteriophage T7 RNA polymerase



Nukleotid-Sequenz:

```

5' -TGGCGAATGGGACGGCCCTGTAGCGCGGCATTAAAGCGCGGGGTGGTGGTACGCGCAGCGTGACCGGTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCTTTCGCTTCTTCCCTT
CCTTTCGCGCACGTTCCCGCGCTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGGATTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTGATTAGGGTGATGGTCA
CGTAGTGGGCCATCGCCCTAGACAGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACGGAAACAACACTCAACCCCTATCTCGGTCTATTCTTT
TGATTTATAAGGGATTTTCGCCGATTTCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAACAAAATTTAACGGCAATTTTAAACAAAATTTAACGTTTACAAATTCAGTGGCACTTTTCCGG
GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTTTTCTAAATACATTCAAAATATGATCCCGCTCATGAATTAATTTCTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATC
AGGATATCAATACCATATTTTGAAAAGCCGTTCTCTGTAATGAAGGAGAAAATCACCGGAGGAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTCGGATTCGCACTCGTCCAAAT
CAATACAACTTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAAGAAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTATGCATTTCTTCCAGACTTGTTC
ACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAATCACTCGCATCAACCAACCCGTTATTCATTCGTGATTCGCGCTGAGCGAGAGCAAAATACCGCATCGCTGTAAAAGGACAAATACAAACAGG
AATCGAATGCAACCGCGCAGGAACACTGCGAGCGCATCAACAATATTTTCACTGAATCAGGATATTTCTTAATAACCTGGAATGCTTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAAGTAACTATG
CATCATCAGGATACGGATAAAATGCTTGTGGTTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTAGTCTGACCATCTCATGTGAACATCATTTGGCAACCGCTACCTTTCGCATTTTCAGA
AACAACTCTGGCCGATCGGGCTTCCCATACAAATCGATAGATTGTCGCACTGATTGCCCCGACATTATCCGGAGCCATTTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGG
CCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATACACCCCTTGATTAATCTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTTATGTTTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCACACTGA
CGCTCAGACCCCTAGAAAAGATCAAAAGACTCTCTTGAGATCCTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTGCAACAAAAAACCCCGCTACCCAGCGGTGGTTTTGTTCCGGATCAAGA
GCTACCAACTCTTTCCGAAGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAATCTGCTCTTCTAGTGAGCCGATGTTAGGCCAACCTTCAAGAATCTGTAGCAGCCGCTACATACC
TTCGCTCTGTAATCCCTGTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCAGCGGTCCGGCTGACAGGGGGGTTCCG
TGCACAGCCGAGCTTGGAGCAAGCACTACACCGAACTGAGTACCTACAGCGTGGACTATGAGAAAGCCGACGCTTCCGGAAGGAGAAAGCGGCAGGATCCGGTAAAGCGGCAG
GGCGGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACCGCTGGTATCTTTATGCTCATGGGGTAAAGATACCCGATGAAACGAGAGAGATGCTCAGTACGCGTTACTGATGATGA
GGAGCTATGAAAAGCGCCAGCAACCGGCCCTTTTACGGTTCTCGCCCTTTGCTGGCCTTTGCTGCTGCTTTCGCTCAGATGTTCTTCCCTGGCTTATCCCTGATTCGTGGATAACCGTATTACC
TTTGATGAGCTGATACCGCTTCCCGCCGCAACGAGCAGCCGAGCGAGTCAAGCGGATGATGCGGTGCTGCAACAAAAAACCCCGCTACCCAGCGGTGGTTTTGTTCCGGATCAAGA
CCGCATATATGTTGCACTCTCAGTACAAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGTTCATGGCTCGGCCCGGACCCCGCAACCCCGCT
GACCCGCTGACCGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTCCCGGAGCTGCAATGCTCAGAGGTTTTACCGTATCACCGAAACCGCGGAGGCGAGCTCGG
GTAAAGCTCATCAGCTGCTGTAAGCACTTACAGATGCTGCTGCTTTCATCCGGTCCAGCTGCTGATGTTTTCCAGAAAGCGTTAATGCTTGGCTTCTGATAAAGCGGCGATGTTAA
GGCGGTTTTTCCCTGTTTGGTCACTGATCCCTCCGTTAAGGGGATTTCTTAACTTAACTTAAAGAGGATATACATATGGTGAGCAAGAGGATGCTCAGTACGCGTTACTGATGATGA
CCGCTTACTGGAAGCTGTGAGGGTAAACAATGGCGGTATGGATGCCGGGGACAGAGAAAATCACTCAGGCTCAATGCCAGCGCTTCCCTTAATACAGATGTAGGTGTCCACAGG
TAGCCAGCAGCATCCGCGATCAGATCCGGAACATAAGTTCAGGGGCTGACTTCCCGCTTCCAGACTTACGAAACCGGAAACCGAAGACACTTCAATGTTTGTCTCAGTCCAG
ACGTTTTGACGACAGCTCGCTTCCGCTCGCTATCGGTGATTCATCTGCTAACAGTAAAGCAACCCCGCCAGCTTACCGGGTCTCAAGCAGGAGCAGCATGTCGGCAC
CGTGGGGCCGCTGAGCGGATGAGGCTGCTTCTCCGCAACAGCTTTGGTGGCGGAGCAGTACGAAAGGCTTACGAGGGGCTGCAAGATTCGAAATCCGAGAGCGGAGGAGCTG
CATCGTCGCGCTCCAGCAAGCGGCTTCCGCGAAAATGACCCAGAGCGCTCCGCGCACCTGTCTTACAGATTCATGATAAAGAGACAGTCAATGATGCGCGACGATCATGCTCC
GGCCACCGAAACGAGCTTCACTGGCTTGAAGCTCTCAAGGCTCGCTCAGATCCCGCTAATGACTGAGCTAACCTTACATTAATTCGCTTCCGCTTCCAGCTTCCAGTCC
GAAACCTGCTGCCAGCTGATTAATGAATCGCCCAACCGCGGGAGGCGGTTTTGCTATTTGGCCCGAGCTGGTTTTTCTTTCACAGTGCAGCGGCAACAGCTGATGCCCT
TCACCGCTGGCCCTGAGAGATGACAGCAAGCGCTCCAGCTGGTTTCCCGCAGGCGAAATCCTTTGATGGTGTAAACGGCGGATATAACATGAGCTGCTTCCGTTATCGTC
TATCCACTACCGAGATGTCGCAACCGCGAGCCGACTCGGTAATGGCGCATTCGCGCCAGCCCATCTGATCGTTGGCAACAGCATCCGATGGGAAAGGAGCGCCCTATTCAG
CATTTGATGTTGTTTGAACCGGACATGGCATCCAGTCCGCTCCGCTTCCGCTATCGGCTGAAATTTGATTCAGCTGAGATTTATGCGCAGCCAGCCAGCCCGCGGAGA
CAGAATTTAGGGGGTAACAGCGGATTTGCTGGTACCCAAATGGCAGCCATGCTCCAGCCAGCTCGCTACCGCTTCCGATGAGTGGTGGTGGTGTGCTGTTGATGGTGTGCTGTTCA
GAGCATCAAGAAATAGCGCGGAACATTAGTCAGGAGCTTCCACAGCAATGGCATCTCCGTTATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCACTGACCGCTTGGCGGAGAAATTTGTCAC
CGCCCTTTACAGCTTCCAGCGCTTGGTTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTT
TGGCTCGCCCTGGTTACACCGCGGGAAACCGCTGATAAAGAGACACCGGCATCTCTGCGACATCGTAAGAGGTTACTGGTTTACACTTACCACCTGAAATGACTCTTCCGGGGCGTA
TCATGCCATACCGCGAAGGTTTTGGCCGATTCGATGGTGTCCGGATCTCGAGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGATAGGAAGCAGCCAGTATAGGTTGAGGCTGTTGAGCCCGCTT
CGCCAAAGAAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCGCGCCACCGGGCTCCGACCATACCCAGCGGAAACCAAGCGCTCATGAGCCGGAATGGCGGCGGATCTTCCCT
ATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTTGGCGCGGTGATCGCGCCGACCATGCTCCGCGTAGAGGATCGAGATCGATTCGATCCCGCGAAATTAATACCTCA
CTATAGGGGAATTTGAGCGGATAAACAATTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTAACTTTAAGAGGAGATATACATATGGTGAGCAAGAGGAGGAGGCTGTCACCGGGTGGTGGCATTCC
TGGTCAGCTGGAGCGGACCTTAAAGCGGCAAGTTTACAGCTGTCGCGGAGGGGAGGGGAGTCCGACTACGGCAAGCTGACCCCTGAAAGTTCATCTGCACACCGGCAAGCTCCCGCT
CCCTGGCCACCCCTCGTGAACCTTACGCGCTGCGATGCTTACGCGCTACCCCGCATACCCAGCAGCATGAAGCAGACGACTTCTTCAAGTCCCGGATGCGGAGGCTCCAGGAGG
CACCATCTTCTTAAAGGACGAGCGCAACTACAAGACCCCGCGCGAGGTGAAAGTTCGAGGGGACACCCCTGGTAAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC
TGGGACCAAGCTGGAGTACAACACAAGCCACAACCTCTATATCATGGCCAGCAAGGAGGAGGATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCGCAACACTCCGAGGCGGCGAGCTGGAG
CTCGCCGACCACTACGAGCAACACCCCTTCCGGCCCGGCTGCTGCTCGCCGACCAACACTTCTGAGCAGCCAGTCCGCTCGAGCAAGACTGAGCAAGACTGAGCAAGACTGAGCAAG
GTCCTGCTGGAGTTGCTGAGCGCGGGATCACTTCCGCGATGGACGAGCTGTAACAAGTAAATAGTCTCGAGCACCCAGCCACCTGAGATGAGATGAGCAAGACTGAGCAAGACTGAGCAAG
GAACTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCAATAACCCCTTGGGGCTTAAAGGGTCTTGGGGTTTTTGTGTAAGGAGGAACTATATCCGGAT-3'
    
```




II. Nukleotidsequenzen der Rekombinationstemplates

CS-*rpsL-neo* Kasette

rpsL-neo Kasette

```
5' -GGCCTGGTGTATGATGGCGGGATCGTTGTATATTTCTTGACACCTTTTCGGCATCGCCCTAAAATTCGGCGTCTCATATTGTGTGAGGACGTTTTATTACGT
GTTTACGAAGCAAAAAGCTAAAACAGGAGCTATTTAATGGCAACAGTTAACAGCTGGTACGCAAACACGCTGCTCGCAAAGTTGCGAAAAGCAACGTGCCTCGC
CTGGAAGCATGCCCGCAAAAACGTGGCGTATGTACTCGTGTATATACTACCACTCCTAAAAACCGAACTCCGCGCTGCGTAAAGTATGCCGTGTTTCGTCTGACT
AACGTTTTCGAAGTACTTCTACATCGGTGGTGAAGGTCACAACCTGCAGGAGCACTCCGTGATCTGTATCCGTGGCGGTGCTGTTAAAGACCTCCCGGGTGT
CGTTACCACACCGTACGTGGTGGCTTACTGCTCCGGCGTTAAAGACCGTAAGCAGGCTCGTTCCAAGTATGGCGTGAAGCGTCCTAAGGCTTAAGGAGGACAA
TCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTCTCCGGCCGTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACACAGACAATCGGCTGCTGTATGCCG
CCGTGTTCCGGCTGTGAGCGCAGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACTGTCGGTGCCCTGAATGAAGTGCAGGAGCAGGCGCCGGCTATCGTGGC
TGGCCACGACGGCGGCTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTACTGAAGCGGGAAAGGACTGGCTGCTATTTGGCGAAGTCCCGGGGAGGATCTCCTGTGTCAT
CTCACCTTGTCTCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATC
GCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGAGCAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGACAGGCTCA
AGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCTGCTTCCGCAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTG
GCCGGCTGGGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGCTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACG
GTATCGCCGCTCCGATTGCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGA-3'
```

* synthetisiert von Genebridge

eGFP-Kasette

eGFP-Cas

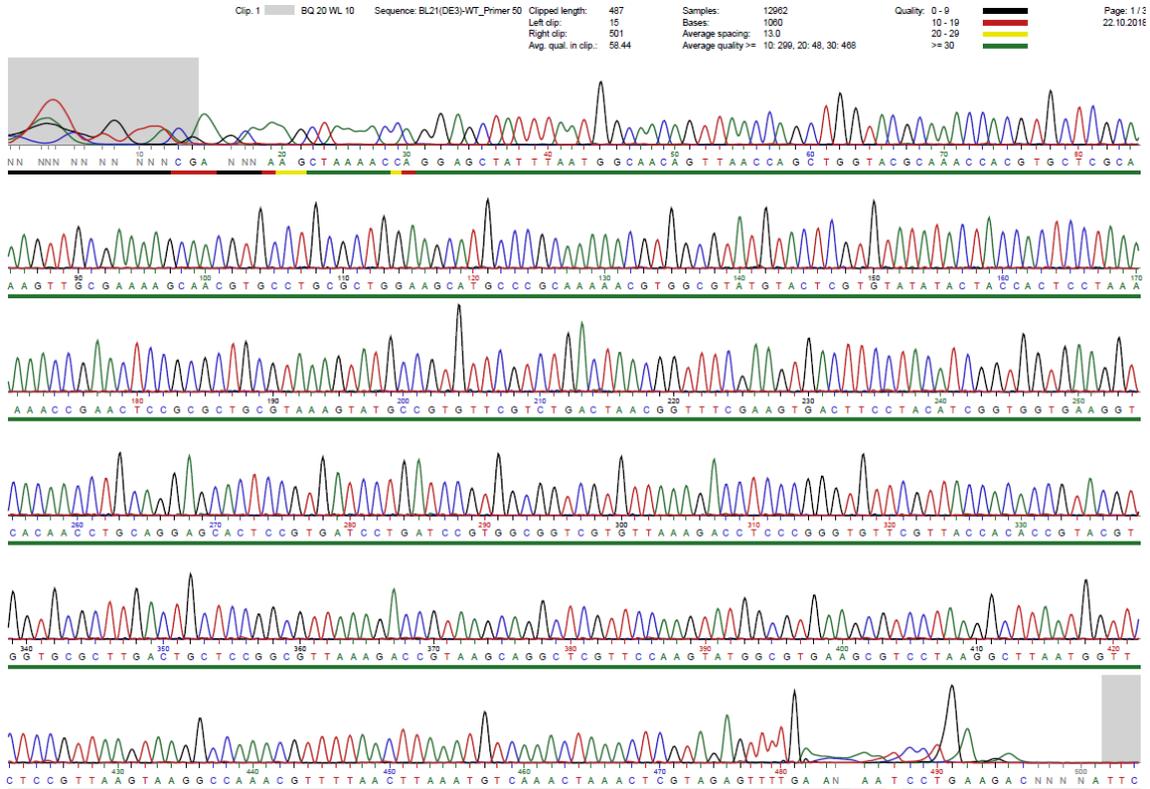
```
5' -CAGAATGAAAATTTTTCTGTCATCTCTTCGTTATTAATGTTTGTAAATGATAATACGACTCACATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATCCCCCTAGA
AATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATACATATATGGTGAACAAGGGCAGGAGCTGTTACCAGGGTGGTGCCTATCCTGGTGCAGCTGGACGGCGACGTA
AACGGCCACAAGTTTCCGCGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGG
CCCACCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTAC
GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC
ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG
GTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCCCGAC
AACCACCTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCATATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCCCGGGATCACTCTCGGC
ATGGACGAGCTGTACAAGTAATAGTCTCGAGCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGC
TGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTTAACGGGCTTGGAGGGTTTTTTGCTGAATATCAACGCTTATTTAAATCAGACTGAAGACTTTATCTCTCT
GTC-3'
```



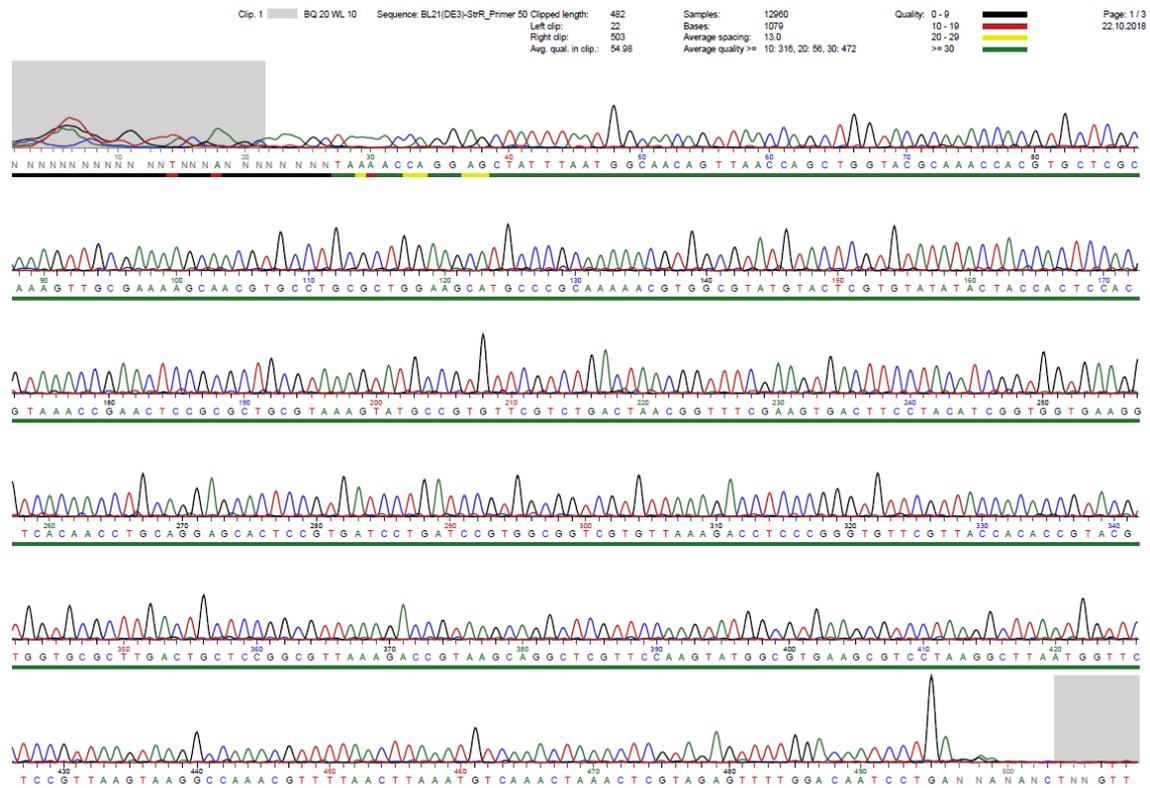
III. Sequenzierungsergebnisse

Sequenzierungsreports des rpsL-Locus

BL21(DE3)-WT_rpsL_fwd



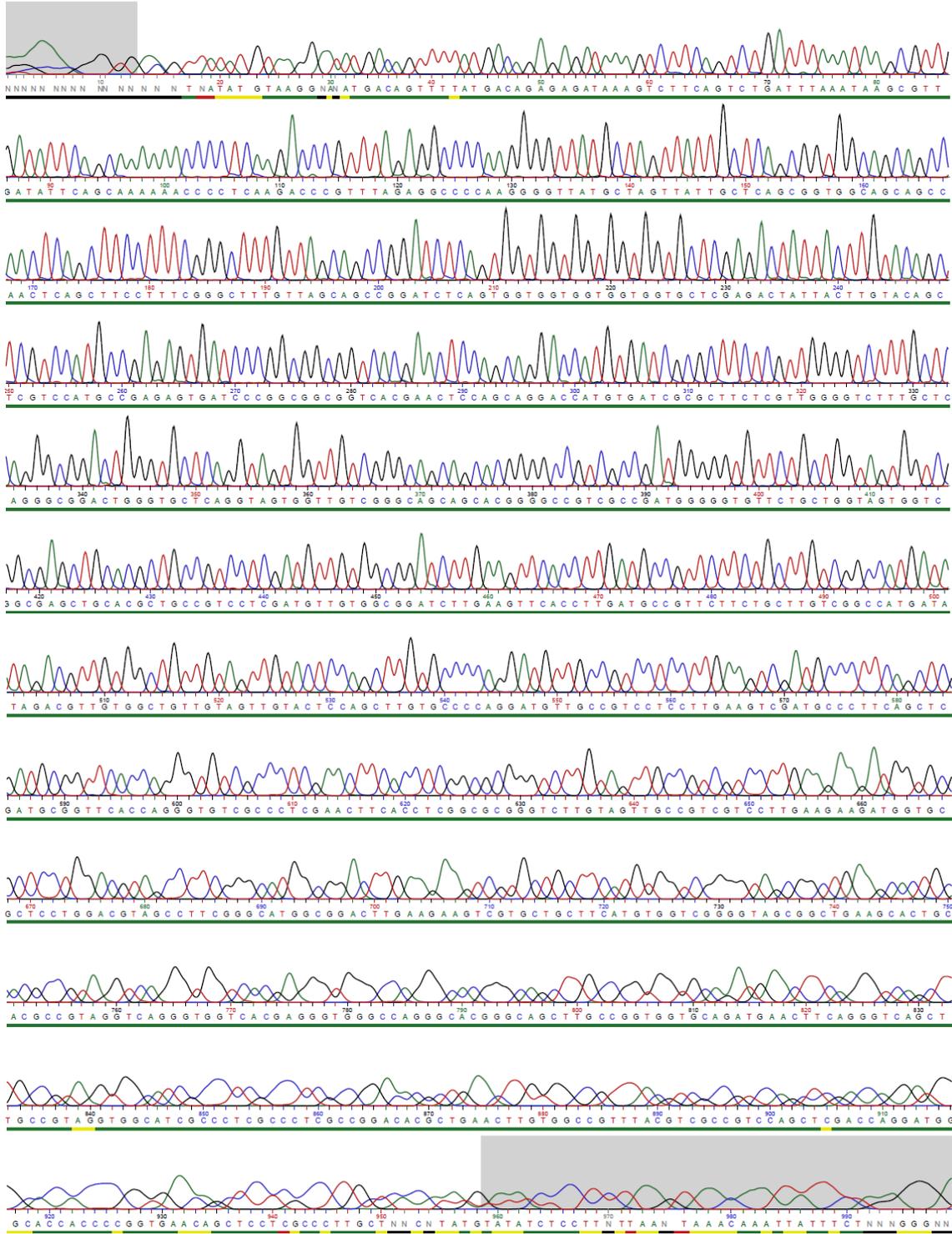
BL21(DE3)-strR_rpsL_fwd





BL21(DE3)strR_eGFP_rev

Clip: 1 BQ 20 WL 10 Sequence: BL21(DE3)-eGFP_HAW-P3Dipped length: 945 Samples: 13896 Quality: 0 - 9
Left clip: 14 Bases: 1161 10 - 19
Right clip: 938 Average spacing: 13.0 20 - 29
Avg. qual. in clip: 51.9 Average quality >= 10: 20, 20: 73, 30: 930 >= 30





IV. Sequenzvergleiche von Nukleotidsequenzen

Sequenzvergleich von BL21(DE3) und BL21(DE3)str^R am *rpsL*-Gen

```

BL21_WT      CCAGGAGCTATTTAATGGCAACAGTTAACCAGCTGGTACGCAAACCACGTGCTCGCAAAGTTGCGAAAAGCAACGTGCCTGCGCTGGAAGCA
BL21_strR    CCAGGAGCTATTTAATGGCAACAGTTAACCAGCTGGTACGCAAACCACGTGCTCGCAAAGTTGCGAAAAGCAACGTGCCTGCGCTGGAAGCA
strR-Oligo    -----
*****

BL21_WT      TGCCCGCAAAAACGTGGCGTATGTA TACTCGTGTATATACTACCACCTCCATAAAAACCGAACTCCGCGCTGCGTAAAGTATGCCGTGTTTCGTCT
BL21_strR    TGCCCGCAAAAACGTGGCGTATGTA TACTCGTGTATATACTACCACCTCCACGTAAACCGAACTCCGCGCTGCGTAAAGTATGCCGTGTTTCGTCT
strR-Oligo    -----TGGCGTATGTA TACTCGTGTATATACTACCACCTCCACGTAAACCGAACTCCGCGCTGCGTAAAGTATGCCGTG-----
*****+*****

BL21_WT      GACTAACGGTTTCGAAGTGACTTCCTACATCGGTGGTGAAGGTCACAACCTGCAGGAGCACTCCGTGATCCTGATCCGTGGCGGTTCGTGTTA
BL21_strR    GACTAACGGTTTCGAAGTGACTTCCTACATCGGTGGTGAAGGTCACAACCTGCAGGAGCACTCCGTGATCCTGATCCGTGGCGGTTCGTGTTA
strR-Oligo    -----
*****

BL21_WT      AAGACCTCCCGGTTTCGTTACCACACCGTACGTGGTGCCTTGACTGCTCCGGCGTTAAAGACCGTAAGCAGGCTCGTTC CAAGTATGGC
BL21_strR    AAGACCTCCCGGTTTCGTTACCACACCGTACGTGGTGCCTTGACTGCTCCGGCGTTAAAGACCGTAAGCAGGCTCGTTC CAAGTATGGC
strR-Oligo    -----
*****

BL21_WT      GTGAAGCGTCCTAAGGCTTAATGGTTCTCCGTTAAGTAAGGCCAAACGTTTAACTTAAATGTCAAACCTAAACTCGTAGAGTTTGG
BL21_strR    GTGAAGCGTCCTAAGGCTTAATGGTTCTCCGTTAAGTAAGGCCAAACGTTTAACTTAAATGTCAAACCTAAACTCGTAGAGTTTGG
strR-Oligo    -----
*****
    
```

Abb. 42: Ausschnitt des Sequenzvergleich der *rpsL*-Gensequenzen von *E. coli* BL21(DE3)str^R und *E. coli* BL21(DE3) nach MAFFT-Algorithmus; Dargestellt ist die Sequenzregion von BL21(DE3) (BL21_WT) und BL21(DE3)str^R(BL21_srr^R) und dem str^R-Desoxyoligonukleotids. Es wurde der MAFFT-Algorithmus verwendet, welcher die Sequenzen auf Basis der Nukleotidsequenz annealt. Zudem ist das *rpsL*-Gen in Form eines Pfeils visuell dargestellt. Das + symbolisiert, dass drei Basen an diesem Punkt identisch sind, dass * hingegen das nur zwei identisch sind.



Sequenzvergleich von BL21(DE3) und BL21(DE3)str^R_CS-rpsL_neo-Kassette

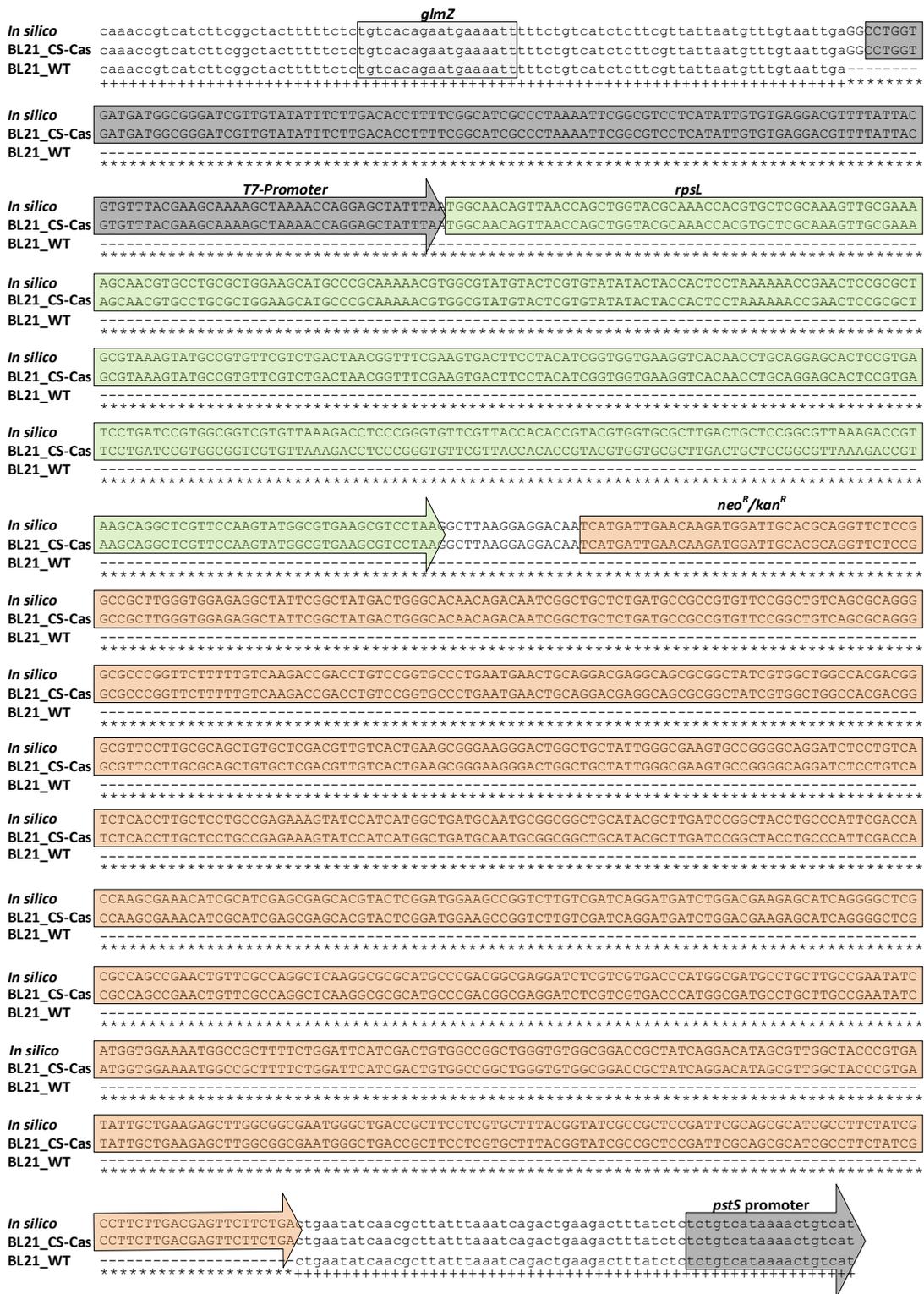


Abb. 43: Ausschnitt des Sequenzvergleich der *glmS*→*pstS*-Gensequenzen von *E. coli* BL21(DE3)str^R_CS-rpsL_neo und *E. coli* BL21(DE3) nach MAFFT-Algorithmus; Dargestellt ist die Sequenzregion von BL21(DE3) (BL21_WT) und BL21(DE3)str^R_CS-rpsL_neo (BL21_CS-Cas). Es wurde der MAFFT-Algorithmus verwendet, welcher die Sequenzen auf Basis der Nukleotidsequenz annealt. Zusätzlich wurde ein *in silico* rekombiniertes BL21(DE3)str^R_CS-rpsL_neo in das Annealing mitaufgenommen. Die Großbuchstaben verdeutlicht die Genregion, in welcher die Genkassette ins Genom integriert ist. Zudem sind die Gene in Form von Pfeilen visualisiert dargestellt. Das + symbolisiert, dass drei Basen an diesem Punkt identisch sind, dass * hingegen das lediglich zwei identisch sind.



Sequenzvergleich von BL21(DE3) und BL21(DE3)str^R_eGFP am Integrationsort

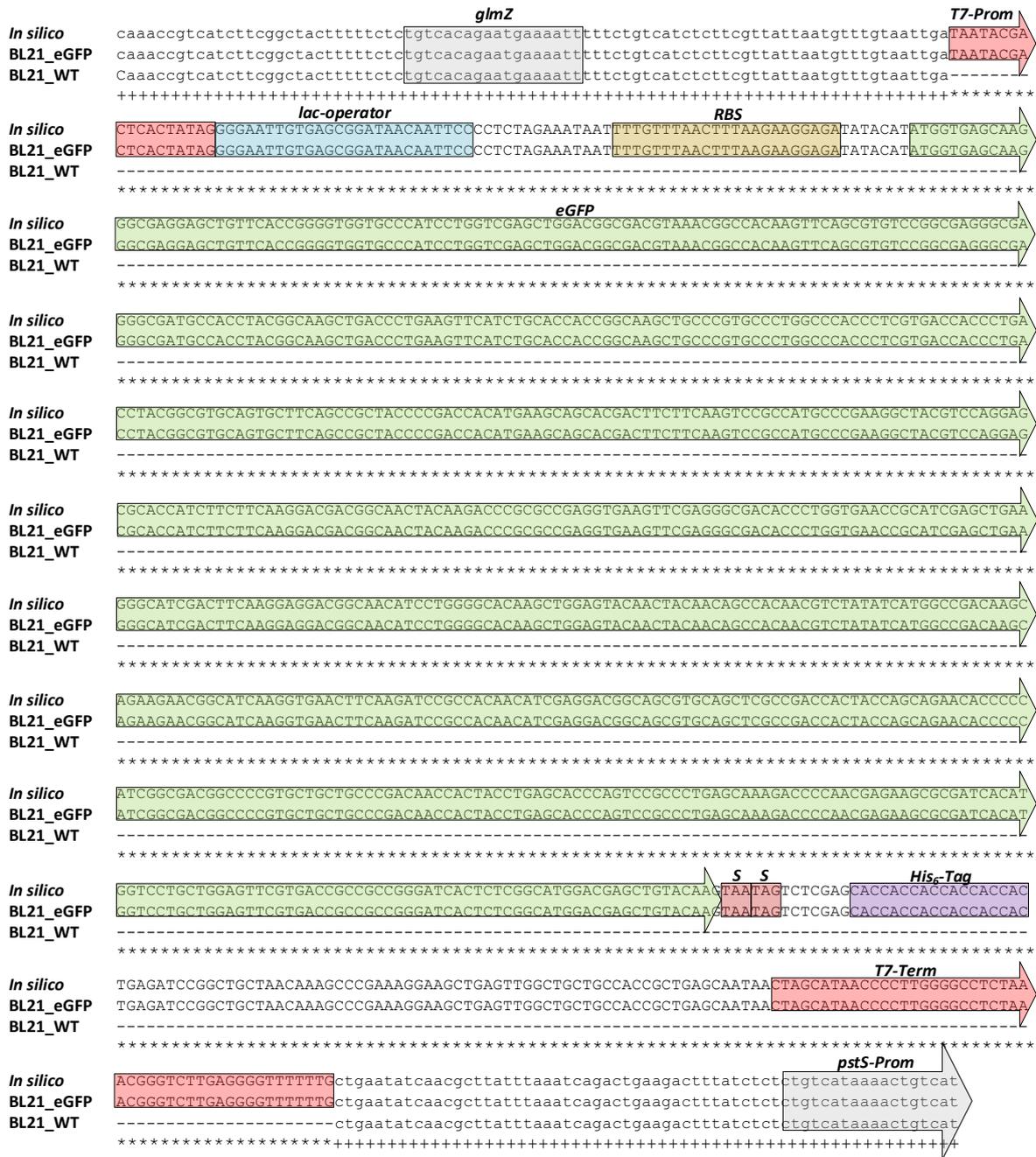


Abb. 44: Ausschnitt des “Alignments“ der *glmS*→*pstS*-Gensequenzen von *E. coli* BL21(DE3)str^R_eGFP und DE3) nach MAFFT-Algorithmus; Dargestellt ist die Sequenzregion von BL21(DE3) (BL21_WT) und BL21(DE3)str^R_eGFP (BL21_eGFP). Es wurde der MAFFT-Algorithmus verwendet, welcher die Sequenzen auf Basis der Nukleotidsequenz annealt. Zusätzlich wurde ein *in silico* rekombiniertes BL21(DE3)str^R_eGFP-Konstrukt in das “Annealing“ mitaufgenommen. Die Großbuchstaben verdeutlicht die Genregion, in welcher die Genkassette ins Genom integriert ist. Zudem sind die Gene in Form von Pfeilen visualisiert dargestellt. Das + symbolisiert, dass drei Basen an diesem Punkt identisch sind, dass * hingegen das lediglich zwei identisch sind.