

Philipps



Universität

Marburg

**Charakterisierung der DNA-Replikation beider
Chromosomen von *Vibrio cholerae* durch Methoden der
Genomik und synthetischen Biologie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Franziska S. Kemter
aus Pirna

Marburg, November 2018

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



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

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

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2014 bis November 2018 am LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie in Marburg unter Leitung von Prof. Dr. T. Waldminghaus durchgeführt.

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

Erstgutachter: Prof. Dr. T. Waldminghaus

Zweitgutachter: Prof. Dr. M. Thanbichler

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2018

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sind in folgenden Originalpublikationen enthalten:

Kemter FS, Messerschmidt SJ, Schallopp N, Sobetzko P, Lang E, Bunk B, Spröer C, Teschler JK, Yildiz FH, Overmann J, Waldminghaus T. **Synchronous termination of replication of the two chromosomes is an evolutionary selected feature in Vibrionaceae.** PLoS Genet. 2018 Mar 5;14(3):e1007251. doi: 10.1371/journal.pgen.1007251. eCollection 2018 Mar. PMID: 29505558

Kemter FS, Schallopp N, Sperlea T, Serrania J., Sobetzko P, Fritz G, Waldminghaus T. **Stringent response leads to continued cell division and a temporal re-start of DNA replication after initial shutdown in *Vibrio cholerae*.** *In Revision*

Messerschmidt SJ, Schindler D, Zumkeller CM, **Kemter FS**, Schallopp N, Waldminghaus T. **Optimization and Characterization of the Synthetic Secondary Chromosome synVicII in *Escherichia coli*.** Front BioengBiotechnol. 2016 Dec 23;4:96. doi: 10.3389/fbioe.2016.00096. eCollection 2016. PMID: 28066763

Schallop N*, Milbredt S*, Sperlea T*, **Kemter FS***, Bruhn M, Schindler D, Waldminghaus T. **Establishing a System for Testing Replication Inhibition of the *Vibrio cholerae* Secondary Chromosome in *Escherichia coli*.** Antibiotics (Basel). 2017 Dec 23;7(1). pii: E3. doi: 10.3390/antibiotics7010003. PMID: 29295515

Bruhn M, Schindler D, **Kemter FS**, Wiley MR, Chase K, Koroleva GI, Palacios G, Sozhamannan S, Waldminghaus T. **Functionality of Two Origins of Replication in *Vibrio cholerae* Strains with a Single Chromosome.** Front Microbiol. 2018 Nov 30;9:2932. doi: 10.3389/fmicb.2018.02932. eCollection 2018. PMID: 30559732

1. Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 2. | Abkürzungsverzeichnis..... | 7 |
| 3. | Einleitung..... | 8 |
| 3.1 | Die Familie der Vibrionaceae | 8 |
| 3.2 | DNA-Replikation in Bakterien | 8 |
| 3.2.1 | DNA-Replikation in Bakterien mit einteiligen Genomen am Beispiel von <i>Escherichia coli</i> | 9 |
| 3.2.2 | DNA-Replikation in Bakterien mit mehrteiligen Genomen am Beispiel von <i>Vibrio cholerae</i> | 11 |
| 3.3 | Anpassung des bakteriellen Wachstums an Umweltbedingungen..... | 13 |
| 3.3.1 | Überlappende DNA-Replikation..... | 13 |
| 3.3.2 | Die Stringent Response | 15 |
| 3.4 | Methoden zur Untersuchung von DNA-Replikation | 17 |
| 3.4.1 | Durchflusszytometrie | 18 |
| 3.4.2 | Markerfrequenzanalysen | 19 |
| 3.4.3 | Synthetische Chromosomen als Werkzeug am Beispiel von synVicII | 23 |
| 4. | Zielsetzung der Arbeit | 26 |
| 5. | Ergebnisse..... | 27 |
| 5.1 | Synchronous termination of replication of the two chromosomes is an evolutionary selected feature in Vibrionaceae..... | 28 |
| 5.2 | Stringent response leads to continued cell division and a temporal re-start of DNA replication after initial shutdown in <i>Vibrio cholerae</i> | 31 |
| 5.3 | Optimization and Characterization of the Synthetic Secondary Chromosome synVicII in <i>Escherichia coli</i> | 34 |
| 5.4 | Establishing a System for Testing Replication Inhibition of the <i>Vibrio cholerae</i> Secondary Chromosome in <i>Escherichia coli</i> | 36 |
| 5.5 | Functionality of Two Origins of Replication in <i>Vibrio cholerae</i> Strains with a Single Chromosome..... | 39 |

| | | |
|-------|--|----|
| 6. | Diskussion..... | 41 |
| 6.1 | Die Regulation der Initiation der DNA-Replikation an <i>ori2</i> | 41 |
| 6.1.1 | Die Regulation der Initiation der DNA-Replikation an <i>ori2</i> in Vibrionaceae | 41 |
| 6.1.2 | Die Regulation der Initiation der DNA-Replikation an <i>ori2</i> in <i>E. coli</i> | 45 |
| 6.2 | Systeme zur Untersuchung der DNA-Replikation von <i>V. cholerae</i> im Vergleich..... | 46 |
| 6.3 | Fazit..... | 50 |
| 7. | Zusammenfassung | 51 |
| 8. | Summary..... | 52 |
| 9. | Literaturverzeichnis | 53 |
| 10. | Erklärung der selbständigen Erarbeitung der Dissertation | 68 |

2. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| AB | Minimalmedium |
| Bp | Basenpaare |
| CAA | Casaminosäuren |
| CGH | komparative genomische Hybridisierung |
| Chr | Chromosom |
| <i>crtS</i> | <i>chr2 replication triggering site</i> |
| DARS | <i>DnaA reactivating sequence</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxynukleosintriphosphate |
| DUE | <i>DNA unwinding element</i> |
| FRET | Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer |
| Fruc | Fructose |
| Glu | Glucose |
| Glyc | Glycerin |
| HLP | <i>histone-like protein</i> |
| Kbp | Kilobasenpaare |
| LB | Komplexmedium (<i>lysogeny broth</i>) |
| Mbp | Megabasenpaare |
| MFA | Markerfrequenzanalyse |
| MoClo | <i>Modular Cloning System</i> |
| NDP (A/G/T/C) | Nukleosin-Diphosphat (Adenosin-/Guanosin-/Thymidin-/Cytidin-) |
| NGS | <i>Next Generation Sequencing</i> |
| NTP (A/G/T/C) | Nukleosin-Triphosphat (Adenosin-/Guanosin-/Thymidin-/Cytidin-) |
| ORF | Offener Leserahmen |
| <i>ori</i> | Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>) |
| PCR/qPCR | Polymerase-Kettenreaktion/quantitative |
| RIDA | <i>regulatory inactivation of DnaA</i> |
| RNA (rRNA/tRNA) | Ribonukleinsäure (ribosomale/transfer) |
| RNA-Pol / RNAP | RNA-Polymerase |
| SHX | Serinhydroxamat |
| SR | Stringent Response |
| WT | Wildtyp |

3. Einleitung

3.1 Die Familie der Vibrionaceae

Vibrionaceae gehören zur Klasse der γ -Proteobakterien und kommen mit großer Häufigkeit in Salz- und Süßwasserhabitaten vor. Sie teilen sich in verschiedene Gattungen auf, unter anderem *Photobacterium*, *Aliivibrio* und *Vibrio* (Urbanczyk et al. 2007). Sie sind häufig in oder an anderen marinen Organismen wie Fisch, Korallen oder Muscheln zu finden und bilden Biofilme auf der Oberfläche von Zooplankton und Krebstieren (Heidelberg et al. 2002; Ortigosa et al. 1989). Verschiedene Vertreter der Vibrionaceae leben dank ihrer Fähigkeit zur Biolumineszenz als Symbionten in Lichtorganen von Fischen oder Tintenfischen (*A. fischeri*, *P. leiognathi*, *P. phosphoreum*, *A. logei*) (Fidopiastis et al. 1998). Andere sind pathogen für Fisch (*V. anguillarum*, *A. salmonicida*, *V. harveyi*), Korallen (*V. shilonii*, *V. coralliilyticus*), Garnelen (*V. harveyi*) oder den Menschen (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*) (Le Roux et al. 2015). Weitere tragen durch die Fähigkeit zur Stickstofffixierung (*V. natriegens* (Coyer et al. 1996)) oder Chitinabbau (Riemann and Azam 2002) zum Nährstoffkreislauf bei. Eine besonders interessante Eigenschaft der Vibrionaceae ist die Aufteilung ihres Genoms auf zwei Chromosomen (Okada et al. 2005). Während das primäre Chromosom (Chr1) in allen Spezies eine relativ konstante Größe aufweist, variiert die Größe des sekundären Chromosoms (Chr2) stark. Die meisten an essentiellen Stoffwechselwegen beteiligten Gene befinden sich auf Chr1, während auf Chr2 nur wenige essentielle Gene zu finden sind (Dryselius et al. 2008). *V. cholerae* ist einer der meistgenutzten Modellorganismen unter den Vibrionaceae. Wissenschaftliche Untersuchungen zur Verbreitung der Cholera reichen bis ins 19. Jahrhundert zurück (Snow 1849). Weitere Gründe für die Verwendung als Modellorganismus sind unter anderem das bereits beschriebene bichromosomale Genom, einfache Kultivierbarkeit unter Laborbedingungen, Biofilmbildung, natürliche Kompetenz sowie die genetische Modifizierbarkeit (Teschler et al. 2015; Meibom et al. 2005; De Souza Silva and Blokesch 2010; Dalia et al. 2014).

3.2 DNA-Replikation in Bakterien

Der bakterielle Zellzyklus lässt sich in drei Perioden aufteilen (Abbildung 3.1). Die B-Periode beginnt mit der Zellgeburt. Sie geht über in die C-Periode, welche die gesamte DNA-Replikation von Initiation bis Termination umfasst. Abschließend folgt die D-Periode, welche mit der Zellteilung endet (Cooper and Helmstetter 1968). Die DNA-Replikation wiederum besteht ebenfalls aus drei Phasen. Während der Initiation wird die DNA an einer bestimmten Region, dem

Replikationsursprung (*ori*, für *origin of replication*) aufgeschmolzen und die an der Replikation beteiligten Proteine rekrutiert (Bramhill and Kornberg 1988a). Während der Elongationsphase verläuft die DNA-Replikation, ausgehend vom Replikationsursprung, bidirektional an beiden Armen des zirkulären Chromosoms bis zur Terminusregion auf der dem Replikationsursprung gegenüberliegenden Seite des Chromosoms (Bird et al. 1972). Die Gesamtheit der Proteine an einer Replikationsgabel wird Replisom genannt. In der Terminationsphase treffen sich beide Replikationsgabeln und werden von der DNA gelöst. Eventuell auftretende Chromosomendimere oder Katenane (ineinander verknotete Chromosomen) werden getrennt, sodass die Chromosomen auf die zukünftigen Tochterzellen verteilt werden können (Ip et al. 2003). Im Folgenden wird die DNA-Replikation am Beispiel zweier verschiedener bakterieller Modellorganismen erläutert, wobei der Fokus auf die Initiation der DNA-Replikation gelegt wird.

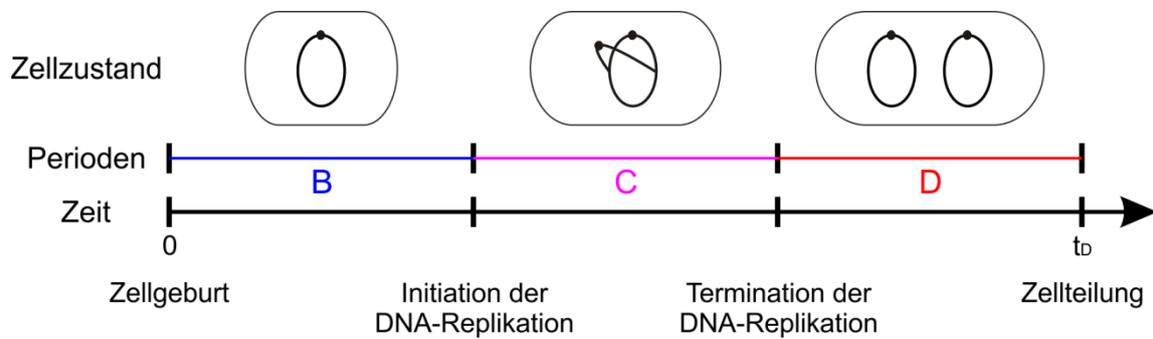


Abbildung 3.1: Die Perioden des bakteriellen Zellzyklus. Schematische Darstellung der B- C- und D-Perioden langsam wachsender Zellen, relativ zur Verdopplungszeit t_D , und des entsprechenden Replikationszustandes der Zelle. Schwarze Ovale repräsentieren Zellen, schwarze Ellipsen Chromosomen und schwarze Punkte Replikationsursprünge. Blaue Linien zeigen die B-Periode, violette und rote Linien jeweils die C- und D-Periode. Der schwarze Pfeil stellt die Zeitachse von Zellgeburt bis Zellteilung dar.

3.2.1 DNA-Replikation in Bakterien mit einteiligen Genomen am Beispiel von *Escherichia coli*

Die Initiation der DNA-Replikation an *oriC* in *Escherichia coli* erfolgt durch das Initiatorprotein DnaA, welches für die Strangöffnung und Replisomrekrutierung verantwortlich ist (Bramhill and Kornberg 1988b). DnaA ist eine ATPase, deren Bindeeigenschaften an DNA durch die Bindung von ATP oder ADP unterschiedlich beeinflusst wird. Während DnaA-ATP auch Bindestellen mit schwacher Affinität binden kann, ist DnaA-ADP nur zur Bindung an DnaA-Boxen mit hoher Affinität in der Lage (McGarry et al. 2004). Der Replikationsursprung in *E. coli*, *oriC*, enthält mehrere DnaA-Bindestellen mit hoher (DnaA- oder R-Boxen) und niedriger Affinität (I-, C- und τ -Boxen) (Fuller et al. 1984; Rozgaja et al. 2011; Kawakami et al. 2005). Zusätzlich befinden sich

in *oriC* jeweils eine Bindestelle für die HLPs (*histone-like protein*) IHF und Fis, mehrere GATC-Sequenzen zur Methylierung durch Dam, und eine AT-reiche Region, die sogenannte DUE (*duplex unwinding element* oder *DNA unwinding element*) (Abbildung 3.2). Während der Initiation bindet DnaA-ATP an die verschiedenen DnaA-Bindestellen in *oriC* und oligomerisiert entlang der DNA (Simmons et al. 2003). Durch diese erzeugte Struktur wird die DNA gebogen, sodass sie sich an der DUE entwindet. Die Bindung von DnaA an *oriC* wird zusätzlich durch Fis negativ und durch IHF und das HLP HU positiv beeinflusst (Gille et al. 1991; Cassler et al. 1995; Ryan et al. 2002, 2004; Chodavarapu et al. 2008). Zusätzlich ist eine Transkription der *oriC*-Region durch die RNA-Polymerase (RNA-Pol) zur Initiation notwendig (Ogawa et al. 1985). Nach der Strangöffnung wird die Helikase DnaB und ihr Ladeprotein DnaC an beide Stränge rekrutiert (Wahle et al. 1989; Sutton et al. 1998; Carr and Kaguni 2001). Die Initiation wird durch die Bindung von DiaA an DnaA zusätzlich positiv beeinflusst (Ishida et al. 2004; Keyamura et al. 2009). Die Einzelstränge werden durch SSB (*single strand binding protein*) stabilisiert (Krause and Messer 1999). Das durch die Entwindung des Doppelstrangs entstandene *supercoiling* wird durch die Gyrase gelöst (Orr et al. 1979). An DnaB bindet das Holoenzym DNA-Polymerase III (Kim et al. 1996). Nach vollständiger Rekrutierung der Replisomen startet die Elongationsphase der DNA-Replikation, wobei beide Replisomen voneinander unabhängig sind (Breier et al. 2005).

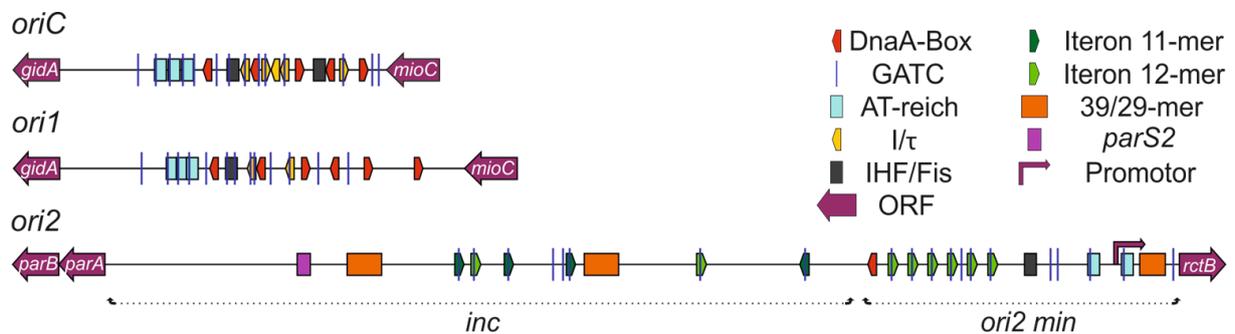


Abbildung 3.2: Aufbau der Replikationsursprünge von *E. coli* (*oriC*) und *V. cholerae* (*ori1* und *ori2*). Alle Elemente außer offenen Leserahmen (ORF) sind maßstabsgetreu eingezeichnet. DNA-Motive und Bindestellen sind wie in der Legende gezeigt gekennzeichnet.

Für eine stabile Vererbung des Genoms ist es von großer Bedeutung, dass *oriC* nur exakt einmal pro Zellzyklus initiiert (Skarstad and Løbner-Olesen 2003). Dies wird durch verschiedene Mechanismen gewährleistet. Eine davon ist die Sequestration hemimethylierter GATC durch SeqA (Lu et al. 1994). Da im Bereich von *oriC* mehrere DnaA-Boxen mit GATC-Sequenzen überlappen, kann DnaA nicht binden, solange die hemimethylierten GATC-Sequenzen von SeqA gebunden sind (Nievera et al. 2006; Chung et al. 2009). Nachdem die Vollmethylierung durch die Dam-Methylase wiederhergestellt wurde, wird die Sequestration durch SeqA aufgehoben, dies

dauert allerdings etwa ein Drittel der Generationszeit (Campbell and Kleckner 1990). Außerdem wird DnaA durch die Verdopplung verschiedener weiterer Bindestellen, hauptsächlich am *datA*-Lokus (*DnaA titration*), von *oriC* wegtitriert, sodass die dortige DnaA-Konzentration sinkt (Kitagawa et al. 1998). Als weiterer negativer Regulationsmechanismus bindet der DnaA-Regulator Hda an die DNA-Polymerase III und verstärkt die Hydrolyse von DnaA-ATP zu DnaA-ADP und somit die Inaktivierung von DnaA (RIDA, *regulatory inactivation of DnaA*) (Kato and Katayama 2001). Zudem bindet DnaA an seinen eigenen Promotor und inhibiert somit seine eigene Transkription (Atlung et al. 1985). Als positiver Regulationsmechanismus wird neues DnaA exprimiert und bindet ATP (Theisen et al. 1993). Zusätzlich zur DnaA-Neusynthese findet die Reaktivierung von DnaA an den Bindestellen DARS1 und 2 (*DnaA reactivating sequences*) statt (Fujimitsu et al. 2009). Diese binden DnaA-ADP und setzen ADP frei. Das ungebundene DnaA kann neues ATP binden und wird somit wieder aktiviert.

Die Initiation der DNA-Replikation erfolgt bei einer bestimmten Konzentration von DnaA-ATP. Diese korreliert mit einer bestimmten Zellmasse oder Zellvolumen pro *oriC*, der sogenannten Initiationsmasse oder Initiationsvolumen (Donachie 1968; Hill et al. 2012).

3.2.2 DNA-Replikation in Bakterien mit mehrteiligen Genomen am Beispiel von *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae besitzt, wie alle Vibrionaceae, zwei Chromosomen unterschiedlicher Größe (Trucksis et al. 1998). Es konnten jedoch auch monochromosomale Stämme mit fusionierten Chromosomen isoliert oder erzeugt werden (Xie et al. 2017; Val et al. 2012, 2014). Während *ori1* von Chr1 vergleichbar zu *oriC* von *E. coli* ist, unterscheidet sich *ori2* stark von diesem (Abbildung 3.2, (Egan and Waldor 2003)). Das Initiatorprotein von *ori2* ist RctB (Egan and Waldor 2003; Duigou et al. 2006). DnaA ist zwar durch eine essentielle DnaA-Box ebenfalls an der Initiation beteiligt, wird jedoch nicht zur Strangöffnung benötigt (Egan and Waldor 2003; Duigou et al. 2008). RctB zeigt strukturelle Ähnlichkeit zu Plasmidinitiatoren (Orlova et al. 2016; Jha et al. 2017). Auch der Aufbau von *ori2* ähnelt Plasmidreplikationsursprüngen, die Initiation von *ori2* erfolgt jedoch chromosomentypisch nur einmal pro Zellzyklus (Egan et al. 2004). RctB bindet an spezifische DNA-Sequenzen (Iterons), welche zur Bindung vollständig methyliert vorliegen müssen (Demarre and Chatteraj 2010). Somit ist die Methylase Dam für die Replikation von Chr2 essentiell, eine Deletion von *dam* ist ohne die Fusion beider Chromosomen letal (Val et al. 2014). SeqA, verantwortlich für die Sequestration hemimethylierter GATC-Sequenzen, ist in beiden Chromosomen essentiell zur Erhaltung der zellzyklusabhängigen Replikation (Demarre and Chatteraj 2010). Die Bindung von RctB an die Iterons in *ori2* hat verschiedene

Auswirkungen. Bindung im minimalen *ori2* führt zur Strangöffnung und Initiation, Bindung in der *inc*-Region zur Inhibierung der Initiation durch Titration und *handcuffing*. Bei Letzterem werden zwei Iterons durch ein Initiatorproteindimer miteinander verbunden und der Replikationsursprung somit sterisch inhibiert (Venkova-Canova and Chattoraj 2011). Die negative Regulation wird unterstützt durch die 39-mer, methylierungsunabhängige DNA-Bindestellen von RctB, welche vermutlich dessen Konformationsänderung von Mono- zu Dimeren verstärken (Venkova-Canova and Chattoraj 2011; Jha, Demarre, et al. 2012). Ein verkürztes 39-mer, das 29-mer, befindet sich im Promotor des *rctB*-Gens, *PrctB*, und führt zur Autorepression von RctB (Debasish Pal et al. 2005; Egan et al. 2006; Venkova-Canova et al. 2012). Auch das Segregationssystem von Chr2, bestehend aus den Proteinen ParAB2 und den DNA-Bindestellen *parS2*, ist an der Regulation der Initiation der DNA-Replikation an *ori2* beteiligt (Yamaichi, Fogel, and Waldor 2007; Yamaichi, Fogel, McLeod, et al. 2007). Eine von 10 *parS2* befindet sich in *ori2*, sodass Bindung von ParB2 die *inc*-Region blockiert. Außerdem bindet ParB2 unabhängig von ParA2 die 39-mer und blockiert sie somit für RctB (Yamaichi et al. 2011; Venkova-Canova et al. 2013).

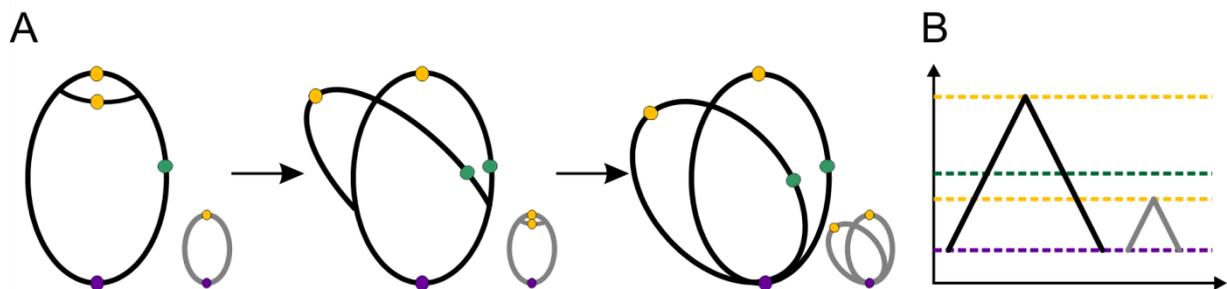


Abbildung 3.3: Replikationsschema von *V. cholerae*. (A) Zeitlicher Ablauf der DNA-Replikation beider Chromosomen. Chr1 ist in schwarz dargestellt, Chr2 in grau. Replikationsursprünge sind durch gelbe Punkte, Terminationsregionen durch violette Punkte und die *crtS* durch einen grünen Punkt gekennzeichnet. Gezeigt sind drei aufeinanderfolgende Replikationsschritte: Initiation an *ori1*, gefolgt von Initiation an *ori2* nach Replikation der *crtS* und anschließend gemeinsamer Termination beider Chromosomen. (B) Schematische Darstellung beider Chromosomen während des exponentiellen Wachstums mittels Markerfrequenzanalyse (MFA). Die Kopienzahl der Genomabschnitte ist logarithmisch auf der Y-Achse aufgetragen, die chromosomale Position auf der X-Achse. Chr1 ist in schwarz dargestellt, Chr2 in grau. Kopienzahlen von Replikationsursprüngen, *crtS* und Terminationsregionen sind durch gestrichelte Linien in gelb, grün oder violett (entsprechend (A)) markiert.

Die Initiation beider Chromosomen verläuft koordiniert, sodass Chr1 und Chr2 zur gleichen Zeit terminieren (Abbildung 3.3), was als Terminationssynchronie bezeichnet wird (Rasmussen et al. 2007). Kontrolliert wird diese Koordination durch die Position der *crtS* (*chr2 replication triggering site*) auf Chr1 und somit durch die Distanz der *crtS* zu *ori1* (Baek and Chattoraj 2014;

Val et al. 2016). Einige Zeit nach der Replikation der *crtS* folgt die Initiation von *ori2*, wobei hierfür die Kopienanzahl der *crtS* und nicht der Replikationsprozess an sich entscheidend ist (Ramachandran et al. 2018). Der genaue Mechanismus ist bislang nicht bekannt, es wird jedoch eine Bindung und Remodellierung von RctB durch *crtS* vermutet (Baek and Chatteraj 2014; Ramachandran et al. 2018). Zudem bindet der Transkriptionsfaktor Lrp an die *crtS* und erleichtert die Bindung von RctB (Ciaccia et al. 2018). Während die Replikation von Chr2 durch Chr1 kontrolliert wird, gibt es keinen Kontrollmechanismus der Replikation von Chr2 auf Chr1 (Yamaichi, Fogel, and Waldor 2007; Kadoya and Chatteraj 2012).

3.3 Anpassung des bakteriellen Wachstums an Umweltbedingungen

Verschiedene Umweltbedingungen können einen großen Einfluss auf das bakterielle Wachstum haben. Bei optimalen Werten von Nährstoffverfügbarkeit, Temperatur, Osmolarität, pH-Wert, sowie Verfügbarkeit von Oxidationsmitteln (z.B. Sauerstoff), ist die Wachstumsgeschwindigkeit am höchsten. Abweichungen dieser Werte vom Optimum lösen verschiedene Effekte aus, welche das Wachstum verlangsamen oder stoppen können. Im Folgenden werden zwei verschiedene Effekte erläutert, welche für diese Arbeit von Bedeutung sind.

3.3.1 Überlappende DNA-Replikation

Verschiedene Bakterien, wie *E. coli*, *V. cholerae*, *B. subtilis* oder *C. glutamicum*, sind bei guten Wachstumsbedingungen in der Lage, sich in einer kürzeren Zeit zu verdoppeln, als sie zur Replikation ihres Genoms benötigen (Cooper and Helmstetter 1968; Stokke et al. 2011; Quinn and Sueoka 1970; Böhm et al. 2017). Je besser die Wachstumsbedingungen sind, desto kürzer ist die Verdopplungszeit der Zellen. Um dies zu erreichen, muss die Initiation der DNA-Replikation stattfinden, bevor der vorherige Replikationszyklus abgeschlossen ist (Abbildung 3.4). Dieser Vorgang wird „überlappende DNA-Replikation“ genannt. Je besser die Wachstumsbedingungen sind, und dementsprechend je mehr die Verdopplungszeit verkürzt wird, desto mehr DNA-Replikationszyklen müssen überlappen. Somit liegen in der Zelle zum Zeitpunkt der Initiation der DNA-Replikation unter besseren Wachstumsbedingungen mehr teilweise replizierte Chromosomen, und somit Replikationsursprünge, vor, als unter schlechteren. Die Initiation der DNA-Replikation erfolgt an allen vorliegenden Replikationsursprüngen. In *E. coli* kann somit unter guten Wachstumsbedingungen an acht Replikationsursprüngen gleichzeitig initiiert werden (Abbildung 3.4A) (Stokke et al. 2012). *V. cholerae* initiiert unter denselben Bedingungen aufgrund der kürzeren C-Periode an vier *ori1* (Abbildung 3.4C) (Stokke et al. 2011).

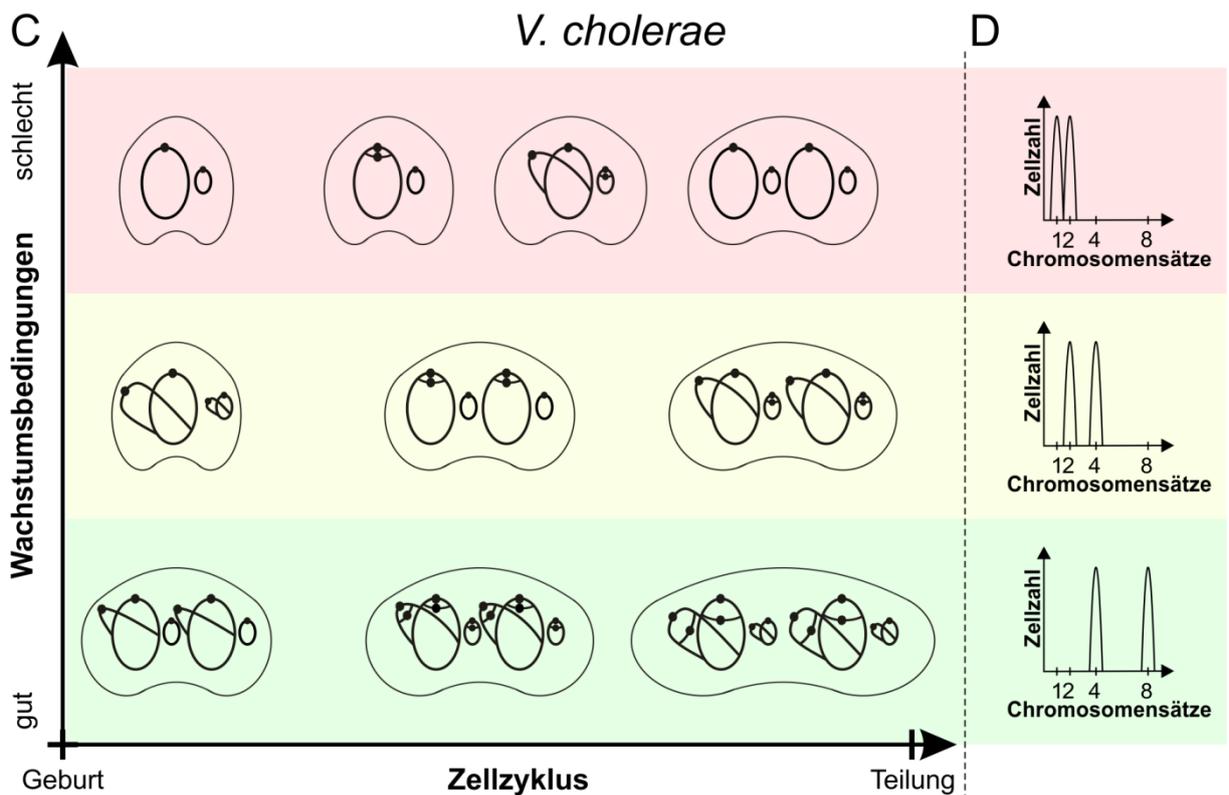
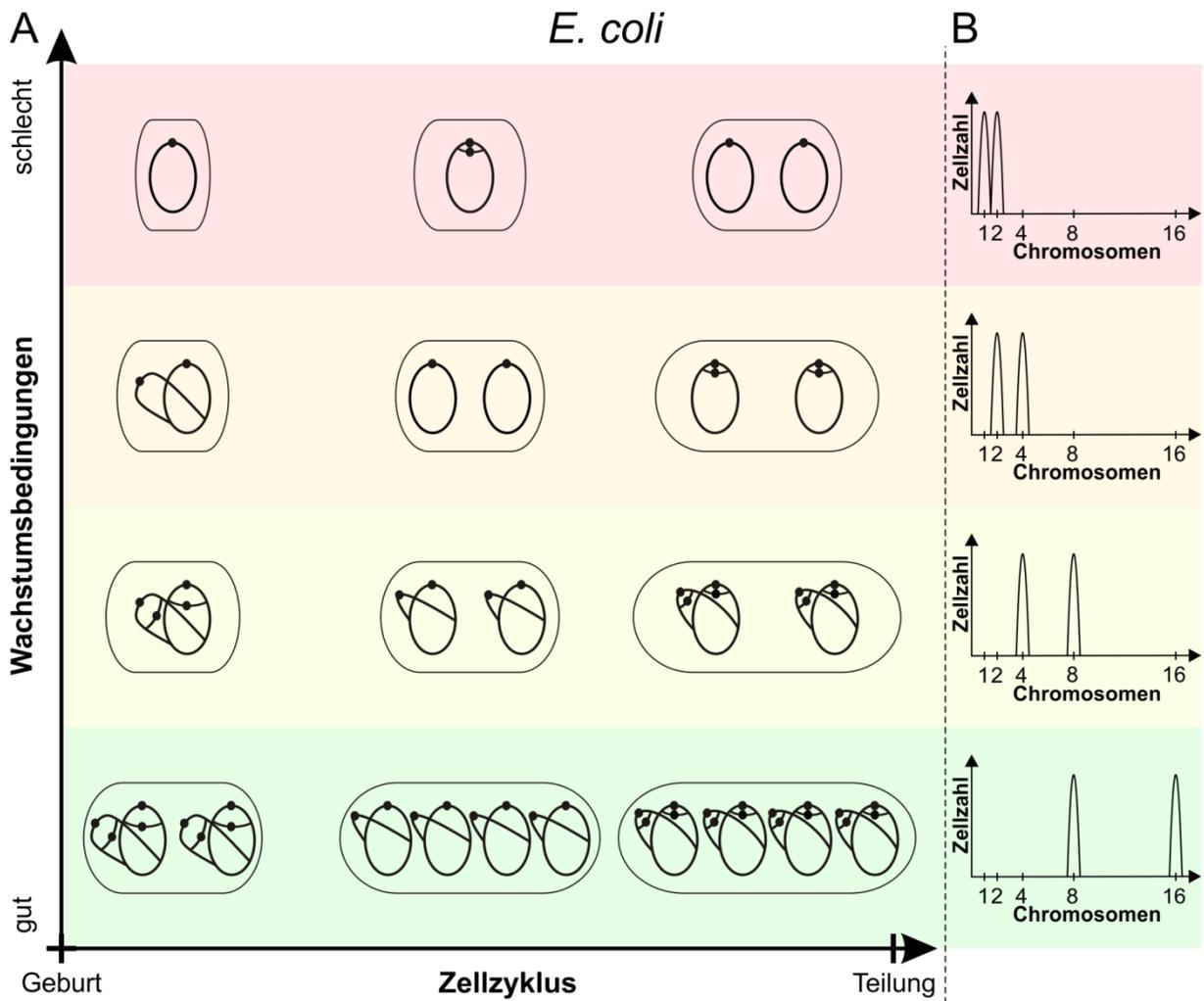


Abbildung 3.4: DNA-Replikation der Chromosomen von *E. coli* und *V. cholerae* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. (A, C) Schematische Darstellung des Replikationszustandes der Zelle unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Schwarze Ovale repräsentieren Zellen, schwarze Ellipsen Chromosomen und schwarze Punkte Replikationsursprünge. Auf der X-Achse ist der Zellzyklus von Zellgeburt bis Zellteilung aufgetragen, auf der Y-Achse und farblich unterlegt die Qualität der Wachstumsbedingungen von schlecht (rot) bis gut (grün). (B, D) Schematische Darstellung von Durchflusszytometrie-basierten DNA-Histogrammen von Zellen nach Behandlung mit Cephalexin und Rifampicin oder Chloramphenicol („Runout“) unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Auf der Y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen, auf der X-Achse der DNA-Gehalt in Chromosomen- oder Chromosomensatzäquivalenten. Die Qualität der Wachstumsbedingungen ist durch die farbliche Unterlegung (wie A, C) gekennzeichnet. Exemplarisch ist die Zellzahl bei jedem DNA-Gehalt gleich, obwohl dies nur bei Initiation der DNA-Replikation zu einem bestimmten Zeitpunkt im Zellzyklus der Fall ist. (A, C) *E. coli* (Stokke et al. 2012). (B, D) *V. cholerae* (Stokke et al. 2011).

3.3.2 Die Stringent Response

Die Stringent Response (SR) ist die bakterielle Stressreaktion auf Nährstoffmangel. Vermittelt wird sie durch die Alarmone Guanosin-bis-diphosphat und Guanosin-diphosphat-triphosphat, gemeinsam (p)ppGpp genannt (Cashel and Kalbacher 1970). In *E. coli* wird die Konzentration von (p)ppGpp durch RelA und SpoT reguliert. Während RelA eine starke (p)ppGpp-Synthase-Domäne und eine nicht-funktionelle Hydrolase-Domäne besitzt, verfügt SpoT über eine starke Hydrolase- und eine schwache Synthase-Funktion (Xiao et al. 1991; Laffler and Gallant 1974; Cashel and Gallant 1969). RelA ist an das Ribosom assoziiert und detektiert Aminosäuremangel (Agirrezabala et al. 2013). Die Synthese von (p)ppGpp bei Aminosäuremangel erfolgt nach der Bindung unbeladener tRNAs in der A-Stelle des Ribosoms (Haseltine and Block 1973; Haseltine et al. 1972). RelA wird durch (p)ppGpp selbst positiv reguliert (Shyp et al. 2012). Die Synthese von (p)ppGpp bei Fettsäure-, Eisen- oder Kohlenstoffmangel ist abhängig von SpoT (Seyfzadeh et al. 1993; Vinella et al. 2005; Murray and Bremer 1996). SpoT wird während Fettsäuremangels durch das Acylcarrierprotein ACP und während exponentiellen Wachstums durch die GTPase CgtA reguliert (Battesti and Bouveret 2006; Wout et al. 2004; Raskin et al. 2007). *V. cholerae* verfügt zusätzlich über die kurze (p)ppGpp-Synthase RelV, welche keine Hydrolase-Domäne besitzt und ergänzend zu SpoT die Konzentration von (p)ppGpp unter Kohlenstoff- oder Fettsäuremangel steuert (Das et al. 2009) (Abbildung 3.5). Andere Bakterien, wie beispielsweise *B. subtilis*, verfügen über nur ein RelA/SpoT-Homolog mit Synthase- und Hydrolase-Domäne und zusätzlich über kurze Synthesen und/oder Hydrolasen (Nanamiya et al. 2007).

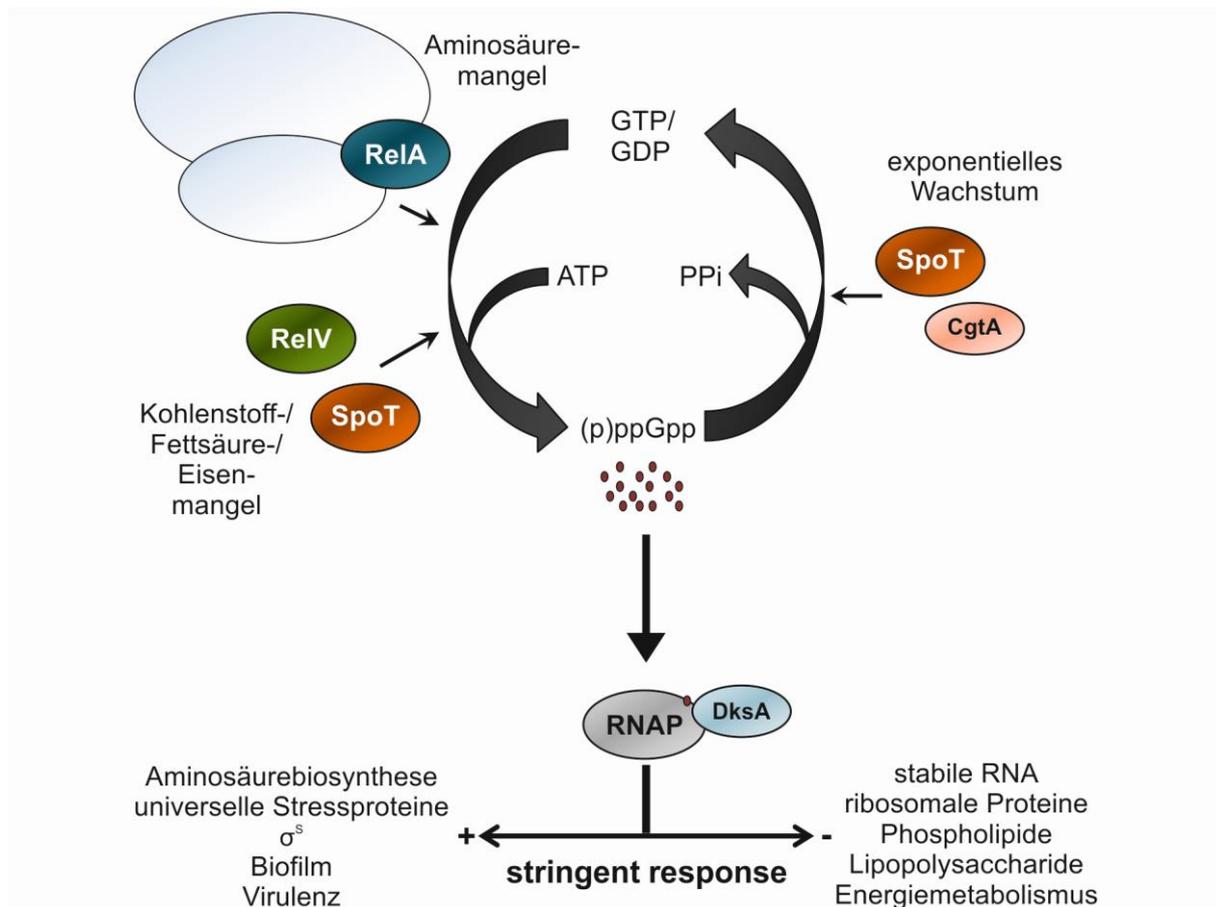


Abbildung 3.5: Schematischer Ablauf der Stringent Response in *V. cholerae*. Das Alarmon (p)ppGpp (rote Punkte) wird unter verschiedenen Nährstoffmangelbedingungen durch RelA, RelV und SpoT (bunte Ellipsen) aus GTP, GDP und ATP synthetisiert. RelA ist an das Ribosom (hellblau) assoziiert. Unter Normalbedingungen wird (p)ppGpp wieder von SpoT mit Assistenz von CgtA zu GTP oder GDP und Pyrophosphat hydrolysiert. Gemeinsam mit DksA bindet (p)ppGpp an die RNA-Polymerase (RNAP) und vermittelt die Hoch- oder Herunterregulation der Expression verschiedenster Gene.

Die Erhöhung der intrazellulären Konzentration von (p)ppGpp in *E. coli* führt zu einer Vielzahl von Effekten. Durch Bindung von (p)ppGpp an die RNA-Polymerase wird die Transkription verschiedener Gene beeinflusst (Durfee et al. 2008; Traxler et al. 2008). Einen großen Einfluss auf die Regulation der Transkription während der SR hat der nicht-DNA-bindende Transkriptionsfaktor DksA. Durch Bindung von DksA an die RNA-Polymerase wird eine zusätzliche Bindestelle für (p)ppGpp erzeugt (Ross et al. 2016). Verschiedene Effekte von (p)ppGpp auf die Transkription sind nur mit DksA möglich (Brown et al. 2002; Paul et al. 2004, 2005). Um durch die Verminderung energieaufwändiger Prozesse Ressourcen und Energie zu sparen, wird während der SR beispielsweise die Transkription ribosomaler Proteine und stabiler RNAs (rRNA und tRNA) verringert (Stent and Brenner 1961; Traxler et al. 2008; Durfee et al. 2008). Zusätzlich wird die Synthese von Phospholipiden inhibiert und somit das Zellwachstum

blockiert (Heath et al. 1994; My et al. 2013). Die Synthese von Flagellen wird ebenfalls inhibiert (Lemke et al. 2009). Die Translation wird durch Bindung von (p)ppGpp an die Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu sowie den Initiationsfaktor IF gehemmt (Mitkevich et al. 2010; Rojas et al. 1984). Auch die DNA-Replikation wird, je nach Organismus unterschiedlich, durch die SR beeinflusst. In *E. coli* wird die Elongation der DNA-Replikation schwach, aber signifikant verlangsamt (DeNapoli et al. 2013). Die Initiation der DNA-Replikation hingegen wird blockiert (Levine et al. 1991; Ferullo and Lovett 2008). Neben den Energiesparmechanismen werden die Aminosäurebiosynthese sowie die σ^S -abhängige generelle Stressantwort, sonst aktiv in der stationären Phase, hochreguliert, um den Nährstoffmangel auszugleichen (Traxler et al. 2008; Durfee et al. 2008; Gentry et al. 1993). In pathogenen Organismen wie *V. cholerae* wird die Virulenz durch die SR beeinflusst (Haralalka et al. 2003; Ritesh Ranjan Pal et al. 2012; Oh et al. 2014). Außerdem wird in *V. cholerae* die Produktion von Biofilm durch die SR und σ^S positiv reguliert (He et al. 2012). (p)ppGpp wird in *E. coli* ebenfalls für die Regulation von Genen in der stationären Phase benötigt (Kvint et al. 2000). In *B. subtilis* erfolgt die SR in großen Teilen über die Senkung der intrazellulären GTP-Konzentration durch die Produktion von (p)ppGpp (Kriel et al. 2012). Die DNA-Replikation wird hier in der Elongationsphase durch Inhibierung der DNA-Primase DnaG durch (p)ppGpp gehemmt, unabhängig von der Position der Replikationsgabeln auf dem Chromosom (Wang et al. 2007; DeNapoli et al. 2013). Außerdem besteht eine Verbindung zwischen der SR und bakterieller Persistenz (Korch et al. 2003). Persistente Zellen sind metabolisch inaktiv und während dieser Zeit resistent gegen eine Vielzahl an Antibiotika, was medizinisch relevant ist (Bigger 1944). Erhöhte Konzentrationen von (p)ppGpp führen zu einer Reduzierung der metabolischen Aktivität und sind zum Teil beteiligt an der Toleranz verschiedener Antibiotika während der Persistenz (Liu et al. 2017).

Zur Untersuchung der SR wird diese häufig mit Serinhydroxamat (SHX) induziert. Dieses Serinanalogue inhibiert die Seryl-tRNA-Synthetasen und verursacht somit die RelA-abhängige Detektion unbeladener Seryl-tRNAs im Ribosom (Tosa and Pizer 1971b, 1971a).

3.4 Methoden zur Untersuchung von DNA-Replikation

Es gibt verschiedene Methoden zur Untersuchung der DNA-Replikation, wobei jeder dieser Methoden einen anderen Ansatz hat. Beispielsweise lässt sich per Durchflusszytometrie der DNA-Gehalt von Zellen in hohem Durchsatz messen (Steen et al. 1986). Mittels Markerfrequenzanalyse lassen sich die durchschnittlichen Kopienanzahlen verschiedener Genomabschnitte, sogenannter Marker, bestimmen (Sueoka and Yoshikawa 1965). Minichromosomen können zur Analyse der Funktionsfähigkeit von Replikationsursprüngen verwendet werden (Hiraga 1976). Unter Einsatz

von Fluoreszenzproteinen kann durch Mikroskopie sowohl Kopienanzahl als auch Position bestimmter Marker in Einzelzellen bestimmt werden (Milbredt and Waldminghaus 2017). Im Folgenden werden die ersten drei Methoden näher erläutert.

3.4.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse einer großen Anzahl von einzelnen Zellen einer Probe. Hierbei werden optimalerweise bis zu 1000 Zellen pro Sekunde in einem dünnen Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen Laserstrahl geleitet (Abbildung 3.6A). Die Ablenkung des Lichts durch die einzelnen Zellen wird detektiert und gibt Aufschluss über die Zellgröße und andere Charakteristiken. Zusätzlich kann bei der Verwendung verschiedener Farbstoffe oder Fluoreszenzproteine die Stärke des entsprechenden Fluoreszenzsignals der Einzelzellen bestimmt und somit Rückschlüsse auf den Gehalt des gefärbten Zellbestandteils oder Fluoreszenzproteins gezogen werden. Die Anzahl der gemessenen Zellen für jede Signalstärke kann in einem Histogramm aufgetragen werden (Abbildung 3.6B). So kann beispielsweise der Proteingehalt der Bakterienzelle, und somit ihre Größe, mittels des Farbstoffs FITC bestimmt werden. Um den DNA-Gehalt zu messen, werden in dieser Arbeit die Farbstoffe Hoechst 33258 oder SYTOX Green verwendet. Um alle zellulären Prozesse, welche die Analyse verfälschen könnten, zu stoppen, werden bakterielle Zellen in der Regel nach der Probenentnahme fixiert. Je nach Untersuchungsziel sind allerdings auch Messungen mit lebendigen Zellen möglich. Während des exponentiellen Wachstums enthalten bakterielle Zellen einer asynchron wachsenden Kultur Chromosomen in verschiedenen Abschnitten der DNA-Replikation. Dies führt im DNA-Histogramm einer durchflusszytometrischen Messung zu einem breiten Peak von Zellen mit einer großen Variabilität des DNA-Gehalts. Genauere Zellzyklusanalysen mit solchen Proben sind möglich, werden aber selten durchgeführt (Stokke et al. 2011, 2012). Eine einfachere Methode zur Bestimmung der Anzahl der zum Zeitpunkt der Probenentnahme enthaltenen Replikationsursprünge basiert darauf, dass die Inhibition der RNA- und Protein-Biosynthese die Initiation, jedoch nicht die Elongation der DNA-Replikation stoppt (Maaløe and Hanawalt 1961). Somit führt eine Behandlung der Zellen mit Rifampicin oder Chloramphenicol dazu, dass bereits initiierte DNA-Replikation normal beendet wird, jedoch keine weitere Initiation stattfindet (Skarstad et al. 1986). Die Zellteilung kann durch die Behandlung mit Cephalexin unterbunden werden (Løbner-Olesen et al. 1989). Somit enthalten die Zellen der Probe soviele vollständig replizierte Chromosomen, wie zum Zeitpunkt der Probenentnahme Replikationsursprünge in der Zelle vorhanden waren (Abbildung 3.4B und D). Diese „Runout“ genannte Art der Behandlung wurde für *E. coli* etabliert. Für *V. cholerae* funktioniert sie nur für *ori1*. *Ori2* scheint trotz der

Inhibierung der Protein-Biosynthese initiieren zu können, folgt aber dank der Koordination der DNA-Replikation beider Chromosomen der Kopienanzahl von *oriI* (Egan et al. 2004; Rasmussen et al. 2007).

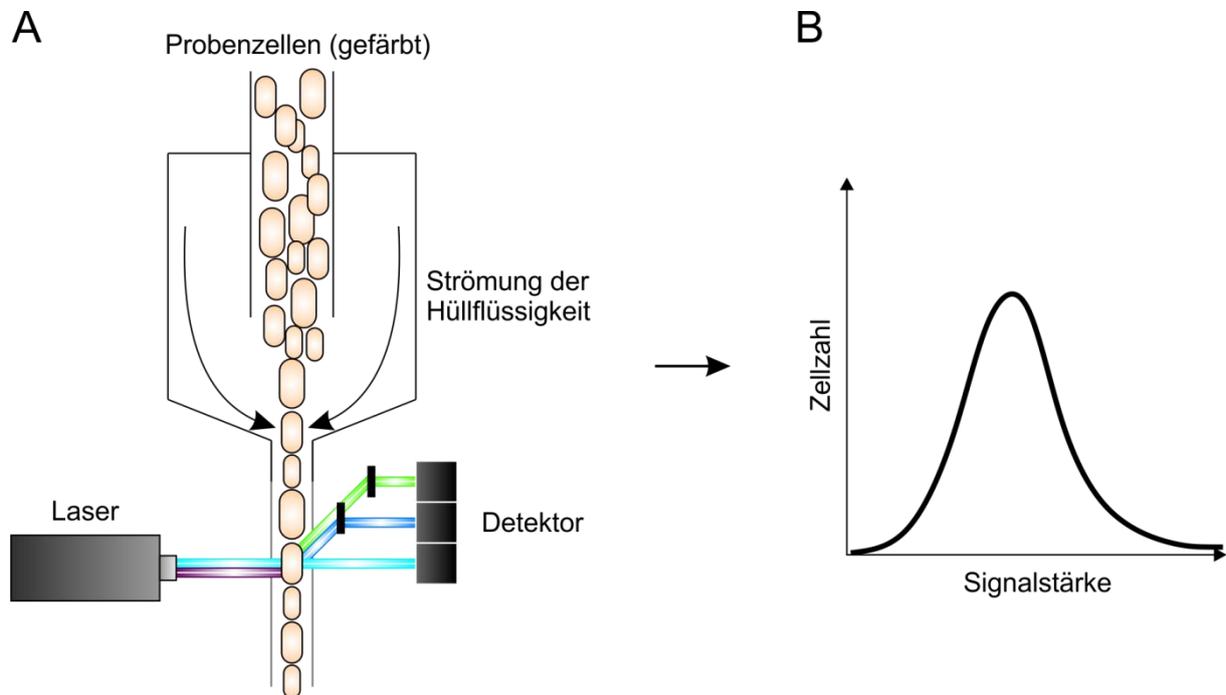


Abbildung 3.6: Funktion eines Durchflusszytometers. (A) Zellen einer Probe (gelb gefärbte Ovale) werden im Durchflusszytometer durch den Strom einer Hüllflüssigkeit (schwarze Pfeile) vereinzelt. Die Zellen werden in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl (graue Linien) durch den Lichtstrahl eines oder mehrerer Laser (Kasten links, blaue und violette Strahlen) geleitet. Die Bestimmung der Zellgröße erfolgt durch Messung der Streuung des Lichtstrahls (hellblauer Strahl), die Bestimmung der Fluoreszenzintensität durch die Detektion der Emission des absorbierten Lichts durch die Zelle (dunkelblauer oder grüner Strahl). Die Messung erfolgt über Detektoren (Kästen rechts). (B) Exemplarisches Histogramm der gemessenen Signalstärke. Gezeigt wird, wie viele Zellen eine bestimmte Signalstärke aufweisen.

3.4.2 Markerfrequenzanalysen

Die Bestimmung der Kopienanzahl bestimmter genomischer Bereiche im Vergleich zueinander wird Markerfrequenzanalyse (MFA) genannt. Die einzelnen untersuchten Bereiche werden als Marker bezeichnet. Zur Untersuchung der DNA-Replikation wird sich hierbei zunutze gemacht, dass in exponentiell wachsenden Zellen die Bereiche des Genoms, die früher im Replikationszyklus dupliziert werden, wie beispielsweise der Replikationsursprung, eine höhere Kopienanzahl haben als die Bereiche, die später repliziert werden, wie beispielsweise die Terminusregion. Eine exemplarische Darstellung einer Markerfrequenzanalyse von exponentiell wachsenden *V. cholerae* ist in Abbildung 3.3B gezeigt. Durch die spätere Initiation der DNA-

Replikation an Chr2 hat *ori2* eine geringere Kopienanzahl als *ori1* und die *crtS*. Die Terminusbereiche beider Chromosomen haben aufgrund der Terminationssynchronie hingegen die gleiche Kopienanzahl.

Eine MFA kann mit verschiedenen Techniken durchgeführt werden. Mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wird in der Regel eine geringe Anzahl an Markern einzeln untersucht (Abbildung 3.7A). Hierbei wird die Kopienanzahl der untersuchten Marker durch die Amplifikation während der PCR bestimmt. Je mehr Amplifikationszyklen benötigt werden, um einen festgelegten Grenzwert (CT-Wert) zu überschreiten, desto geringer war die Kopienanzahl des Markers. Die Detektion der DNA-Menge nach jedem Zyklus kann mit dem Farbstoff SYBR Green oder einer TaqMan-Sonde erfolgen (Ponchel et al. 2003; Holland et al. 1991). Um etwaige Fehler durch unterschiedliche Amplifikationseffizienzen auszugleichen, wird die Kopienanzahl jedes Markers relativ zu einer Referenzprobe bestimmt. Als Referenz dient meist DNA von stationären oder Runout-Zellen des Probenstammes, da hier jeder untersuchte Marker in gleicher Kopienanzahl vorliegt. Ergebnisse der qPCR werden in der Regel als Ratio zweier untersuchter Marker dargestellt. Häufig untersucht werden die *ori/ter*-Ratio oder *ori2/ori1* beziehungsweise *ter2/ter1*.

Mittels Microarray-basierter vergleichender (*comparative*) genomischer Hybridisierung (CGH) kann eine sehr große Anzahl an Markern eines Genoms in einem Ansatz untersucht werden (Pinkel et al. 1998) (Abbildung 3.7B). Auf den Microarray werden zu jedem zu untersuchenden Marker komplementäre synthetische Sonden mit einer Länge von 50 Bp aufgedruckt. Je nach Microarray können bis zu 1.000.000 verschiedene Sonden verwendet werden (Stand 2018, SurePrint G3 Custom CGH Microarray 1x1M, Agilent), sodass ein Genom vollständig abgedeckt werden kann. Zur Markerfrequenzanalyse wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte DNA an die Sonden hybridisiert und die Stärke des Fluoreszenzsignals und somit die Menge der gebundenen Marker detektiert. Wie bei der qPCR wird die Kopienanzahl jedes Markers relativ zu einer Referenzprobe bestimmt, um Schwankungen in der Hybridisierungseffizienz zu normalisieren. Die relative Kopienanzahl eines jeden Markers kann gegen seine Genomposition aufgetragen werden, um den Verlauf der Markerfrequenz über das Genom zu erhalten. So können die Kopienanzahlen der einzelnen Marker miteinander verglichen werden, um Marker mit starker Abweichung von ihrer Umgebung auszuschließen und mittels Ausgleichsgeraden die mittlere Kopienanzahl jeden Markers sowie die Genomposition mit der maximalen und minimalen Kopienanzahl zu erhalten. Da per CGH keine absoluten Kopienanzahlen bestimmt werden können, wird der Marker mit der minimalen Kopienanzahl (*ter*) gleich 1, beziehungsweise in der logarithmischen Darstellung gleich 0, gesetzt und die Kopienanzahlen aller anderen Marker daran angeglichen.

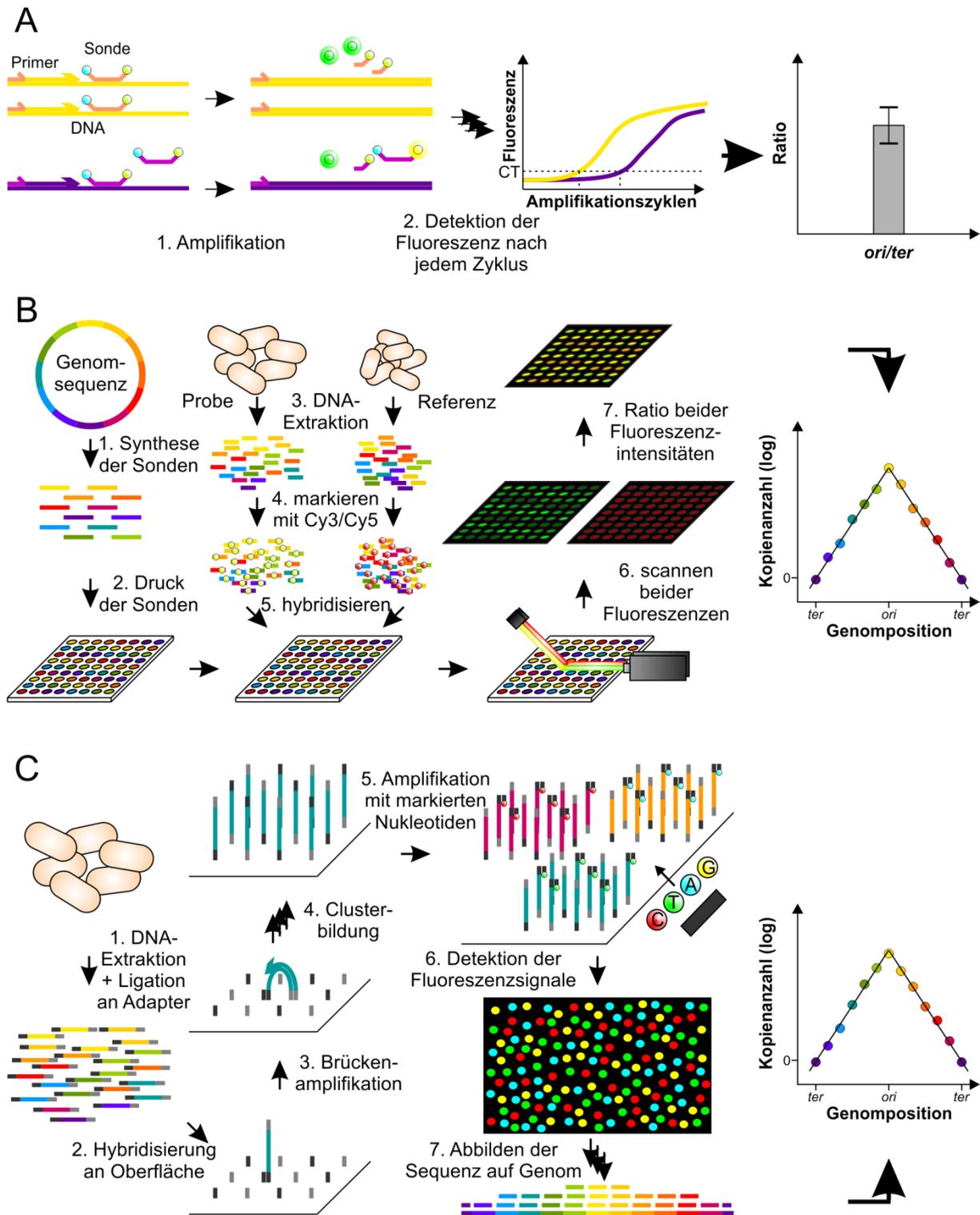


Abbildung 3.7: Verschiedene Methoden zur Markerfrequenzanalyse. (A) Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) mit TaqMan-Sonden. DNA des zu untersuchenden Markers (hier *ori* und *ter*, gelbe und violette Linien) wird unter Zugabe von Primern und fluoreszenzmarkierten Sonden (orange und violett) per PCR amplifiziert, wobei die an die DNA gebundene Sonde durch die DNA-Polymerase zerstört wird (1). Der Signalfluorophor (blauer Kreis, grüner Halo) wird angeregt und die Emission detektiert. Ist die Sonde zerstört, kann die Emission des Signalfluorophors (grüner Halo) detektiert werden. Sind beide Fluorophore durch die intakte Sonde in räumlicher Nähe, wird durch FRET

(Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer) der Quencherfluorophor (grüner Kreis, gelber Halo) angeregt und der Signalfuorophor (blauer Kreis) gedämpft (2). Die Fluoreszenzwerte werden nach jedem Amplifikationszyklus aufgetragen (gelbe und violette Kurven) und die Zahl der Zyklen beim Erreichen des CT-Werts (gestrichelte Linie) und somit die ursprünglich enthaltene DNA-Menge bestimmt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Ratio zweier Marker mit Mittelwert und Standardabweichung aus mehreren biologischen Replikaten. **(B)** Microarraybasierte komparative genomische Hybridisierung (CGH). Anhand einer bekannten Genomsequenz werden Marker (regenbogenfarben, *ori*-Region gelb, *ter*-Region violett) ausgewählt und komplementäre einzelsträngige DNA-Sonden von 50 Basen synthetisiert (1). Diese Sonden werden an definierten Punkten auf eine Glasoberfläche (bunte Punkte auf weißer Fläche) gebunden (2). Aus Zellen (gelb gefärbte Ovale) von Probe und Referenz wird DNA extrahiert und fragmentiert (kurze bunte Linien, 3). Diese wird mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden amplifiziert, wobei die Proben-DNA mit Cy3 (grüne Kreise) und die Referenz-DNA mit Cy5 (rote Kreise) markiert wird (4). Die DNA wird anschließend an die auf die Glasoberfläche gebundenen Sonden hybridisiert (5). Die Farbstoffe werden durch Laserlicht (Kästen rechts, grüne und rote Strahlen) angeregt und die Emission detektiert (Kästen links, gelbe und rote Strahlen, 6). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten (grüne und rote Punkte) der jeweiligen Sonden werden miteinander verrechnet, um die Ratio der Fluoreszenzintensitäten (grüne, gelbe und rote Punkte) und somit die relative Kopienanzahl des Markers zu erhalten (7). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in einem Plot der Markerkopienanzahlen gegen ihre Genomposition, wobei der Logarithmus der Kopienanzahlen verwendet wird, um Ausgleichsgeraden berechnen zu können. **(C)** *Next-Generation-Sequencing* (NGS) nach Illumina. Aus Zellen (gelb gefärbte Ovale) wird DNA extrahiert (bunte Linien) und an kurze Adaptersequenzen (kurze hell- und dunkelgraue Linien) ligiert (1). Die einzelsträngige DNA (exemplarisch grüne Linie) wird auf eine Glasoberfläche (weiße Fläche) hybridisiert, auf der zu den Adaptersequenzen homologe DNA-Fragmente (kurze hell- und dunkelgraue Linien) gebunden sind (2). Nach Zugabe von dNTPs und Polymerase wird die DNA per Brückenamplifikation vervielfältigt, wobei die gebundenen Adapterhomologe als Primer dienen (3). Nach mehreren Amplifikationsrunden entstehen Gruppen einzelsträngiger DNA-Fragmente gleicher und komplementärer Sequenz (4). Unter Zugabe fluoreszenzmarkierter Nukleotide (gelbe, blaue, grüne und rote Kreise) und zu einer der Adaptersequenzen homologen Primern (dunkelgrauer Balken) wird die DNA amplifiziert, wobei aufgrund der Blockade der 3'-OH der Nukleotide durch die Fluoreszenzmarkierung immer nur ein Nukleotid eingebaut werden kann (5). Anschließend wird Ort und Farbe der Fluoreszenzfarbstoffe detektiert und somit bestimmt, welche Base in welcher Gruppe eingebaut wurde (6). Die Farbstoffe werden abgespalten und der nächste Amplifikationsschritt kann stattfinden (5). Anhand der Farbabfolge der Fluoreszenzsignale wird die Sequenz jeder Gruppe bestimmt. Diese Sequenzen werden auf eine bekannte Genomkarte abgebildet oder zu einer neuen Karte zusammengesetzt, wobei die Häufigkeit der einzelnen Sequenzen Aufschluss über die Kopienanzahl des entsprechenden Markers in der Probe gibt (7). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt wie bei der CGH in einem Plot der logarithmischen Markerkopienanzahlen gegen ihre jeweilige Genomposition mit Ausgleichsgeraden.

Eine relativ neue Technik ist Markerfrequenzanalyse durch Sequenzierung (Skovgaard et al. 2011). Hier kommen *Next-Generation-Sequencing*-Methoden (NGS), wie beispielsweise der Firma Illumina, zum Einsatz (Abbildung 3.7C). Hierbei werden Fragmente genomischer DNA an Adaptersequenzen ligiert und auf einer Glasoberfläche zu isolierten Gruppen von DNA-Einzelsträngen amplifiziert (Fedurco et al. 2006; Adessi et al. 2000). Die Sequenzierung durch Synthese erfolgt mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (Turcatti et al. 2008). Die erhaltenen Fragmentsequenzen werden auf eine Genomsequenz abgebildet. Je häufiger eine Sequenz detektiert wurde, desto höher ist die Kopienanzahl des entsprechenden Fragments, wobei benachbarte Sequenzen zu einem Marker beliebiger Größe zusammengefasst werden können. Die Darstellung der Kopienanzahlen der Marker erfolgt in der Regel wie bei der CGH beschrieben. Der Vorteil dieser Methode zur Markerfrequenzanalyse ist die Unabhängigkeit von bekannten Markern und somit die Möglichkeit, das gesamte Genom auch gänzlich oder in Teilen unbekannter Stämme abzubilden.

3.4.3 Synthetische Chromosomen als Werkzeug am Beispiel von synVicII

Die Verwendung von Minichromosomen ist eine weitverbreitete Methode zur Untersuchung der Funktionalität von Replikationsursprüngen (Hiraga 1976; Messer et al. 1978). Hierbei werden vermutete oder bestätigte Replikationsursprünge ganz oder teilweise in ein Plasmid ohne oder mit einem konditionellen Replikationsursprung kloniert und in den ursprünglichen oder einen neuen Organismus eingebracht (Egan and Waldor 2003). Die Effizienz der Transformierbarkeit des Minichromosoms gibt Aufschluss über die Funktionalität des Replikationsursprungs im untersuchten Organismus. Mittels MFA kann die Kopienanzahl des Minichromosoms relativ zum Hauptchromosom bestimmt werden. Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist die Verwendung von Minichromosomen zur Untersuchung von anderen *chromosome maintenance*-Systemen als der Initiation der DNA-Replikation, wie beispielsweise weiteren Aspekten der DNA-Replikation, Segregation der Chromosomen, DNA-Reparaturmechanismen, oder Chromosomenfaltung. Hierzu wird ein etabliertes synthetisches Chromosomenrückgrat benötigt, auf welches das zu untersuchende Organisationssystem aufgebaut werden kann. Das synthetische Chromosom muss verschiedene Anforderungen erfüllen: Wie ein natürliches Chromosom muss es zellzyklusabhängig und stabil sein und in einer chromosomenüblichen Kopienanzahl vorliegen. Da dieses synthetische Chromosom getrennt vom Hauptchromosom des Testorganismus existiert, kann das zu analysierende *chromosome maintenance*-System unabhängig vom Hauptchromosom untersucht werden. Mit dem synthetischen sekundären Chromosom synVicII wurde ein solches

Chromosomenrückgrat entwickelt (Messerschmidt et al. 2014). SynVicII basiert auf *ori2* von *V. cholerae* und lässt sich in vier Bereiche, notwendig zur Replikation, Konstruktion, Selektion und Detektion, aufteilen (Abbildung 3.8). Der Replikationsbereich besteht zusätzlich zu *ori2* aus den Genen für das Initiatorprotein RctB sowie den Segregationsproteinen ParAB2. Während RctB essentiell für die *ori2*-basierte Replikation ist, erhöhen ParAB2 und die in *ori2* enthaltene *parS2*-Bindestelle die Stabilität des Replikons (Egan and Waldor 2003; Yamaichi, Fogel, McLeod, et al. 2007; Koch et al. 2012). Zudem ist ParB2 an der Regulation von *ori2* beteiligt (Yamaichi et al. 2011; Venkova-Canova et al. 2013). Der Konstruktionsbereich besteht aus dem konditionellen Replikationsursprung *oriR6K* sowie dem Selektionsmarker *URA3* und dem Replikationsursprung 2μ *ori* zur Replikation in *S. cerevisiae*. *OriR6K* ermöglicht die *ori2*-unabhängige Replikation in *pir*⁺-Zellen und wird zur Vervielfältigung von Varianten ohne oder mit nichtfunktionellem Replikationsbereich verwendet (Inuzuka and Helinski 1978). Der Replikationsursprung und Selektionsmarker für *S. cerevisiae* sind zur Verwendung der homologen Rekombination in Hefe als Konstruktionsmethode nötig (Gibson 2009). Als Selektionsmarker in Bakterien dient das Gen *AmpR* zur Vermittlung einer Resistenz gegen Ampicillin. Zur Detektion von synVicII in der Zelle mittels Durchflusszytometrie wird der Fluoreszenzreporter GFP verwendet. Dieser ist mit der C-terminalen Peptidsequenz AAV versehen, welche als Degradationsmarkierung fungiert (Andersen et al. 1998). Somit wird sichergestellt, dass nur dann ein GFP-Signal detektiert werden kann, wenn synVicII in der Zelle vorhanden ist. Zusätzliche DNA-Sequenzen können über eine I-SceI-Schnittstelle eingebracht werden.

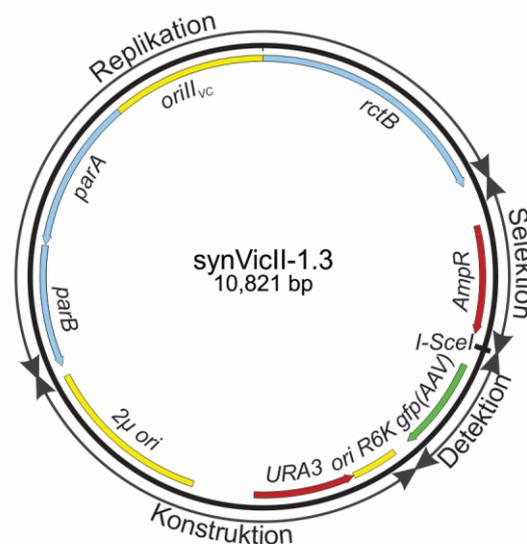


Abbildung 3.8: Aufbau des synthetischen sekundären Chromosoms synVicII-1.3. Bereiche für Replikation, Selektion, Detektion und Konstruktion sind durch graue Pfeile markiert. Replikationsursprünge sind gelb gefärbt, Gene aus *V. cholerae* blau. Selektionsmarker sind rot, das Reportergen *GFP* grün. Die I-SceI-Schnittstelle ist mit einem schwarzen Strich eingezeichnet.

Eine erste Charakterisierung von synVicII in *E. coli* MG1655 ergab eine Kopienanzahl von 0,5 relativ zu *oriC* und ohne Selektionsdruck eine Replikonverlustrate von 8 % pro Stunde (Messerschmidt et al. 2014). SynVicII initiiert dementsprechend, eine zellzyklusabhängige Initiation der DNA-Replikation vorausgesetzt, nachdem 53 % des Hauptchromosoms repliziert wurden. Dies ist vergleichbar zum Replikationstiming in *V. cholerae* und deutet auf ein chromosomentypisches Replikationsverhalten hin. Die leichte Instabilität ermöglicht die Untersuchung weiterer stabilisierender Faktoren. Somit zeigt synVicII ein großes Potential zur Verwendung als synthetisches Chromosomenrückgrat zur Untersuchung von *chromosome maintenance*-Systemen.

4. Zielsetzung der Arbeit

Während der Großteil aller Bakterien monochromosomal ist, verfügt *V. cholerae* über zwei Chromosomen unterschiedlicher Größe. Die Koordination der Replikation beider Chromosomen ist komplex und noch immer nicht vollständig verstanden. Der Replikationsursprung des zweiten Chromosoms, *ori2*, kann jedoch als Grundlage für das synthetische sekundäre Chromosom synVicII verwendet werden. Die vorliegende Arbeit soll zum Verständnis der Regulation und Koordination der Replikation der Chromosomen in Bakterien mit geteilten Genomen beitragen. Hierzu sollten die folgenden Fragestellungen adressiert werden:

1. Wie lässt sich die DNA-Replikation in *V. cholerae* synchronisieren?

Um diese Methode zur Untersuchung der DNA-Replikation in *V. cholerae* zu etablieren, sollte die Möglichkeit der Synchronisation mittels Serinhydroxamat untersucht werden, welche bereits für *E. coli* gezeigt wurde (Ferullo et al. 2009). Die Überprüfung der Synchronisation der DNA-Replikation sollte mittels Durchflusszytometrie und Markerfrequenzanalysen erfolgen.

2. Wie ist die Replikation von Chr1 und Chr2 in anderen Vibrionaceae koordiniert?

Die Koordination der Replikation beider Chromosomen in *V. cholerae* erfolgt über die *crtS* (*chr2 replication triggering site*) auf Chr1 und führt zur zeitgleichen Termination der Replikation von Chr1 und Chr2 (Val et al. 2016; Rasmussen et al. 2007). Um zu überprüfen, ob dieser Mechanismus in den Vibrionaceae konserviert ist, sollte mittels Sequenzvergleich in anderen Vibrionaceae nach der *crtS* gesucht werden. Zusätzlich sollte der Effekt der *crtS* auf die Kopienanzahl von Replikons basierend auf den *ori2* verschiedener Vibrionaceae in *E. coli* analysiert werden.

3. Wie verhält sich die DNA-Replikation von *V. cholerae* unter Nährstofflimitation?

Behandlung von *V. cholerae* mit Serinhydroxamat (SHX) führt zu Aminosäuremangel und induziert die Stringent Response. Die DNA-Replikation in *V. cholerae* und verschiedenen Mutanten während dieser Stressreaktion sollte mittels Durchflusszytometrie und Markerfrequenzanalysen untersucht werden.

5. Ergebnisse

Die Unterkapitel dieses Teils der vorliegenden Arbeit enthalten Studien, welche bereits veröffentlicht sind (5.1, 5.3, 5.4) oder zur Veröffentlichung eingereicht wurden (5.2, 5.5). Jeder Studie ist eine kurze Einführung vorangestellt, welche die Ergebnisse zusammenfasst und meinen Anteil daran erläutert.

5.1 Synchronous termination of replication of the two chromosomes is an evolutionary selected feature in Vibrionaceae.

Kemter FS, Messerschmidt SJ, Schallopp N, Sobetzko P, Lang E, Bunk B, Spröer C, Teschler JK, Yildiz FH, Overmann J, Waldminghaus T.
(2018)

PLoS Genetics

5.1 Synchronous termination of replication of the two chromosomes is an evolutionary selected feature in Vibrionaceae.

Die Aufteilung des Genoms auf zwei Chromosomen ist eine konservierte Eigenschaft der Vibrionaceae. Die Koordination der DNA-Replikation beider Chromosomen wurde bislang vorrangig für *V. cholerae* untersucht, wo Chr1 und Chr2 so replizieren, dass sie zur selben Zeit terminieren. Ein allgemeines Schema der Koordination beider Chromosomen der Vibrionaceae sowie eine Methode zur Synchronisation der DNA-Replikation in *V. cholerae* waren bisher jedoch noch nicht bekannt.

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die Behandlung von *V. cholerae* mit Serinhydroxamat (SHX) genutzt werden kann, um die Initiation der DNA-Replikation der Zellen zu synchronisieren. Dabei konnte bestätigt werden, dass *ori2* nach *ori1* initiiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei der Replikation von Chr1 eine Replikationsgabel der anderen um ca. 60 Kbp voraus ist. Weiterhin wurde im Zuge der Untersuchungen der verwendete Stamm *V. cholerae* A1552 vollständig sequenziert und annotiert, wobei eine bislang unbekannte Inversion zwischen zwei rRNA-Operons um den Bereich von *ori1* entdeckt wurde. Zur Koordination der DNA-Replikation beider Chromosomen in *V. cholerae* und anderen Vibrionaceae wurden zwei Modelle aufgestellt. Im *start control*-Modell startet die Replikation an *ori2* nachdem 2/3 von Chr1 repliziert wurden, was bei Vibrionaceae mit einem anderen Chromosomengrößenverhältnis als in *V. cholerae* zu einer asynchronen Termination der DNA-Replikation führen würde. Im *end control*-Modell initiiert *ori2* unabhängig vom Replikationsfortschritt auf Chr1 so, dass beide Chromosomen synchron terminieren. Zur Untersuchung dieser beiden Modelle wurde zunächst nach einer Möglichkeit gesucht, den Zeitpunkt des Replikationsstarts von *ori2* im Vergleich zu *ori1* *in silico* zu analysieren. In *V. cholerae* konnte bereits gezeigt werden, dass der Zeitpunkt der Initiation von *ori2* von der Position der *crtS* auf Chr1 abhängt. Somit kann die Position der *crtS*, falls vorhanden, Aufschluss über den Zeitpunkt der Replikation von Chr2 im Vergleich zu Chr1 in verschiedenen Vibrionaceae geben. In der Tat konnte eine Konservierung der *crtS* in Vibrionaceae mittels vergleichender Genomik belegt werden. Zudem wurde mittels Minichromosomen, basierend auf den *ori2* verschiedener Vibrionaceae, gezeigt, dass *crtS* und *ori2* verschiedener Organismen miteinander kompatibel sind. Die Position der *crtS* in verschiedenen Vibrionaceae korreliert nicht mit der Größe von Chr1, sondern mit der Größe von Chr2, was für das *end control* Modell spricht. Experimentell wurde für elf Vibrionaceae Terminationssynchronie und ein Replikationsstart von Chr2 nach Replikation der *crtS* nachgewiesen, was das *end control* Modell weiter unterstützt.

Zusammen mit Nadine Schalopp etablierte ich die Synchronisation der *V. cholerae*-Zellen im Bezug auf die DNA-Replikation. Ich führte die Markerfrequenzanalyse mittels komparativer genetischer Hybridisierung durch und analysierte die Daten unter Mithilfe von Prof. Dr. Torsten Waldminghaus. Prof. Dr. Torsten Waldminghaus und ich fanden die konservierte *crtS*-Sequenz und bildeten eine Konsensussequenz. Ich generierte einige der verwendeten *ori2*-Minichromosomen und *crtS*-Stämme und führte die Kopienanzahlanalysen durch. Ich gestaltete die Abbildungen und trug zum Verfassen des Manuskripts bei.

5.2 Stringent response leads to continued cell division and a temporal re-start of DNA replication after initial shutdown in *Vibrio cholerae*.

Kemter FS, Schallopp N, Sperlea T, Serrania J., Sobetzko P, Fritz G, Waldminghaus T.

In Revision

5.2 Stringent response leads to continued cell division and a temporal re-start of DNA replication after initial shutdown in *Vibrio cholerae*

Um die Mechanismen der Regulation der DNA-Replikation beider Chromosomen von *V. cholerae* tiefergehend zu analysieren, sollte die Reaktion von DNA-Replikation und Zellteilung auf Stress untersucht werden. Eine bekannte und in Bakterien konservierte Stressantwort ist die Stringent Response (SR) als Reaktion auf Nährstoffmangel.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, erfolgt die Regulation des Zellzyklus in *V. cholerae* nach Induktion der SR mit SHX in drei Phasen. In der „*initial shutdown*“-Phase replizieren die Zellen ihre Chromosomen fertig, wobei keine bis wenig Neuintiation zu beobachten ist. Die Zellgröße sinkt bei starker Zunahme der Zellzahl, was auf viele Zellteilungen bei wenig Zellwachstum schließen lässt. In der anschließenden „*replication restart*“-Phase sind verstärkt Initiationen der DNA-Replikation sowie eine starke Zunahme des Zellwachstums zu beobachten. In der „*final shutdown*“-Phase finden keine Initiationen der DNA-Replikation sowie kein Zellwachstum und wenige Zellteilungen statt. Die meisten Zellen enthalten nur noch die DNA-Menge eines Chromosomensatzes. Im Gegensatz dazu beenden *E. coli*-Zellen ihre laufende Replikation und teilen sich zu Zellen mit zwei und vier Chromosomen. Diese Reaktion in *V. cholerae* ist ein Effekt der SR, ausgelöst durch SHX-induzierten Aminosäuremangel. Dies wird dadurch bestätigt, dass eine Deletionsmutante des SR-Regulators RelA diesen Phänotyp nicht mehr zeigt. Ein fehlerhaftes Kopienanzahlverhältnis zwischen Chr1 und Chr2 als Ursache des Teilungs-Replikationsmusters konnte ausgeschlossen werden, da beide Chromosomen zu verschiedenen Zeitpunkten nach SHX-Zugabe die gleiche Kopienanzahl und ihr bekanntes Replikationsschema (*ori1* initiiert zuerst, *ori2* folgt) aufwiesen. Zudem zeigte der *Δori2*-Stamm MCH1 einen WT-ähnlichen Phänotyp. Der Zeitpunkt der Re-Initiation, aber nicht die Anzahl an Initiationen, ist abhängig von der verwendeten SHX-Konzentration. Dies konnte durch ein mathematisches Modell, basierend auf Gesetzmäßigkeiten des bakteriellen Wachstums und dem Konzept der Initiationsmasse, nachgebildet werden. Mithilfe dieses Modells konnte gezeigt werden, dass die Re-Initiation der DNA-Replikation vermutlich durch eine Zunahme der Zellgröße, basierend auf einer Regulation der Transkription durch die SR, ausgelöst wird. Dies wird dadurch bestätigt, dass ein Stamm mit einer Deletion des Transkriptionsfaktors DksA, welcher für die Regulation der Transkription während der SR benötigt wird, nach SHX-Gabe keine Re-Initiation der DNA-Replikation zeigt. Der unterschiedliche Effekt der SR auf die Zellzyklusregulation in *V. cholerae* und *E. coli* ist auf die stationäre Phase übertragbar. Beim Übergang von exponentieller zu stationärer Phase teilen sich *V. cholerae*-Zellen sofort auf einen Chromosomensatz, während bei *E. coli* Zellen mit zwei Chromosomen deutlich überwiegen. Die

Unterschiede der Reaktion auf Nährstoffmangel könnten auf eine Anpassung dieser auf die verschiedenen Lebensweisen der Organismen hindeuten.

Alle Mutanten von *V. cholerae* wurden von mir generiert. Ich führte unter Mitarbeit von Nadine Schallopp die Durchflusszytometrieuntersuchungen durch und bereitete die Proben für die Markerfrequenzanalysen vor. Ich gestaltete die meisten Abbildungen und verfasste das Manuskript gemeinsam mit Prof. Dr. Torsten Waldminghaus.

5.3 Optimization and Characterization of the Synthetic Secondary Chromosome synVicII in *Escherichia coli*.

Messerschmidt SJ, Schindler D, Zumkeller CM, **Kemter FS**, Schallopp N, Waldminghaus T.
(2016)

Frontiers in Microbiology: Bioengineering and Biotechnology

5.3 Optimization and Characterization of the Synthetic Secondary Chromosome synVicII in *Escherichia coli*.

In dieser Veröffentlichung wurde das bereits etablierte synthetische sekundäre Chromosom synVicII weiter charakterisiert und verbessert. Als wichtige Voraussetzung zur Nutzung von synVicII als synthetisches Modellchromosom wurde die genetische Integrität überprüft. Im Gegensatz zum *oriC*-basierten synEsc, integriert synVicII nicht in das Hauptchromosom von *E. coli*, selbst wenn beide homologe Bereiche zueinander enthielten. Zur Erzeugung stabilerer Varianten von synVicII wurde ein Evolutionsansatz mit wechselnder Kultivierung in Medium mit und ohne Antibiotikum etabliert. Zur Erkennung unerwünschter Mutanten mit erhöhter Kopienanzahl wurde ein einfacher Wachstumstest in erhöhter Antibiotikakonzentration angewendet und die Ergebnisse daraus per Markerfrequenzanalyse verifiziert. Zudem wurden weitere sekundäre synthetische Chromosomen auf Basis der *ori2* anderer Vibrionaceae konstruiert. Diese sind in *E. coli* funktionell, jedoch untereinander oder mit synVicII nicht kompatibel. Zur Verbesserung des Handlings von synVicII wurden verschiedene Optimierungen vorgenommen. Um vor allem große Replikons konjugieren zu können, anstatt sie transformieren zu müssen, wurde ein *origin of transfer* (*oriT*) eingefügt. Dieser wurde, gemeinsam mit den lediglich zur Konstruktion von synVicII benötigten Replikationsursprüngen (*2 μ ori*, *oriR6K*) und Selektionsmarkern (*ura3*), von FRT-sites flankiert und kann so mittels Flp-basierter Rekombination entfernt werden, sobald diese Bereiche nach erfolgreicher Konstruktion und Konjugation nicht mehr gebraucht werden. Für eine verbesserte Klonierbarkeit wurde synVicII kompatibel mit dem *Modular Cloning System* (MoClo) gemacht. Hierzu wurden sämtliche BsaI- und BpiI-Schnittstellen des Replikons entfernt. Passend zur Verwendung mit den MoClo-Vektoren der Level „M“ und „P“ wurde die zuvor verwendete I-SceI-Schnittstelle durch BsaI- oder BpiI-Schnittstellen und entsprechenden Überhangsequenzen ausgetauscht. Als Klonierungsmarker wurde eine *lacZa/ccdB*-Kassette zwischen den Schnittstellen eingebracht. Der Erhalt von Stabilität und Kopienanzahl im Vergleich zum ursprünglichen synVicII wurde per Durchflusszytometrie und Markerfrequenzanalyse bestätigt.

Im Rahmen meiner Dissertation bestimmte ich die Kopienanzahl der verschiedenen Varianten von synVicII in dieser Veröffentlichung. Ich gestaltete die Abbildungen zur Kopienanzahl und trug zum Verfassen des Manuskripts bei.

5.4 Establishing a System for Testing Replication Inhibition of the *Vibrio cholerae* Secondary Chromosome in *Escherichia coli*.

Schalopp N*, Milbredt S*, Sperlea T*, **Kemter FS***, Bruhn M, Schindler D,
Waldminghaus T.
(2017)

Antibiotics (Basel)

5.4 Establishing a System for Testing Replication Inhibition of the *Vibrio cholerae* Secondary Chromosome in *Escherichia coli*.

Die Einzigartigkeit von Chr2 der Vibrionaceae macht es zu einem idealen Angriffspunkt für *Vibrio*-spezifische Wirkstoffe. Um gezielt Effekte auf *ori2* zu analysieren, ist es jedoch von Vorteil, wenn dieser außerhalb seines nativen Kontextes untersucht wird. Um ein solches System zu etablieren, wurden *E. coli*-Stämme mit *ori2*-basiertem Hauptchromosom charakterisiert.

Zur Untersuchung von *ori2* in *E. coli* wurde der Stamm #16 mit einem ektopischen *ori2* und einer *oriC*-Deletion verwendet. In diesem Kontext wies *ori2* eine höhere Kopienanzahl als der native *oriC* des WT-Stammes auf. Das Gen der Methyltransferase *dam* konnte im Gegensatz zu *seqA* in #16 nicht deletiert werden, da Dam auch in *E. coli* für die Funktion von *ori2* essentiell ist. Replikons mit der *chr2 replication triggering site crtS* konnten zwar in den WT-Stamm sowie einem Stamm mit *oriC* und *ori2* (#15) eingebracht werden, jedoch nicht in #16. Eine ins Genom von *E. coli* MG1655 integrierte *crtS* erhöhte die Kopienanzahl von *ori2*-basierten Minichromosomen. Im Unterschied zur Transformierbarkeit des WT-Stammes mit *ori2*-basierten Replikons, war es nicht möglich, *oriC*-basierte Minichromosomen in #16 einzubringen. Eine mögliche Ursache für die Interferenz zwischen *ori2* und *oriC* könnte Konkurrenz um das Initiatorprotein DnaA sein. *Ori2* enthält eine DnaA-Box, welche auf einem *ori2*-Minichromosom essentiell ist. Der Austausch der Sequenz mit einer hohen DnaA-Affinität durch Sequenzen mit mittlerer oder niedriger Affinität senkte die Transformationseffizienz des Minichromosoms. Es konnten maximal zwei Bp der DnaA-Box ausgetauscht werden, ohne die Funktionsfähigkeit von *ori2* zu verlieren. Zudem wurde gezeigt, dass eine Veränderung des Abstands der DnaA-Box zum nächsten RctB-Iteron die Transformationseffizienz des Minichromosoms drastisch senkt. Zur einfachen Identifikation von Stämmen mit *ori2*-basierter DNA-Replikation sollte der RctB-inhibierende Wirkstoff Vibrepin eingesetzt werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass *E. coli* weder mit *ori2*-basierter Replikation des Hauptchromosom noch eines Minichromosoms von Vibrepin beeinflusst wurde. Zudem wurden *V. cholerae*-Stämme mit und ohne *ori2* durch Vibrepin gehemmt. Somit scheint Vibrepin eine andere Wirkungsweise zu haben als bislang angenommen. Als Weiterentwicklung von #16 wurde der native *oriC* von *E. coli* MG1655 direkt durch *ori2* ausgetauscht (NZ138). NZ138 ist ebenfalls sensitiv gegenüber Δdam und zeigt ähnliche Eigenschaften in Bezug auf Wachstumsgeschwindigkeit, DNA-Gehalt und Zellgröße wie *E. coli* MG1655 und #16.

In dieser Veröffentlichung untersuchte ich die Kopienanzahl von verschiedenen Minichromosomen und charakterisierte die *ori2*-basierten *E. coli*-Stämme im Bezug auf DNA-

Gehalt, Zellgröße und Wachstumsgeschwindigkeit. Ich gestaltete die Abbildung zum *oriC::ori2*-Stamm und trug zum Verfassen des Manuskripts bei.

5.5 Functionality of Two Origins of Replication in *Vibrio cholerae* Strains with a Single Chromosome.

Bruhn M, Schindler D, **Kemter FS**, Wiley MR, Chase K, Koroleva GI, Palacios G, Sozhamannan S, Waldminghaus T.
(2018)

Frontiers in Microbiology

5.5 Functionality of Two Origins of Replication in *Vibrio cholerae* Strains with a Single Chromosome

Bei den natürlich vorkommenden *V. cholerae*-Stämmen NSCV1 und NSCV2 liegen Chr1 und Chr2 in beiden Stämmen jeweils unter Erhaltung beider Replikationsursprünge fusioniert vor. Dies steht im Gegensatz zur *V. cholerae*-typischen Verteilung des Genoms auf zwei Chromosomen. In dieser Veröffentlichung wurde das Replikationsverhalten von NSCV1 und NSCV2 näher untersucht. Um die Aktivität der Replikationsursprünge beider Stämme zu prüfen, wurden Markerfrequenzanalysen durchgeführt. Hierbei konnte eine Aktivität von *ori1* und *ori2* in NSCV1 sowie von *ori1* in NSCV2 gezeigt werden, wobei die Kopienanzahl von *ori2* in NSCV1 niedriger als die von *ori1* war. In beiden Stämmen wurden zwar Mutationen in Replikationsursprüngen, Initiatorproteinen oder *crtS* festgestellt, jedoch keine offensichtlich funktionsbeeinträchtigenden. Auch die Aktivität der Methyltransferase Dam, essentiell für die Funktion von *ori2* in *V. cholerae*, war in beiden Stämmen nicht beeinträchtigt. Minichromosomen basierend auf den *ori2* beider Stämme sind in *E. coli* konjugierbar. Über die Analyse der Kopienanzahl von *synVicII* in *E. coli*-Stämmen mit und ohne *crtS* wurde auch die Funktionsfähigkeit der *crtS* beider NSCV-Stämme gezeigt. Die Fusion der Chromosomen blieb in beiden Stämmen über eine Kultivierungsdauer von etwa 160 Generationen stabil. Um zu überprüfen, ob die Inaktivität von *ori2* in NSCV2 durch die Anordnung von *ori1*, *ori2* und *crtS* auf dem Chromosom bedingt ist, wurden die Anordnungen dieser drei Sequenzen beider Stämme im synthetisch monochromosomalen *V. cholerae*-Stamm MCH1 nachgebildet. Unter Beibehaltung der MCH1-Position der *crtS* ist *ori2* sowohl in NSCV1- als auch in NSCV2-Position aktiv. Deletion der *crtS* führt zur Inaktivierung von *ori2*. Eine Verschiebung der *crtS* weiter entfernt von *ori1* als *ori2*, in derselben Anordnung wie in NSCV2, inaktiviert *ori2* jedoch nicht. Möglicherweise ist dies durch den veränderten genetischen Kontext im Vergleich zu NSCV2 begründet.

In dieser Arbeit bestimmte ich die Wachstumsgeschwindigkeiten der untersuchten Stämme und isolierte genomische DNA zur Sequenzierung mittels PacBio-Technologie. Ich konstruierte die *crtS*_{NSCV}-Stämme und führte die *synVicII*-Kopienanzahlanalysen durch. Ich trug zum Verfassen des Manuskripts bei.

6. Diskussion

6.1 Die Regulation der Initiation der DNA-Replikation an *ori2*

6.1.1 Die Regulation der Initiation der DNA-Replikation an *ori2* in Vibrionaceae

Im Gegensatz zu monochromosomalen Bakterien wie *E. coli* teilen etwa 10 % aller Bakterien ihr Genom auf mehr als ein Chromosom auf (Jha, Baek, et al. 2012). Eines dieser Bakterien ist der bichromosomale Pathogen *V. cholerae* (Trucksis et al. 1998). Beide Chromosomen sind unterschiedlich groß und werden so repliziert, dass ihre DNA-Replikation zur gleichen Zeit terminiert (Rasmussen et al. 2007). Um diese Terminationssynchronie zu erreichen, muss die Initiation der DNA-Replikation von Chr2 genau mit der DNA-Replikation von Chr1 koordiniert sein. Wie wird diese Koordinierung der DNA-Replikation von Chr1 und Chr2 in *V. cholerae* erreicht? Einer der wichtigsten Regulatoren hierfür ist die Replikation der *chr2 replication triggering site crtS* auf Chr1. Die korrekte Positionierung der *crtS* führt zur Terminationssynchronie beider Chromosomen (Val et al. 2016). Markerfrequenzanalysen (MFA) exponentiell wachsender Vibrionaceae sowie Sequenzvergleiche von Genomen verschiedener Vibrionaceae zeigten, dass diese Terminationssynchronie, wie auch die *crtS* selbst, in den Vibrionaceae konserviert ist (Kapitel 5.1). Die Abfolge der Replikation der Chromosomen und somit die Terminationssynchronie wird in *V. cholerae* auch unter Nährstoffmangelstress während der Stringent Response eingehalten (Kapitel 5.2). Präsenz der *crtS* in der Zelle erhöht die Kopienanzahl von *ori2*, sowohl in *V. cholerae* als auch in *E. coli*, was auch für *ori2*-basierte Minichromosomen verschiedener Vibrionaceae mit artfremden *crtS* gilt (Kapitel 5.4 und 5.1). Die genauen Mechanismen der *crtS*-vermittelten Initiation der DNA-Replikation an *ori2* sind bislang unklar. Bekannt ist, dass RctB an die *crtS* bindet (Baek and Chattoraj 2014; de Lemos Martins et al. 2018). Es wird vermutet, dass diese Bindung zu einer Konformationsänderung des Initiatorproteins führt, wodurch RctB besser an die 12-mer-Iterons und schlechter an die 39-mer in *ori2* bindet (Baek and Chattoraj 2014; Ramachandran et al. 2018). Bindung von aktivem RctB an die 12-mer-Iterons in *ori2* führt zur Initiation der DNA-Replikation von Chr2, während Bindung von RctB an die 39-mer in *ori2* die Initiation der DNA-Replikation inhibiert (Egan and Waldor 2003; Venkova-Canova and Chattoraj 2011). Die Bindung von RctB an *crtS* wird durch den Transkriptionsregulator Lrp gefördert (Ciaccia et al. 2018). Eine Verdopplung der *crtS* führt zur Initiation der DNA-Replikation an *ori2* (Val et al. 2016). Hierfür ist lediglich die Erhöhung der Kopienanzahl der *crtS* und nicht die DNA-Replikation von Chr1 relevant (Ramachandran et al. 2018). Dies bedeutet, dass die Kopienanzahl von *ori2* immer der Kopienanzahl der *crtS* angeglichen wird. Wie wird diese Kopienanzahlkontrolle von *ori2* durch die *crtS* bewerkstelligt?

Eine Analyse mittels *chromosome conformation capture* zeigte, dass sich *crtS* und *ori2* in räumlicher Nähe zueinander befinden, wobei die Interaktionen zwischen der Nachbarregion der *crtS* in Terminusrichtung und bis zu 25 Kbp neben *ori2* am stärksten sind (Val et al. 2016). Da die *crtS* unabhängig von ihrem genomischen Kontext funktioniert und beliebig verschoben werden kann, ist die Interaktion der Nachbarregion der *crtS* vermutlich nicht sequenzspezifisch, sondern muss durch die *crtS* selbst ausgelöst werden. Um zu untersuchen, ob die Interaktion von *ori2* selbst oder einer benachbarten Sequenz verursacht wird, würde sich ebenfalls eine *chromosome conformation capture*-Analyse von *V. cholerae* mit einem verschobenen *ori2* anbieten. Würde der Kontakt nun von der neuen Nachbarregion von *ori2* ausgehen, würde er von *ori2* selbst ausgelöst und nicht durch die ursprüngliche Nachbarregion. Äquivalent zur *crtS* wäre er dann durch einen noch zu klärenden Mechanismus downstream verschoben. Blicke der Kontakt an seiner jetzigen Stelle, spräche dies für eine weitere spezifische Sequenz, welche an der Regulation von *ori2* beteiligt sein könnte. Solch eine Interaktion zwischen *crtS* und *ori2* oder dessen Nachbarregion wäre eine Möglichkeit des Kopienanzahlgleichs zwischen *crtS* und *ori2*. Die Replikation von Chr1 würde zu einer weiteren *crtS*-Kopie ohne „Interaktionspartner“ führen. Diese „leere“ *crtS* würde dann die Initiation der DNA-Replikation an *ori2* auslösen, beispielsweise durch die Konformationsänderung und somit die Aktivierung von RctB. Wodurch wird diese Interaktion zwischen *crtS* und *ori2* erzeugt? Bei direkter Beteiligung von *ori2* selbst wäre RctB ein möglicher Vermittler, da es sowohl an *ori2* als auch an *crtS* bindet. Ähnlich wie bei dem als „handcuffing“ bezeichneten Verbinden zweier Sequenzen in *ori2* durch ein RctB-Dimer, könnten *crtS* und *ori2* durch RctB-Multimere verbunden werden (Venkova-Canova and Chatteraj 2011). Allerdings wurde bereits gezeigt, dass RctB als Monomer an *crtS* bindet (de Lemos Martins et al. 2018). Für den einzigen weiteren bekannten Faktor, welcher die *crtS* bindet, den Transkriptionsregulator Lrp, ist bislang keine Interaktion mit *ori2* bekannt (Ciaccia et al. 2018). Um weitere Interaktionspartner von *crtS* und *ori2* zu finden, könnten verschiedene Methoden zum Einsatz kommen, bei denen an spezifische DNA-Sequenzen gebundene Proteine identifiziert werden können. Eine beispielhafte Methode *in vivo* wurde bereits zur Identifikation von MatP, dem Interaktionspartner des DNA-Motivs *matS*, eingesetzt (Mercier et al. 2008). Hierbei wird die zu untersuchende DNA-Sequenz in die Promotorregion eines Reportergens eingebracht und gegen eine Bibliothek von Genomfragmenten getestet. Codiert eines der auf den Fragmenten enthaltenen Gene für ein Protein, welches die Sequenz bindet, so wird der Promotor blockiert und das Reportergen nicht exprimiert. Eine passende *in vitro* Methode wäre eine Variante des Pulldown-Assays unter Verwendung der gewünschten DNA-Sequenz als Köder (Deng et al. 2003). Die isolierten Proteine könnten anschließend per Massenspektrometrie identifiziert werden (Perkins et al. 1999). Die Aufklärung weiterer Interaktionspartner von *ori2* oder *crtS* könnte einen großen

Beitrag zum Verständnis der Regulation von *ori2* durch die *crtS* leisten.

Zwischen Replikation der *crtS* und der darauffolgenden Initiation an *ori2* im selben Replikationszyklus vergeht in *V. cholerae* genug Zeit, um an einer Replikationsgabel 200 Kbp zu replizieren (Val et al. 2016). Nach der in dieser Arbeit gemessenen Geschwindigkeit einer Replikationsgabel von 22 Kbp/min an Chr1, würde diese Zeit in *V. cholerae* 9 min betragen (Kapitel 5.1). Wird die Dauer der C-Periode von Chr1 in schnell wachsenden Zellen zugrunde gelegt, würde die Verzögerungszeit bei einer Replikationsgeschwindigkeit von 50 Kbp/min 4 min betragen (Stokke et al. 2011). Wodurch wird diese Zeitverzögerung verursacht? Da über den Mechanismus der Induktion der Initiation der DNA-Replikation an *ori2* durch die *crtS* nur wenig bekannt ist, lässt sich auch hierüber nur spekulieren. Die lange Zeitspanne deutet jedoch auf einen sehr komplexen oder sehr langsamen Ablauf hin. Diese Zeitspanne zwischen Replikation der *crtS* und *ori2* setzt sich aus der Dauer des *crtS*-basierten Mechanismus und der nachfolgenden Prozesse der Initiation der DNA-Replikation zusammen. Es ist nicht bekannt, in welchem Schritt der Initiation die Induktion durch die *crtS* stattfindet. Erfolgt die Induktion durch die *crtS* bereits in einem frühen Schritt der Initiation, wäre die tatsächliche Dauer des *crtS*-basierten Mechanismus kürzer. Erfolgt die Induktion erst in einem späteren Schritt der Initiation, wären einige Prozesse der Initiation bereits abgeschlossen, und die tatsächliche Mechanismusbauer entsprechend länger. Die Distanz zwischen Position der Replikationsgabel auf Chr1 zum Zeitpunkt der Initiation an *ori2* und der Position der *crtS* auf Chr1 ist in jedem in dieser Arbeit untersuchten Vibrionaceae vorhanden, jedoch bei jedem unterschiedlich groß (Kapitel 5.1). Für den Großteil der untersuchten Stämme betrug sie zwischen 150 und 410 Kbp, die kürzeste beobachtete Distanz lag bei 60 Kbp in *V. anguillarum*, die längste bei 720 Kbp in *P. profundum*. Vorausgesetzt, die Replikationsgeschwindigkeit ist in allen untersuchten Stämmen gleich, bedeutet dies, dass in jedem Stamm unterschiedlich viel Zeit zwischen Replikation der *crtS* und Initiation der DNA-Replikation an *ori2* vergeht. Für *V. anguillarum* wären dies 3 bzw. 1 min, für *P. profundum* 33 bzw. 14 min. Wodurch werden diese großen Unterschiede in der Verzögerungsdauer unter den Vibrionaceae verursacht? Möglich wäre, dass die Unterschiede der Verzögerungsdauer durch Unterschiede in Bindungseffizienzen und Reaktionsgeschwindigkeiten der beteiligten Proteine und DNA-Sequenzen entstehen. Dies könnte beispielsweise untersucht werden, indem in *V. cholerae* Gene wie *rctB* oder DNA-Bereiche wie *crtS* oder *ori2* durch Homologe anderer Vibrionaceae ausgetauscht werden und mittels MFA das Verhältnis der Kopienanzahl von *crtS* und *ori2* analysiert und verglichen wird. Unklar ist auch, ob die Verzögerung zwischen *crtS*-Replikation und *ori2*-Initiation eine Bedeutung für die Koordination der Replikation von Chr1 und Chr2 und somit der Terminationssynchronie hat. Möglich wäre eine Art der Feinjustierung der synchronen Termination beider Chromosomen über die Veränderung

der Verzögerungsdauer. Es scheint keinen Zusammenhang zwischen der Länge der Verzögerung und der Größe der Chromosomen, Position der *crtS* auf Chr1 oder der Abweichung von der Terminationssynchronie zu geben. Zudem ist die Notwendigkeit einer solchen Feinjustierung fraglich, da die *ter1/ter2*-Ratio der untersuchten Stämme in vielen Fällen von 1 abweicht und somit anscheinend eine gewisse Abweichung von der Terminationssynchronie toleriert wird (Kapitel 5.1). Dies wirft weitere Fragen auf. Wie wichtig ist die Terminationssynchronie für den korrekten Ablauf des Zellzyklus und ist eine verspätete Termination von Chr1 oder von Chr2 schwerwiegender? Hierfür wäre ein Evolutionsexperiment mit Stämmen interessant, bei denen die Terminationssynchronie durch eine Änderung der Größe von Chr1 oder Chr2 oder einer Verschiebung der *crtS* in Richtung *ori1* oder *ter1* aufgehoben wurde. In diesem Experiment könnte beobachtet werden, ob und nach wie vielen Generationen die Terminationssynchronie wiederhergestellt wird. Um mögliche Rückschlüsse auf die Auswirkungen einer verspäteten Termination von Chr1 oder Chr2 zu ziehen, könnte zudem untersucht werden, ob eine Erhöhung im Vergleich zu einer Erniedrigung der *ter1/ter2*-Ratio eine schnellere oder langsamere Wiederherstellung der Terminationssynchronie zur Folge hätte. Zur Wiederherstellung der Terminationssynchronie durch die Zelle wären eine Verschiebung der *crtS*, die Anpassung der Größen von Chr1, Chr2 oder beiden Chromosomen oder eine Veränderung der Verzögerungsdauer zwischen *crtS*-Replikation und *ori2*-Initiation möglich. Sollte letzterer Fall eintreten, würde dies auch Antworten auf die Frage nach der Bedeutung der Verzögerung für die Terminationssynchronie geben.

Welche Funktion hat das an der Regulation von *ori2* durch die *crtS* beteiligte Lrp? Lrp (*leucine-responsive regulatory protein*) ist ein globaler Regulator der Transkription. In *E. coli* wird die Expression von etwa 10 % aller Gene, unter anderem solcher für den Aminosäuremetabolismus, durch Lrp positiv oder negativ reguliert, wobei die Expression mancher dieser Gene bei Zugabe von Leucin zusätzlich verändert wird (Tani et al. 2002). Die Expression von Lrp selbst wird durch (p)ppGpp positiv reguliert und wird beim Übergang in die stationäre Phase erhöht (Landgraf et al. 1996). Es wird vermutet, dass Lrp an der Chromosomenfaltung beteiligt ist (D'Ari et al. 1993). Obwohl Lrp von *V. cholerae* eine große Homologie zu Lrp von *E. coli* aufweist, verursacht es in *E. coli* ein anderes Expressionsmuster, was auf unterschiedliche Effekte durch Lrp in *V. cholerae* im Vergleich zu *E. coli* hindeutet (Lintner et al. 2008). Wie in Kapitel 5.2 gezeigt wurde, replizieren Chr1 und Chr2 auch unter Nährstoffmangelstress und erhöhter (p)ppGpp-Konzentration mit derselben Kopienanzahl, wobei Chr2 nach Chr1 initiiert. Eine nährstoffabhängige Regulation von *ori2* durch Lrp und *crtS*, welche bei Nährstoffmangel zu einer erhöhten oder erniedrigten Kopienanzahl von Chr2 im Vergleich zu Chr1 führen könnte, ist somit unwahrscheinlich. Zudem wäre eine solche Regulation von *ori2*, sofern sie nicht auch *ori1*

betreffen würde, nicht sinnvoll, da sie aufgrund der fehlenden Replikationskontrolle von Chr2 auf Chr1 zum Ungleichgewicht in der Kopienanzahl beider Chromosomen bis hin zum Verlust von Chr2 und somit dem Tod der Zelle führen würde. Möglicherweise dient Lrp lediglich zur Konformationsänderung der *crtS* zur besseren Bindung durch RctB und ist hierfür schon in geringer Konzentration ausreichend.

6.1.2 Die Regulation der Initiation der DNA-Replikation an *ori2* in *E. coli*

Um *ori2* außerhalb seines nativen Kontextes zu untersuchen oder synthetische sekundäre Chromosomen zu generieren, kann *ori2* auch als Replikationsursprung von Replikons in *E. coli* eingebracht werden. In *E. coli* kann ein *ori2*-basiertes Replikon wie synVicII auch ohne *crtS* replizieren, während die Deletion der *crtS* in *V. cholerae* zu Mutationen in *rctB* oder *ori2* oder zu Chromosomenfusionen führt ((Val et al. 2016); Kapitel 5.3). Die Integration einer *crtS* in das *E. coli*-Chromosom erhöht die Kopienanzahl eines *ori2*-basierten Minichromosoms relativ zu *oriC* von $0,31 \pm 0,02$ auf $0,82 \pm 0,13$ (Kapitel 5.4). Demnach hat die *crtS* in *E. coli* ebenfalls einen Einfluss auf die Initiation der DNA-Replikation an *ori2*. Warum ist die *crtS* in *E. coli* mit *ori2*-basierten Replikons im Gegensatz zu *V. cholerae* nicht essentiell? Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte es in *V. cholerae* einen zusätzlichen negativen Regulator der Initiation der DNA-Replikation an *ori2* geben, welcher bei den bisher konstruierten *ori2*-basierten Minichromosomen in *E. coli* fehlt. Zum anderen könnte ein in *V. cholerae* nicht vorhandener Faktor in *E. coli* die fehlende *crtS* ganz oder teilweise komplementieren. Mögliche negative Regulatoren in *V. cholerae* wären verschiedene RctB-Bindestellen auf Chr2 außerhalb von *ori2*, für die bereits eine Inhibierung der Replikation *ori2*-basierter Minichromosomen in *E. coli* sowie ein negativer Effekt auf die Kopienanzahl von *ori2* in *V. cholerae* gezeigt werden konnte (Baek and Chatteraj 2014). Interessant wäre, ob eine auf dem *E. coli*-Chromosom integrierte *crtS* den negativen Effekt solcher RctB-Bindestellen auf einem *ori2*-basierten Minichromosom ausgleichen könnte, oder ob die Deletion dieser Bindestellen in *V. cholerae* die Deletion der *crtS* ermöglicht. Um weitere negative Regulatoren der Initiation an *ori2* in *V. cholerae* zu finden, könnten Transposon-Mutagenese-Experimente durchgeführt und nach Mutanten mit erhöhter Kopienanzahl von *ori2* gesucht oder weitere Stämme untersucht werden, welche eine Deletion der *crtS* durch eine Mutation kompensieren konnten. Bisläng zeigten letztere Stämme jedoch nur Chromosomenfusionen oder Mutationen in *rctB* und in dessen Expressionsregulation (Val et al. 2016; Ramachandran et al. 2018). Als positiver Regulator der Initiation an *ori2* in *E. coli* wurden bereits die Chaperone DnaK und DnaJ (DnaKJ) gefunden, welche für die Replikation von *ori2*-basierten Minichromosomen ohne *crtS* essentiell sind (Jha, Demarre, et al. 2012). Die Integration

einer *crtS* in *E. coli* kann die Deletion von *dnaKJ* komplementieren, beide Faktoren scheinen jedoch nicht denselben Wirkmechanismus zu haben (Baek and Chatteraj 2014; Ramachandran et al. 2018). DnaKJ fördern die Monomerisierung von RctB und dessen Bindung an 12- und 39-mere in *ori2* sowie an die *crtS* durch eine Ummodellierung von RctB (Jha et al. 2017; de Lemos Martins et al. 2018). Zudem scheinen DnaKJ die Oligomerisierung von spezifisch gebundenem RctB auf der DNA in *V. cholerae* zu verstärken (de Lemos Martins et al. 2018). Im Gegensatz zu *E. coli* sind die Chaperone DnaKJ in *V. cholerae* essentiell (Chao et al. 2013). Dies scheint auch für den monochromosomalen *V. cholerae*-Stamm MCH1 zu gelten (Bruhn et al., unveröffentlichte Daten). Letzteres lässt vermuten, dass DnaKJ auch für andere Abläufe in *V. cholerae* außerhalb der Initiation der DNA-Replikation essentiell sind, schließt jedoch eine Abhängigkeit der *ori2*-basierten DNA-Replikation von DnaKJ wie in *E. coli* nicht aus. Somit scheint die Ummodellierung von RctB durch DnaKJ ein weiterer Mechanismus der Regulation der *ori2*-basierten DNA-Replikation zu sein, der in *E. coli* durch einen zusätzlichen positiven oder fehlenden negativen Regulator teilweise ausgeglichen werden kann. Ein positiver Regulator der Initiation der DNA-Replikation an *ori2* in *E. coli* kann auf verschiedene Arten wirken. Beispielsweise könnte er *ori2* direkt beeinflussen oder mit RctB interagieren. Möglich wäre ebenfalls eine indirekte Regulation über Signalmoleküle oder zusätzliche Proteine. Um einen weiteren Interaktionspartner von *ori2* in *E. coli* zu finden, wäre, wie bereits in Kapitel 6.1.1 beschrieben, eine Methode zur Isolation und Identifizierung spezifischer DNA-Sequenzen und aller an sie gebundener Proteine, *in vivo* oder *in vitro*, gut geeignet. Zur Identifikation von unbekanntem Interaktionspartnern von RctB in *E. coli* böte sich eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wie ein herkömmlicher Pulldown-Assay oder bakterieller Two-Hybrid an (Datta et al. 2015; Joung et al. 2000).

6.2 Systeme zur Untersuchung der DNA-Replikation von *V. cholerae* im Vergleich

Es gibt verschiedenste Methoden zur Untersuchung der DNA-Replikation in Bakterien. Die Aufteilung des Genoms von *V. cholerae* auf zwei Chromosomen stellt jedoch für die Anwendung einiger dieser Methoden eine Herausforderung dar. Wie kann die DNA-Replikation in einem Bakterium mit zwei Chromosomen analysiert werden? In dieser Arbeit wurden je nach Fragestellung vier verschiedene Systeme zur Untersuchung der DNA-Replikation von *V. cholerae* verwendet: Bichromosomale und monochromosomale *V. cholerae* sowie *E. coli* mit einem Replikationsursprung von *V. cholerae* auf dem Haupt- oder einem Minichromosom (Abbildung 6.1). Normalerweise verfügt *V. cholerae* über zwei Chromosomen unterschiedlicher Größe

(Abbildung 6.1A). Es gibt jedoch besondere Ausnahmen, bei denen beide Chromosomen zu einem fusioniert vorliegen (Abbildung 6.1B). Diese Fusion kann entweder natürlich stattfinden oder konstruiert werden und unter Erhalt oder Deletion von *ori2* erfolgen (Xie et al. 2017; Val et al. 2012). Da *ori2* in Gegenwart von RctB auch in *E. coli* funktionsfähig ist, kann *oriC* durch *ori2* ausgetauscht werden, um ein *ori2*-basiertes monochromosomales Genom in *E. coli* zu erhalten (Abbildung 6.1C). Weiterhin kann *ori2* als Basis für Minichromosomen in *E. coli* dienen (Abbildung 6.1D), welche ein weitverbreitetes System zur Untersuchung von Replikationsursprüngen darstellen.

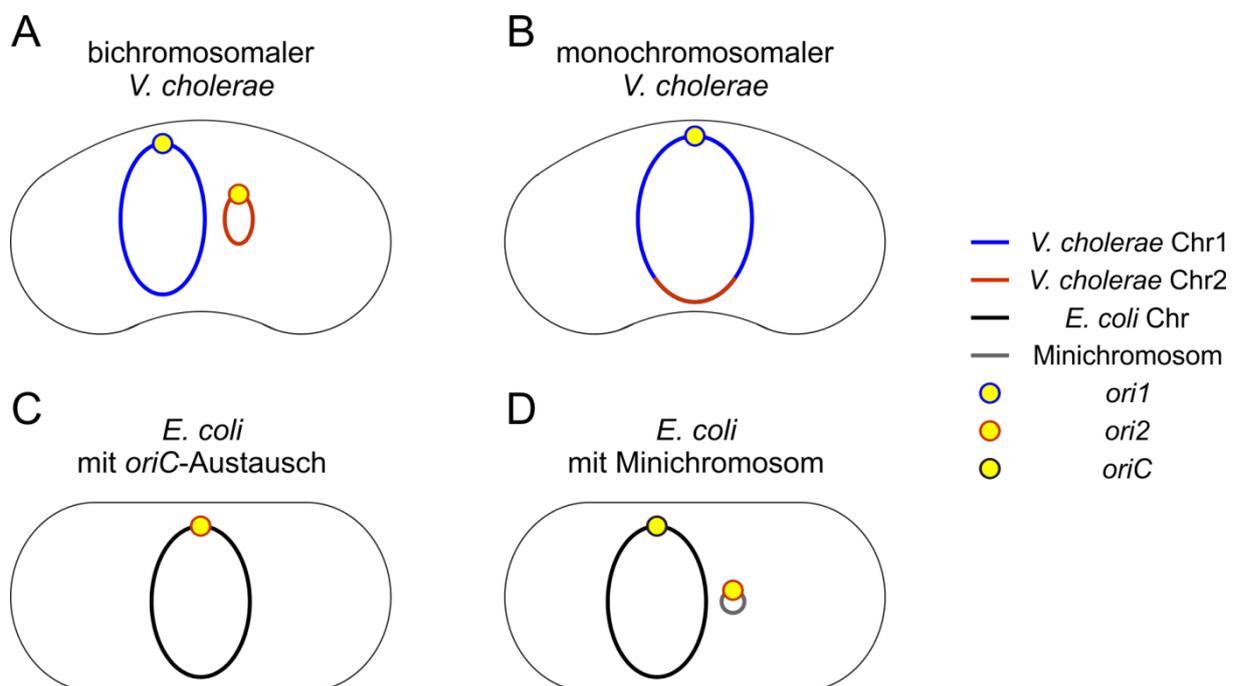


Abbildung 6.1: Verschiedene Systeme zur Untersuchung der DNA-Replikation in *V. cholerae*. (A) *V. cholerae* mit zwei Chromosomen jeweils unter der Kontrolle von *ori1* und *ori2*. (B) *V. cholerae* mit einem fusionierten Chromosom unter der Kontrolle von *ori1*. (C) *E. coli* mit einem Austausch von *oriC* durch *ori2*. (D) *E. coli* mit einem *ori2*-basierten Minichromosom. Chromosomen sind durch Ellipsen dargestellt, Replikationsursprünge durch gelb gefüllte Kreise. Chr1 und *ori1* sind blau markiert, Chr2 und *ori2* rot, das Chromosom von *E. coli* und *oriC* schwarz. Minichromosom-DNA ist grau dargestellt.

Welches System ist nun für welche Fragestellung sinnvoll? Bei globalen Fragen zur DNA-Replikation in *V. cholerae*, welche keine für die DNA-Replikation kritischen Mutationen erfordern, sind bichromosomale *V. cholerae* das System der Wahl. So wurde in dieser Arbeit beispielsweise der Effekt der Stringent Response auf die DNA-Replikation in *V. cholerae* mit dem bichromosomalen Stamm A1552 untersucht (Kapitel 5.2). Die Zunahme des DNA-Gehalts durch die DNA-Replikation während der SR konnte mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden. Da

jedoch in den so erhaltenen DNA-Histogrammen nicht zwischen Chr1 und Chr2 unterschieden werden kann, war für die Einzelanalyse der DNA-Replikation beider Chromosomen eine Markerfrequenzanalyse notwendig. Ein weiteres Beispiel für die Verwendung von bichromosomalen *V. cholerae* bzw. Vibrionaceae ist die Untersuchung der Frage, ob die Terminationssynchronie in den Vibrionaceae konserviert ist (Kapitel 5.1). Für diese Untersuchung mittels MFA eignen sich nur bichromosomale Vibrionaceae, da die Aufteilung des Genoms auf zwei Chromosomen hier ein essentieller Bestandteil der Fragestellung ist.

Eine Deletion von *ori2*, beispielsweise zur Beantwortung der Frage, ob die DNA-Replikation während der SR von *ori2* abhängt (Kapitel 5.2), ist mit bichromosomalen *V. cholerae* nicht möglich. Da die Replikation von Chr2 von *ori2* abhängt, und Verlust von Chr2 zum Tod der Zelle führt, ist eine solche Deletion in bichromosomalen *V. cholerae* letal (Yamaichi, Fogel, and Waldor 2007). Möglich ist sie jedoch in monochromosomalen *V. cholerae* wie MCH1, da hier das gesamte Genom von *ori1* aus repliziert werden kann (Val et al. 2012).

Auch Untersuchungen zur Funktion und Regulation von *ori2*, welche einen Funktionsverlust von *ori2* zur Folge haben könnten, sind aus den soeben beschriebenen Gründen mit bichromosomalen *V. cholerae* nicht möglich. Hier können wieder monochromosomale *V. cholerae* eingesetzt werden. So konnte untersucht werden, ob eine Initiation der DNA-Replikation an *ori2* stattfindet, wenn die Kopienanzahl der *crtS* unter der von *ori2* liegt (Kapitel 5.5). Wenn nur einzelne Bereiche von *ori2* oder einzelne Regulatoren analysiert werden sollen, ist die Verwendung von *ori2*-basierten Minichromosomen in *E. coli* sinnvoll. Diese sind einfach zu konstruieren und ihre Funktionsfähigkeit lässt sich durch ihre Transformierbarkeit in *E. coli* bestimmen. Die Kopienanzahl von Minichromosomen verschiedener *E. coli*-Stämme lässt sich durch einen einfachen Wachstumstest vergleichen (Kapitel 5.3). Mittels *ori2*-basierter Minichromosomen konnte untersucht werden, welche Auswirkungen Manipulationen der essentiellen DnaA-Box in *ori2* auf die Funktionsfähigkeit von *ori2* haben (Kapitel 5.4). Außerdem konnte durch die Erhöhung der Kopienanzahl von *ori2*-basierten Minichromosomen durch Anwesenheit der *crtS* in *E. coli* sowohl die Funktionsfähigkeit der *crtS* als auch die Kompatibilität von *ori2* und *crtS* verschiedener Vibrionaceae analysiert werden (Kapitel 5.1, 5.4, 5.5).

Untersuchungen von *ori2* ohne Anwesenheit eines anderen Replikationsursprungs, beispielsweise zur Abhängigkeit von *ori2* von Dam, SeqA oder DnaA, sind nur in *E. coli* Stämmen möglich, bei denen *oriC* durch *ori2* ausgetauscht wurde (Kapitel 5.4). Die Konstruktion eines monochromosomalen *ori2*-basierten *V. cholerae*-Stamms ohne Mutationen in *rctB* ist nicht möglich, da die Initiation der DNA-Replikation an *ori2* in *V. cholerae* von der Verdopplung der *crtS* abhängt.

Die vier beschriebenen Systeme können nicht nur in der Untersuchung der DNA-Replikation von *V. cholerae*, sondern auch in der Untersuchung aller anderen *chromosome maintenance*-Systeme wie beispielsweise Segregation der Chromosomen, DNA-Reparaturmechanismen, oder Chromosomenfaltung zur Anwendung kommen. Ein weiteres hierfür geeignetes System sind synthetische Chromosomen. Diese Chromosomen sind künstlich hergestellt und können sowohl aus vorgefertigten DNA-Bausteinen assembliert als auch aus natürlichen Chromosomen editiert werden (Gibson et al. 2010; Lajoie et al. 2013). Durch die sinkenden Kosten der DNA-Synthese und verschiedener neuer Methoden der DNA-Assemblierung wie beispielsweise Gibson-Assembly (Gibson et al. 2009), homologe Rekombination in Hefe (Gibson 2009) oder MoClo (Weber et al. 2011; Werner et al. 2012), wird die Neusynthese eines Chromosoms im Vergleich zur Editierung eines bestehenden Chromosoms immer attraktiver (Schindler and Waldminghaus 2015). Eine Verbindung beider Ansätze ist der schrittweise Austausch chromosomaler Bereiche durch neusynthetisierte Abschnitte (Annaluru et al. 2014; Hutchison et al. 2016; Ostrov et al. 2016). Das Überleben einer Zelle, welche allein auf einem primären synthetischen Chromosom basiert, ist unter anderem von diesem Chromosom und somit von der Funktionsfähigkeit aller seiner essentiellen Bestandteile abhängig. Die Verwendung eines sekundären synthetischen Chromosoms, zusätzlich zum nativen primären Chromosom, mildert die Abhängigkeit der Zelle vom synthetischen Chromosom. Getreu dem in der synthetischen Biologie beliebten Zitat „What I cannot create, I do not understand“ (Richard Feynman, 1988) kann die Konstruktion synthetischer Chromosomen zur Überprüfung und Gewinnung von Wissen über Aufbau und Funktion von Chromosomen und *chromosome maintenance*-Systemen genutzt werden (Schindler and Waldminghaus 2015). Aus der Untersuchung synthetischer Chromosomen gewonnene Erkenntnisse können zu ihrer Weiterentwicklung verwendet werden, beispielsweise zur Erzeugung eines synthetischen minimalen Chromosoms (Hutchison et al. 2016). Synthetische Chromosomen gewähren maximale Designfreiheit, was Verwendung und Anordnung von Genen oder DNA-Motiven angeht, vorausgesetzt, die Funktionsfähigkeit des Chromosoms bleibt erhalten. Somit sind für eine Untersuchung verschiedenster *chromosome maintenance*-Systeme durch die Verwendung synthetischer Chromosomen Manipulation in einer Menge möglich, die mit herkömmlichen Methoden nicht oder nur sehr schwer zu erreichen sind. Dies betrifft unter anderem die Deletion, Insertion, Mutation oder Neuordnung von Genen und Genbestandteilen, DNA-Bindestellen und anderen DNA-Sequenzen in großem Maßstab. Ein Beispiel hierfür ist die Generierung eines *E. coli*-Stammes mit nur 57 anstatt 64 Codons (Ostrov et al. 2016). Ein weiteres Beispiel ist die Untersuchung des Einflusses der Verteilung von GATC-Sequenzen in nichtcodierenden Regionen auf einem synthetischen Chromosom auf die Bindung des

Sequestrators SeqA und des Reparaturproteins MutH und somit auf die Mutationsrate dieses Chromosoms (Schindler et al, in Vorbereitung).

6.3 Fazit

Im Gegensatz zur Replikation von nur einem Chromosom erfordert die Replikation zweier verschiedener Chromosomen in Bakterien, wie im bichromosomalen *V. cholerae*, ein großes Maß an Koordination zweier Regulationssysteme. Einblicke in diese beiden Regulationssysteme und ihrer Koordination leisten einen wichtigen Beitrag zum allgemeinen Verständnis der Regulation der DNA-Replikation in Bakterien. In der Umkehrung des bekannten Zitats von Richard Feynman zu „What I do not understand, I cannot create“ ist dieses Verständnis der Schlüssel zur Entwicklung und Konstruktion synthetischer primärer und sekundärer Chromosomen.

7. Zusammenfassung

Vibrio cholerae ist aufgrund der Aufteilung seines Genoms auf zwei Chromosomen ein bekannter Modellorganismus für Bakterien mit mehrteiligen Genomen. Der Replikationsursprung des zweiten Chromosoms, *ori2*, bildet eine ideale Grundlage für die Entwicklung eines synthetischen sekundären Chromosoms in monochromosomalen Bakterien wie *E. coli*. Die Regulation der Initiation der DNA-Replikation, vor allem des zweiten Chromosoms, und die Koordination der Replikation beider Chromosomen in *V. cholerae* sind jedoch noch immer nicht vollständig verstanden. Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Erweiterung dieses Verständnisses leisten.

Die Koordination der Replikation von Chr1 und Chr2 in *V. cholerae* erfolgt durch die *chr2 replication triggering site crtS* auf Chr1, da Replikation der *crtS* die Initiation der DNA-Replikation an *ori2* induziert (Val et al. 2016). Die Kopienanzahl *ori2*-basierter Replikons, wie des synthetischen sekundären Chromosoms synVicII, ist in *E. coli* nach Integration der *crtS* in das Hauptchromosom erhöht. Dieser Effekt konnte genutzt werden, um die Funktionsfähigkeit der *crtS* verschiedener *V. cholerae*-Stämme zu untersuchen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die *crtS* in den Vibrionaceae konserviert ist. Die *crtS* und *ori2* verschiedener Vibrionaceae sind in *E. coli* bis auf wenige Ausnahmen kompatibel. Zusätzlich zeigten alle untersuchten Vibrionaceae sowohl den aus *V. cholerae* bekannten Replikationsverlauf *ori1-crtS-ori2* als auch eine zeitgleiche Termination der Replikation beider Chromosomen. Weiterhin konnte eine Methode zur Synchronisation der DNA-Replikation in *V. cholerae* durch Serinhydroxamat (SHX) etabliert werden. Im Zuge dessen wurde der verwendete Stamm *V. cholerae* A1552 vollständig sequenziert und annotiert.

Behandlung von *V. cholerae* mit SHX führt zur Induktion der Stringent Response (SR) (Haralalka et al. 2003). Im Gegensatz zu *E. coli* zeigt *V. cholerae* während der SR einen genau definierten Ablauf von Zellteilungen und Re-Initiationen der DNA-Replikation. Dieser Ablauf wird durch die SR-induzierte Proteinbiosynthese und damit verbundenem Zellwachstum gesteuert und ist somit abhängig von der Produktion des Alarmons (p)ppGpp und dessen Regulation der Transkription. Zudem ist er von der verwendeten SHX-Konzentration abhängig, was sowohl experimentell als auch mittels eines mathematischen Modells gezeigt werden konnte.

8. Summary

Vibrio cholerae is, due to the distribution of its genome on two chromosomes, a commonly used model organism for bacteria with multipartite genomes. The origin of replication of its second chromosome, *ori2*, provides an ideal basis for the development of a synthetic secondary chromosome in monochromosomal bacteria like *E. coli*. The regulation of initiation of DNA replication, especially of the secondary chromosome, and the coordination of replication of both chromosomes in *V. cholerae* is still not fully understood. This work should contribute to this understanding.

The coordination of replication of Chr1 and Chr2 in *V. cholerae* is maintained by the *chr2* replication triggering site *crtS*, as replication of the *crtS* induces initiation of DNA replication at *ori2* (Val et al. 2016). The copy number of *ori2*-based replicons, like the synthetic secondary chromosome synVicII, is increased in *E. coli* after integration of the *crtS* into the main chromosome. This effect could be used to analyze the functionality of *crtS* of different *V. cholerae* strains. It was shown that the *crtS* is conserved among the Vibrionaceae. The *crtS* and *ori2* of different Vibrionaceae are, with few exceptions, compatible in *E. coli*. All analyzed Vibrionaceae showed the order of replication *ori1-crtS-ori2*, known from *V. cholerae*, and synchronous termination of replication of both chromosomes. Additionally, a method for synchronization of DNA replication in *V. cholerae* using serine hydroxamate (SHX) was established. During the course of these experiments, the used strain *V. cholerae* A1552 was completely sequenced and annotated.

Treatment of *V. cholerae* with SHX leads to induction of the stringent response (SR) (Haralalka et al. 2003). In contrast to *E. coli*, *V. cholerae* shows a defined program of cell division and re-initiation of DNA replication during SR. This program is controlled by the SR-induced protein biosynthesis and the resulting cell growth and is therefore dependent on the production of the alarmone (p)ppGpp and its regulation of transcription. Additionally, the program is dependent on the concentration of SHX, which was shown experimentally as well as by a mathematical model.

9. Literaturverzeichnis

- Adessi, C., G Matton, G Ayala, G Turcatti, J J Mermod, P Mayer, and E Kawashima. 2000. "Solid Phase DNA Amplification: Characterisation of Primer Attachment and Amplification Mechanisms." *Nucleic Acids Research* 28 (20): E87. <https://doi.org/10.1093/nar/28.20.e87>.
- Agirrezabala, Xabier, Israel S Fernández, Ann C Kelley, David Gil Cartón, Venki Ramakrishnan, and Mikel Valle. 2013. "The Ribosome Triggers the Stringent Response by RelA via a Highly Distorted TRNA." *EMBO Reports* 14 (9): 811–16. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.106>.
- Andersen, Jens Bo, Claus Sternberg, Lars Kongsbak Poulsen, Sara Petersen Bjørn, Michael Givskov, and Søren Molin. 1998. "New Unstable Variants of Green Fluorescent Protein for Studies of Transient Gene Expression in Bacteria New Unstable Variants of Green Fluorescent Protein for Studies of Transient Gene Expression in Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* (1998) 64 (6): 2240–46. <http://view.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603842>.
- Annaluru, Narayana, Héloïse Muller, Leslie A. Mitchell, Sivaprakash Ramalingam, Giovanni Stracquadanio, Sarah M. Richardson, Jessica S. Dymond, ... Srinivasan Chandrasegaran. 2014. "Total Synthesis of a Functional Designer Eukaryotic Chromosome." *Science (New York, N.Y.)* 344 (6179): 55–58. <https://doi.org/10.1126/science.1249252>.
- Atlung, T, E S Clausen, and F G Hansen. 1985. "Autoregulation of the DnaA Gene of Escherichia Coli K12." *Mol Gen Genet* 200 (3): 442–50. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2995766.
- Baek, Jong Hwan, and Dhruva K Chatteraj. 2014. "Chromosome I Controls Chromosome II Replication in Vibrio Cholerae." *PLoS Genetics* 10 (2): e1004184. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004184>.
- Battesti, Aurélie, and Emmanuelle Bouveret. 2006. "Acyl Carrier Protein/SpoT Interaction, the Switch Linking SpoT-Dependent Stress Response to Fatty Acid Metabolism." *Molecular Microbiology* 62 (4): 1048–63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05442.x>.
- Bigger, Joseph W. 1944. "Treatment of Staphylococcal Infections With Penicillin By Intermittent Sterilisation." *The Lancet* 244 (6320): 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)74210-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)74210-3).
- Bird, Robert E., Jacqueline Louarn, Jaime Martuscelli, and Lucien Caro. 1972. "Origin and Sequence of Chromosome Replication in Escherichia Coli." *Journal of Molecular Biology* 70 (3): 549–66. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(72\)90559-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(72)90559-1).
- Böhm, Kati, Fabian Meyer, Agata Rhomberg, Jörn Kalinowski, Catriona Donovan, and Marc Bramkamp. 2017. "Novel Chromosome Organization Pattern in Actinomycetales-Overlapping Replication Cycles Combined with Diploidy." *MBio* 8 (3): 1–18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00511-17>.
- Bramhill, David, and Arthur Kornberg. 1988a. "A Model for Initiation at Origins of DNA

- Replication.” *Cell* 54 (7): 915–18. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90102-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90102-X).
- Bramhill, David, and Arthur Kornberg. 1988b. “Duplex Opening by DnaA Protein at Novel Sequences in Initiation of Replication at the Origin of the E. Coli Chromosome.” *Cell* 52 (5): 743–55. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90412-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90412-6).
- Breier, A. M., H.-U. G. Weier, and N. R. Cozzarelli. 2005. “Independence of Replisomes in Escherichia Coli Chromosomal Replication.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (11): 3942–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500812102>.
- Brown, Larissa, Daniel Gentry, Thomas Elliott, and Michael Cashel. 2002. “DksA Affects PpGpp Induction of RpoS at a Translational Level.” *Journal of Bacteriology* 184 (16): 4455–65. <https://doi.org/10.1128/JB.184.16.4455-4465.2002>.
- Campbell, Joseph L., and Nancy Kleckner. 1990. “E. Coli OriC and the DnaA Gene Promoter Are Sequestered from Dam Methyltransferase Following the Passage of the Chromosomal Replication Fork.” *Cell* 62 (5): 967–79. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90271-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90271-F).
- Carr, Kevin M., and Jon M. Kaguni. 2001. “Stoichiometry of DnaA and DnaB Protein in Initiation at the Escherichia Coli Chromosomal Origin.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (48): 44919–25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107463200>.
- Cashel, M., and J Gallant. 1969. “Two Compounds Implicated in the Function of the RC Gene of Escherichia Coli.” *Nature* 221 (5183): 838–41.
- Cashel, M., and B Kalbacher. 1970. “The Control of Ribonucleic Acid Synthesis in Escherichia Coli. V. Characterization of a Nucleotide Associated with the Stringent Response.” *The Journal of Biological Chemistry* 245 (9): 2309–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4315151>.
- Cassler, M R, J E Grimwade, and A C Leonard. 1995. “Cell Cycle-Specific Changes in Nucleoprotein Complexes at a Chromosomal Replication Origin.” *The EMBO Journal* 14 (23): 5833–41. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=394701&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Chao, Michael C., Justin R. Pritchard, Yanjia J. Zhang, Eric J. Rubin, Jonathan Livny, Brigid M. Davis, and Matthew K. Waldor. 2013. “High-Resolution Definition of the Vibrio Cholerae Essential Gene Set with Hidden Markov Model-Based Analyses of Transposon-Insertion Sequencing Data.” *Nucleic Acids Research* 41 (19): 9033–48. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt654>.
- Chodavarapu, Sundari, Magdalena M. Felczak, Josette Rouvière Yaniv, and Jon M. Kaguni. 2008. “Escherichia Coli DnaA Interacts with HU in Initiation at the E. Coli Replication Origin.” *Molecular Microbiology* 67 (4): 781–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06094.x>.
- Chung, Yu Seon, Therese Brendler, Stuart Austin, and Alba Guarné. 2009. “Structural Insights into the Cooperative Binding of SeqA to a Tandem GATC Repeat.” *Nucleic Acids Research* 37 (10): 3143–52. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp151>.
- Ciaccia, Peter N., Revathy Ramachandran, and Dhruva K. Chatteraj. 2018. “A Requirement

- for Global Transcription Factor Lrp in Licensing Replication of *Vibrio Cholerae* Chromosome 2.” *Frontiers in Microbiology* 9 (September): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02103>.
- Cooper, S, and Charles E. Helmstetter. 1968. “Chromosome Replication and the Division Cycle of *Escherichia Coli* B/R.” *Journal of Molecular Biology* 31 (3): 519–40. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(81\)90042-1](https://doi.org/10.1016/0147-619X(81)90042-1).
- Coyer, J A, A Cabello-Pasini, H Swift, and R S Alberte. 1996. “N₂ Fixation in Marine Heterotrophic Bacteria: Dynamics of Environmental and Molecular Regulation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (8): 3575–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11607653>.
- D’Ari, R, R T Lin, and E B Newman. 1993. “The Leucine-Responsive Regulatory Protein: More than a Regulator?” *Trends in Biochemical Sciences* 18 (7): 260–63. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0968-0004\(93\)90177-O](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0968-0004(93)90177-O).
- Dalia, A. B., E. McDonough, and A. Camilli. 2014. “Multiplex Genome Editing by Natural Transformation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (24): 8937–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406478111>.
- Das, Bhabatosh, Ritesh Ranjan Pal, Satyabrata Bag, and Rupak K Bhadra. 2009. “Stringent Response in *Vibrio Cholerae*: Genetic Analysis of SpoT Gene Function and Identification of a Novel (p)PpGpp Synthetase Gene.” *Molecular Microbiology* 72 (2): 380–98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06653.x>.
- Datta, Asis, Ayushi Kamthan, and Mohan Kamthan. 2015. “A Simple Protocol to Detect Interacting Proteins by GST Pull down Assay Coupled with MALDI or LC-MS/MS Analysis.” *Protocol Exchange*, October. <https://doi.org/10.1038/protex.2015.093>.
- de Lemos Martins, Francisco, Florian Fournes, Maria-Vittoria Mazzuoli, Didier Mazel, and Marie-Eve Val. 2018. “*Vibrio Cholerae* Chromosome 2 Copy Number Is Controlled by the Methylation-Independent Binding of Its Monomeric Initiator to the Chromosome 1 CrtS Site.” *Nucleic Acids Research*, 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gky790>.
- Demarre, Gaëlle, and Dhruva K Chatteraj. 2010. “DNA Adenine Methylation Is Required to Replicate Both *Vibrio Cholerae* Chromosomes Once per Cell Cycle.” *PLoS Genetics* 6 (5): e1000939. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000939>.
- DeNapoli, Jessica, Ashley K. Tehranchi, and Jue D. Wang. 2013. “Dose-Dependent Reduction of Replication Elongation Rate by (p)PpGpp in *Escherichia Coli* and *Bacillus Subtilis*.” *Molecular Microbiology* 88 (March): 93–104. <https://doi.org/10.1111/mmi.12172>.
- Deng, Wu Guo, Ying Zhu, Alberto Montero, and Kenneth K. Wu. 2003. “Quantitative Analysis of Binding of Transcription Factor Complex to Biotinylated DNA Probe by a Streptavidin-Agarose Pulldown Assay.” *Analytical Biochemistry* 323 (1): 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.08.007>.
- Donachie, Wd. 1968. “Relationship between Cell Size and Time of Initiation of DNA Replication.” *Nature* 219: 1077–79. <https://doi.org/10.1038/2191077a0>.
- Dryselius, Rikard, Kaori Izutsu, Takeshi Honda, and Tetsuya Iida. 2008. “Differential

- Replication Dynamics for Large and Small *Vibrio* Chromosomes Affect Gene Dosage, Expression and Location.” *BMC Genomics* 9 (1): 559. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-559>.
- Duigou, Stéphane, Kristine G. Knudsen, Ole Skovgaard, Elizabeth S. Egan, Anders Løbner-Olesen, and Matthew K. Waldor. 2006. “Independent Control of Replication Initiation of the Two *Vibrio Cholerae* Chromosomes by DnaA and RctB.” *Journal of Bacteriology* 188 (17): 6419–24. <https://doi.org/10.1128/JB.00565-06>.
- Duigou, Stéphane, Yoshiharu Yamaichi, and Matthew K Waldor. 2008. “ATP Negatively Regulates the Initiator Protein of *Vibrio Cholerae* Chromosome II Replication.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (30): 10577–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803904105>.
- Durfee, Tim, Anne Marie Hansen, Huijun Zhi, Frederick R. Blattner, and Jun Jin Ding. 2008. “Transcription Profiling of the Stringent Response in *Escherichia Coli*.” *Journal of Bacteriology* 190 (3): 1084–96. <https://doi.org/10.1128/JB.01092-07>.
- Egan, Elizabeth S., Stéphane Duigou, and Matthew K. Waldor. 2006. “Autorepression of RctB , an Initiator of *Vibrio Cholerae* Chromosome II Replication.” *Journal of Bacteriology* 188 (2): 789–93. <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.789>.
- Egan, Elizabeth S., Anders Løbner-Olesen, and Matthew K Waldor. 2004. “Synchronous Replication Initiation of the Two *Vibrio Cholerae* Chromosomes.” *Current Biology : CB* 14 (13): R501-2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.036>.
- Egan, Elizabeth S., and Matthew K. Waldor. 2003. “Distinct Replication Requirements for the Two *Vibrio Cholerae* Chromosomes.” *Cell* 114: 521–30. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867403006111>.
- Fedurco, Milan, Anthony Romieu, Scott Williams, Isabelle Lawrence, and Gerardo Turcatti. 2006. “BTA, a Novel Reagent for DNA Attachment on Glass and Efficient Generation of Solid-Phase Amplified DNA Colonies.” *Nucleic Acids Research* 34 (3). <https://doi.org/10.1093/nar/gnj023>.
- Ferullo, Daniel J, Deani L Cooper, Hayley R Moore, and Susan T Lovett. 2009. “Cell Cycle Synchronization of *Escherichia Coli* Using the Stringent Response, with Fluorescence Labeling Assays for DNA Content and Replication.” *Methods (San Diego, Calif.)* 48 (1): 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.02.010>.
- Ferullo, Daniel J, and Susan T Lovett. 2008. “The Stringent Response and Cell Cycle Arrest in *Escherichia Coli*.” *PLoS Genetics* 4 (12): e1000300. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000300>.
- Fidopiastis, Pat M., Sigurd Von Boletzky, and Edward G. Ruby. 1998. “A New Niche for *Vibrio Logei*, the Predominant Light Organ Symbiont of Squids in the Genus *Sepiola*.” *Journal of Bacteriology* 180 (1): 59–64.
- Fujimitsu, Kazuyuki, Takayuki Senriuchi, and Tsutomu Katayama. 2009. “Specific Genomic Sequences of *E. Coli* Promote Replication Initiation by Directly Reactivating ADP-DnaA.” *Genes & Development* 23 (10): 1221–33. <https://doi.org/10.1101/gad.1775809>.
- Fuller, Robert S., Barbara E. Funnell, and Arthur Kornberg. 1984. “The DnaA Protein

- Complex with the E. Coli Chromosomal Replication Origin (OriC) and Other DNA Sites.” *Cell* 38 (3): 889–900. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90284-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90284-8).
- Gentry, D. R., V. J. Hernandez, L. H. Nguyen, D. B. Jensen, and M. Cashel. 1993. “Synthesis of the Stationary-Phase Sigma Factor Sigma s Is Positively Regulated by PpGpp.” *Journal of Bacteriology* 175 (24): 7982–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253685>.
- Gibson, Daniel G. 2009. “Synthesis of DNA Fragments in Yeast by One-Step Assembly of Overlapping Oligonucleotides.” *Nucleic Acids Research* 37 (20): 6984–90. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp687>.
- Gibson, Daniel G, John I Glass, Carole Lartigue, Vladimir N Noskov, Ray-Yuan Chuang, Mikkel A Algire, Gwynedd A Benders, ... J Craig Venter. 2010. “Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome.” *Science* 329 (5987): 52–56. <https://doi.org/10.1126/science.1190719>.
- Gibson, Daniel G, Lei Young, Ray-Yuan Chuang, J Craig Venter, Clyde A III Hutchison, and Hamilton O Smith. 2009. “Enzymatic Assembly of DNA Molecules up to Several Hundred Kilobases.” *Nature Methods* 6 (5): 12–16. <https://doi.org/10.1038/NMETH.1318>.
- Gille, Hendrik, J. Barry Egan, Angelika Roth, and Walter Messer. 1991. “The FIS Protein Binds and Bends the Origin of Chromosomal DNA Replication, OriC, of Escherichia Coli.” *Nucleic Acids Research* 19 (15): 4167–72. <https://doi.org/10.1093/nar/19.15.4167>.
- Haralalka, Shruti, Suvobroto Nandi, and Rupak K Bhadra. 2003. “Mutation in the RelA Gene of Vibrio Cholerae Affects In Vitro and In Vivo Expression of Virulence Factors Mutation in the RelA Gene of Vibrio Cholerae Affects In Vitro and In Vivo Expression of Virulence Factors.” <https://doi.org/10.1128/JB.185.16.4672>.
- Haseltine, W. A., and R. Block. 1973. “Synthesis of Guanosine Tetra- and Pentaphosphate Requires the Presence of a Codon-Specific, Uncharged Transfer Ribonucleic Acid in the Acceptor Site of Ribosomes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70 (5): 1564–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.5.1564>.
- Haseltine, W A, R Block, W Gilbert, and K Weber. 1972. “MSI and MSII Made on Ribosome in Idling Step of Protein Synthesis.” *Nature* 238 (5364): 381–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4559580>.
- He, Huajun, Jennifer N Cooper, Arunima Mishra, and David M Raskin. 2012. “Stringent Response Regulation of Biofilm Formation in Vibrio Cholerae.” *Journal of Bacteriology* 194 (11): 2962–72. <https://doi.org/10.1128/JB.00014-12>.
- Heath, R. J., S. Jackowski, and C. O. Rock. 1994. “Guanosine Tetrphosphate Inhibition of Fatty Acid and Phospholipid Synthesis in Escherichia Coli Is Relieved by Overexpression of Glycerol-3- Phosphate Acyltransferase (PlsB).” *Journal of Biological Chemistry* 269 (42): 26584–90.
- Heidelberg, J. F., K. B. Heidelberg, and R. R. Colwell. 2002. “Bacteria of the γ -Subclass Proteobacteria Associated with Zooplankton in Chesapeake Bay.” *Applied and Environmental Microbiology* 68 (11): 5498–5507. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5498-5507.2002>.

- Hill, Norbert S, Ryosuke Kadoya, Dhruva K Chatteraj, and Petra Anne Levin. 2012. "Cell Size and the Initiation of DNA Replication in Bacteria." *PLoS Genetics* 8 (3): e1002549. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002549>.
- Hiraga, S. 1976. "Novel F Prime Factors Able to Replicate in Escherichia Coli Hfr Strains." *Proc Natl Acad Sci U S A* 73 (1): 198–202. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.1.198>.
- Holland, P M, R D Abramson, R Watson, and D H Gelfand. 1991. "Detection of Specific Polymerase Chain-Reaction Product By Utilizing the 5'-]3' Exonuclease Activity of Thermus-Aquaticus Dna-Polymerase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16): 7276–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7276>.
- Hutchison, Clyde A., Ray Yuan Chuang, Vladimir N. Noskov, Nacyra Assad-Garcia, Thomas J. Deerinck, Mark H. Ellisman, John Gill, ... J. Craig Venter. 2016. "Design and Synthesis of a Minimal Bacterial Genome." *Science* 351 (6280). <https://doi.org/10.1126/science.aad6253>.
- Inuzuka, M, and D R Helinski. 1978. "Requirement of a Plasmid-Encoded Protein for Replication in Vitro of Plasmid R6K." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (11): 5381–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.11.5381>.
- Ip, Stephen C Y, Migena Bregu, François Xavier Barre, and David J. Sherratt. 2003. "Decatenation of DNA Circles by FtsK-Dependent Xer Site-Specific Recombination." *EMBO Journal* 22 (23): 6399–6407. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg589>.
- Ishida, Takuma, Nobuyoshi Akimitsu, Tamami Kashioka, Masakazu Hatano, Toshio Kubota, Yasuyuki Ogata, Kazuhisa Sekimizu, and Tsutomu Katayama. 2004. "DiaA, a Novel DnaA-Binding Protein, Ensures the Timely Initiation of Escherichia Coli Chromosome Replication." *Journal of Biological Chemistry* 279 (44): 45546–55. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402762200>.
- Jha, Jyoti K., Jong Hwan Baek, Tatiana Venkova-Canova, and Dhruva K. Chatteraj. 2012. "Chromosome Dynamics in Multichromosome Bacteria." *Biochimica et Biophysica ...* 1819 (7): 826–29. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.01.012.Chromosome>.
- Jha, Jyoti K, Gaëlle Demarre, Tatiana Venkova-Canova, and Dhruva K Chatteraj. 2012. "Replication Regulation of Vibrio Cholerae Chromosome II Involves Initiator Binding to the Origin Both as Monomer and as Dimer." *Nucleic Acids Research* 40 (13): 6026–38. <https://doi.org/10.1093/nar/gks260>.
- Jha, Jyoti K, Mi Li, Rodolfo Ghirlando, Lisa M Miller Jenkins, Alexander Wlodawer, and Dhruva Chatteraj. 2017. "The DnaK Chaperone Uses Different Mechanisms To Promote and Inhibit Replication of Vibrio Cholerae Chromosome 2." *MBio* 8 (2): 1–20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00427-17>.
- Joung, J. K., E. I. Ramm, and C. O. Pabo. 2000. "A Bacterial Two-Hybrid Selection System for Studying Protein-DNA and Protein-Protein Interactions." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (13): 7382–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.110149297>.
- Kadoya, Ryosuke, and DK Chatteraj. 2012. "Insensitivity of Chromosome I and the Cell

- Cycle to Blockage of Replication and Segregation of *Vibrio Cholerae* Chromosome II.” *MBio* 3 (3): 1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00067-12>. Editor.
- Kato, Jun Ichi, and Tsutomu Katayama. 2001. “Hda, a Novel DnaA-Related Protein, Regulates the Replication Cycle in *Escherichia Coli*.” *EMBO Journal* 20 (15): 4253–62. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.4253>.
- Kawakami, Hironori, Kenji Keyamura, and Tsutomu Katayama. 2005. “Formation of an ATP-DnaA-Specific Initiation Complex Requires DnaA Arginine 285, a Conserved Motif in the AAA+ Protein Family.” *The Journal of Biological Chemistry* 280 (29): 27420–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502764200>.
- Keyamura, Kenji, Yoshito Abe, Masahiro Higashi, Tadashi Ueda, and Tsutomu Katayama. 2009. “DiaA Dynamics Are Coupled with Changes in Initial Origin Complexes Leading to Helicase Loading.” *Journal of Biological Chemistry* 284 (37): 25038–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.002717>.
- Kim, Sungsub, H. Garry Dallmann, Charles S. McHenry, and Kenneth J. Marians. 1996. “Coupling of a Replicative Polymerase and Helicase: A τ -DnaB Interaction Mediates Rapid Replication Fork Movement.” *Cell* 84 (4): 643–50. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81039-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81039-9).
- Kitagawa, Risa, Toru Ozaki, Shigeki Moriya, and Tohru Ogawa. 1998. “Negative Control of Replication Initiation by a Novel Chromosomal Locus Exhibiting Exceptional Affinity for *Escherichia Coli* DnaA Protein.” *Genes and Development* 12 (19): 3032–43. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.3032>.
- Koch, Birgit, Xiaofang Ma, and Anders Løbner-Olesen. 2012. “RctB Mutations That Increase Copy Number of *Vibrio Cholerae* OriCII in *Escherichia Coli*.” *Plasmid* 68 (3): 159–69. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.03.003>.
- Korch, Shaleen B., Thomas A. Henderson, and Thomas M. Hill. 2003. “Characterization of the HipA7 Allele of *Escherichia Coli* and Evidence That High Persistence Is Governed by (p)PpGpp Synthesis.” *Molecular Microbiology* 50 (4): 1199–1213. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03779.x>.
- Krause, M., and W. Messer. 1999. “DnaA Proteins of *Escherichia Coli* and *Bacillus Subtilis*: Coordinate Actions with Single-Stranded DNA-Binding Protein and Interspecies Inhibition during Open Complex Formation at the Replication Origins.” *Gene* 228 (1–2): 123–32. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00009-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00009-8).
- Kriel, Allison, Alycia N. Bittner, Sok Ho Kim, Kuanqing Liu, Ashley K. Tehranchi, Winnie Y. Zou, Samantha Rendon, Rui Chen, Benjamin P. Tu, and Jue D. Wang. 2012. “Direct Regulation of GTP Homeostasis by (p)PpGpp: A Critical Component of Viability and Stress Resistance.” *Molecular Cell* 48 (2): 231–41. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.009>.
- Kvint, Kristian, Anne Farewell, and T Nyström. 2000. “RpoS-Dependent Promoters Require Guanosine Tetraphosphate for Induction Even in the Presence of High Levels of Sigma(S).” *The Journal of Biological Chemistry* 275 (20): 14795–98. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000128200>.
- Laffler, Thomas, and Jonathan Gallant. 1974. “SpoT, a New Genetic Locus Involved in the

- Stringent Response in *E. Coli*.” *Cell* 1 (1): 27–30. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(74\)90151-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(74)90151-2).
- Lajoie, Marc J, Alexis J Rovner, Daniel B Goodman, Hans-rudolf Aerni, Adrian D Haimovich, Gleb Kuznetsov, Jaron a Mercer, Harris H Wang, Peter a Carr, Joshua a Mosberg, Nadin Rohland, Peter G Schultz, Joseph M Jacobson, Jesse Rinehart, George M Church, and Farren J Isaacs. 2013. “Genomically Recoded Organisms Expand Biological Functions.” *Science (New York, N.Y.)* 342 (6156): 357–60. <https://doi.org/10.1126/science.1241459>.
- Landgraf, Jeffrey R., W. U. Jingcai, and Joseph M. Calvo. 1996. “Effects of Nutrition and Growth Rate on Lrp Levels in *Escherichia Coli*.” *Journal of Bacteriology* 178 (23): 6930–36. <https://doi.org/10.1128/jb.178.23.6930-6936.1996>.
- Lemke, Justin J, Tim Durfee, and Richard L Gourse. 2009. “DksA and PpGpp Directly Regulate Transcription of the *Escherichia Coli* Flagellar Cascade.” *Molecular Microbiology* 74 (6): 1368–79. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06939.x>.
- Levine, Alain, Françoise Vannier, Mohammed Dehbi, Gilles Henckes, and Simone J. Séror. 1991. “The Stringent Response Blocks DNA Replication Outside the Ori Region in *Bacillus Subtilis* and at the Origin in *Escherichia Coli*.” *Journal of Molecular Biology* 219 (4): 605–13. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90657-R](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90657-R).
- Lintner, Robert E., Pankaj K. Mishra, Poonam Srivastava, Betsy M. Martinez-Vaz, Arkady B. Khodursky, and Robert M. Blumenthal. 2008. “Limited Functional Conservation of a Global Regulator among Related Bacterial Genera: Lrp in *Escherichia*, *Proteus* and *Vibrio*.” *BMC Microbiology* 8: 1–26. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-60>.
- Liu, Shuang, Nan Wu, Shanshan Zhang, Youhua Yuan, Wenhong Zhang, and Ying Zhang. 2017. “Variable Persister Gene Interactions with (p)PpGpp for Persister Formation in *Escherichia Coli*.” *Frontiers in Microbiology* 8 (SEP): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01795>.
- Løbner-Olesen, Anders, Kirsten Skarstad, Flemming G. Hansen, Kaspar von Meyenburg, and Erik Boye. 1989. “The DnaA Protein Determines the Initiation Mass of *Escherichia Coli* K-12.” *Cell* 57 (5): 881–89. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90802-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90802-7).
- Lu, Min, Joseph L. Campbell, Erik Boye, and Nancy Kleckner. 1994. “SeqA: A Negative Modulator of Replication Initiation in *E. Coli*.” *Cell* 77 (3): 413–26. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90156-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90156-2).
- Maaløe, O, and P C Hanawalt. 1961. “Thymine Deficiency and the Normal DNA Replication Cycle. I.” *Journal of Molecular Biology* 3 (2): 144–55. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80041-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80041-7).
- McGarry, K. C., V. T. Ryan, J. E. Grimwade, and A. C. Leonard. 2004. “Two Discriminatory Binding Sites in the *Escherichia Coli* Replication Origin Are Required for DNA Strand Opening by Initiator DnaA-ATP.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (9): 2811–16. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400340101>.
- Meibom, Karin L, Melanie Blokesch, Nadia a Dolganov, Cheng-Yen Wu, and Gary K Schoolnik. 2005. “Chitin Induces Natural Competence in *Vibrio Cholerae*.” *Science (New York, N.Y.)* 310 (5755): 1824–27. <https://doi.org/10.1126/science.1120096>.

- Mercier, Romain, Marie Agnès Petit, Sophie Schbath, Stéphane Robin, Meriem El Karoui, Frédéric Boccard, and Olivier Espéli. 2008. “The MatP/MatS Site-Specific System Organizes the Terminus Region of the E. Coli Chromosome into a Macrodomain.” *Cell* 135 (3): 475–85. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.031>.
- Messer, W., H. E.N. Bergmans, M. Meijer, J. E. Womack, F. G. Hansen, and K. von Meyenburg. 1978. “Mini-Chromosomes: Plasmids Which Carry the E. Coli Replication Origin.” *MGG Molecular & General Genetics* 162 (3): 269–75. <https://doi.org/10.1007/BF00268852>.
- Messerschmidt, S. J., F. S. Kemter, D. Schindler, and Torsten Waldminghaus. 2014. “Synthetic Secondary Chromosomes in Escherichia Coli Based on the Replication Origin of Vibrio Cholerae Chromosome II.” *Biotechnology Journal*.
- Milbredt, Sarah, and Torsten Waldminghaus. 2017. “BiFCROS: A Low Background Fluorescence Repressor Operator System for Labeling of Genomic Loci.” *G3: Genes/Genomes/Genetics* 7 (June): g3.117.040782. <https://doi.org/10.1534/g3.117.040782>.
- Mitkevich, Vladimir A., Andrey Ermakov, Alexandra A. Kulikova, Stoyan Tankov, Viktoriya Shyp, Aksel Soosaar, Tanel Tenson, Alexander A. Makarov, Mans Ehrenberg, and Vasili Haurlyuk. 2010. “Thermodynamic Characterization of PpGpp Binding to EF-G or IF2 and of Initiator tRNA Binding to Free IF2 in the Presence of GDP, GTP, or PpGpp.” *Journal of Molecular Biology* 402 (5): 838–46. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.08.016>.
- Murray, Daniel K., and Hans Bremer. 1996. “Control of SpoT-Dependent PpGpp Synthesis and Degradation in Escherichia Coli.” *Journal of Molecular Biology* 259 (1): 41–57. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0300>.
- My, Laetitia, Brian Rekoske, Justin J. Lemke, Julie P. Viala, Richard L. Gourse, and Emmanuelle Bouveret. 2013. “Transcription of the Escherichia Coli Fatty Acid Synthesis Operon FabHDG Is Directly Activated by FadR and Inhibited by PpGpp.” *Journal of Bacteriology* 195 (16): 3784–95. <https://doi.org/10.1128/JB.00384-13>.
- Nanamiya, Hideaki, Koji Kasai, Akira Nozawa, Choong-Soo Yun, Takakuni Narisawa, Kana Murakami, Yousuke Natori, Fujio Kawamura, and Yuzuru Tozawa. 2007. “Identification and Functional Analysis of Novel (p)PpGpp Synthetase Genes in Bacillus Subtilis.” *Molecular Microbiology* 67 (2): 291–304. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06018.x>.
- Nievera, Christian, J. J C Torgue, Julia E Grimwade, and Alan C. Leonard. 2006. “SeqA Blocking of DnaA-OriC Interactions Ensures Staged Assembly of the E. Coli Pre-RC.” *Molecular Cell* 24 (4): 581–92. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.09.016>.
- Ogawa, T, T a Baker, a van der Ende, and a Kornberg. 1985. “Initiation of Enzymatic Replication at the Origin of the Escherichia Coli Chromosome: Contributions of RNA Polymerase and Primase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (June): 3562–66. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.11.3562>.
- Oh, Young Taek, Yongjin Park, Mi Young Yoon, Wasimul Bari, Junhyeok Go, Kyung Bae Min, David M Raskin, Kang-Mu Lee, and Sang Sun Yoon. 2014. “Cholera Toxin Production during Anaerobic Trimethylamine N-Oxide Respiration Is Mediated by

- Stringent Response in *Vibrio Cholerae*.” *The Journal of Biological Chemistry* 289 (19): 13232–42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.540088>.
- Okada, Kazuhisa, Tetsuya Iida, Kumiko Kita-Tsukamoto, and Takeshi Honda. 2005. “Vibrios Commonly Possess Two Chromosomes.” *Journal of Bacteriology* 187 (2): 752–57. <https://doi.org/10.1128/JB.187.2.752-757.2005>.
- Orlova, Natalia, Matthew Gerding, Olha Ivashkiv, Paul Dominic B. Olinares, Brian T. Chait, Matthew K. Waldor, and David Jeruzalmi. 2016. “The Replication Initiator of the Cholera Pathogen’s Second Chromosome Shows Structural Similarity to Plasmid Initiators.” *Nucleic Acids Research*, gkw1288. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1288>.
- Orr, Elisha, Neil F Fairweather, I Barry Holland, and Robert H Pritchard. 1979. “Isolation and Characterisation of a Strain Carrying a Conditional Lethal Mutation in the *Cou* Gene of *Escherichia Coli* K12.” *Molecular & General Genetics: MGG* 177 (1): 103–12. <https://doi.org/10.1007/BF00267259>.
- Ortigosa, Margarita, Consuelo Esteve, and María-Jesús Pujalte. 1989. “*Vibrio* Species in Seawater and Mussels: Abundance and Numerical Taxonomy.” *Systematic and Applied Microbiology* 12 (3): 316–25. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(89\)80080-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(89)80080-3).
- Ostrov, Nili, Matthieu Landon, Marc Guell, Gleb Kuznetsov, Jun Teramoto, Natalie Cervantes, Minerva Zhou, ... George M. Church. 2016. “Design, Synthesis, and Testing toward a 57-Codon Genome.” *Science* 353 (6301): 819–22. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3639>.
- Pal, Debasish, Tatiana Venkova-Canova, Preeti Srivastava, and Dhruva K Chattoraj. 2005. “Multipartite Regulation of *RctB*, the Replication Initiator Gene of *Vibrio Cholerae* Chromosome II.” *Journal of Bacteriology* Vol 187, N: 7167–75. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7167>.
- Pal, Ritesh Ranjan, Satyabrata Bag, Shreya Dasgupta, Bhabatosh Das, and Rupak K. Bhadra. 2012. “Functional Characterization of the Stringent Response Regulatory Gene *DksA* of *Vibrio Cholerae* and Its Role in Modulation of Virulence Phenotypes.” *Journal of Bacteriology* 194 (20): 5638–48. <https://doi.org/10.1128/JB.00518-12>.
- Paul, Brian J., Melanie M. Barker, Wilma Ross, David A. Schneider, Cathy Webb, John W. Foster, and Richard L. Gourse. 2004. “*DksA*: A Critical Component of the Transcription Initiation Machinery That Potentiates the Regulation of *RRNA* Promoters by *PpGpp* and the Initiating *NTP*.” *Cell* 118 (3): 311–22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.009>.
- Paul, Brian J., M. B. Berkmen, and R. L. Gourse. 2005. “*DksA* Potentiates Direct Activation of Amino Acid Promoters by *PpGpp*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (22): 7823–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501170102>.
- Perkins, David N., Darryl J.C. Pappin, David M. Creasy, and John S. Cottrell. 1999. “Probability-Based Protein Identification by Searching Sequence Databases Using Mass Spectrometry Data.” *Electrophoresis* 20 (18): 3551–67. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19991201\)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2).
- Pinkel, Daniel, Richard Segreaves, Damir Sudar, Steven Clark, Ian Poole, David Kowbel, Colin Collins, Wen Lin Kuo, Chira Chen, Ye Zhai, Shanaz H. Dairkee, Britt Marie

- Ljung, Joe W. Gray, and Donna G. Albertson. 1998. "High Resolution Analysis of DNA Copy Number Variation Using Comparative Genomic Hybridization to Microarrays." *Nature Genetics* 20 (2): 207–11. <https://doi.org/10.1038/2524>.
- Ponchel, Frederique, Carmel Toomes, Kieran Bransfield, Fong T. Leong, Susan H. Douglas, Sarah L. Field, Sandra M. Bell, Valerie Combaret, Alain Puisieux, Alan J. Mighell, Philip A. Robinson, Chris F. Inglehearn, John D. Isaacs, and Alex F. Markham. 2003. "Real-Time PCR Based on SYBR-Green I Fluorescence: An Alternative to the TaqMan Assay for a Relative Quantification of Gene Rearrangements, Gene Amplifications and Micro Gene Deletions." *BMC Biotechnology* 3: 1–13. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>.
- Quinn, W G, and N Sueoka. 1970. "Symmetric Replication of the Bacillus Subtilis Chromosome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 67 (2): 717–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.67.2.717>.
- Ramachandran, Revathy, Peter N. Ciacca, Tara A. Filsuf, Jyoti K. Jha, and Dhruba K. Chattoraj. 2018. "Chromosome 1 Licenses Chromosome 2 Replication in Vibrio Cholerae by Doubling the CrtS Gene Dosage." *PLOS Genetics* 14 (5): e1007426. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007426>.
- Raskin, David M, Nicholas Judson, and John J Mekalanos. 2007. "Regulation of the Stringent Response Is the Essential Function of the Conserved Bacterial G Protein CgtA in Vibrio Cholerae." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (11): 4636–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611650104>.
- Rasmussen, Tue, Rasmus Bugge Jensen, and Ole Skovgaard. 2007. "The Two Chromosomes of Vibrio Cholerae Are Initiated at Different Time Points in the Cell Cycle." *The EMBO Journal* 26 (13): 3124–31. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601747>.
- Riemann, Lasse, and Farooq Azam. 2002. "Widespread N-Acetyl-D-Glucosamine Uptake among Pelagic Marine Bacteria and Its Ecological Implications." *Applied and Environmental Microbiology* 68 (11): 5554–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12406749>.
- Rojas, Ana Maria, Måns Ehrenberg, Siv G.E. Andersson, and C. G. Kurland. 1984. "PpGpp Inhibition of Elongation Factors Tu, G and Ts during Polypeptide Synthesis." *MGG Molecular & General Genetics* 197 (1): 36–45. <https://doi.org/10.1007/BF00327920>.
- Ross, Wilma, Patricia Sanchez-Vazquez, Albert Y. Chen, Jeong-Hyun Lee, Hector L. Burgos, and Richard L. Gourse. 2016. "PpGpp Binding to a Site at the RNAP-DksA Interface Accounts for Its Dramatic Effects on Transcription Initiation during the Stringent Response." *Molecular Cell*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.029>.
- Roux, Frédérique Le, K. Mathias Wegner, Craig Baker-Austin, Luigi Vezzulli, Carlos R. Osorio, Carmen Amaro, Jennifer M. Ritchie, Tom Defoirdt, Delphine Destoumieux-Garzón, Melanie Blokesch, Didier Mazel, Annick Jacq, Felipe Cava, Lone Gram, Carolin C. Wendling, Eckhard Strauch, Alexander Kirschner, and Stephan Huehn. 2015. "The Emergence of Vibrio Pathogens in Europe: Ecology, Evolution and Pathogenesis (Paris, 11-12 March 2015)." *Frontiers in Microbiology* 6 (JUL): 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00830>.
- Rozgaja, Tania A., Julia E. Grimwade, Maryam Iqbal, Christopher Czerwonka, Mansi Vora,

- and Alan C. Leonard. 2011. "Two Oppositely Oriented Arrays of Low-Affinity Recognition Sites in OriC Guide Progressive Binding of DnaA during Escherichiacoli Pre-RC Assembly." *Molecular Microbiology* 82 (2): 475–88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07827.x>.
- Ryan, Valorie T., Julia E. Grimwade, Johanna E. Camara, Elliott Crooke, and Alan C. Leonard. 2004. "Escherichia Coli Prereplication Complex Assembly Is Regulated by Dynamic Interplay among Fis, IHF and DnaA." *Molecular Microbiology* 51 (5): 1347–59. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03906.x>.
- Ryan, Valorie T., Julia E. Grimwade, Christian J. Nievera, and Alan C. Leonard. 2002. "IHF and HU Stimulate Assembly of Pre-Replication Complexes at Escherichia Coli OriC by Two Different Mechanisms." *Molecular Microbiology* 46 (1): 113–24. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03129.x>.
- Schindler, Daniel, and Torsten Waldminghaus. 2015. "Synthetic Chromosomes." *FEMS Microbiology Reviews* 39 (6): 871–91. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv030>.
- Seyfzadeh, M, J Keener, and M Nomura. 1993. "SpoT-Dependent Accumulation of Guanosine Tetrphosphate in Response to Fatty Acid Starvation in *Escherichia Coli*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (23): 11004–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11004>.
- Shyp, Viktoriya, Stoyan Tankov, Andrey Ermakov, Pavel Kudrin, Brian P English, Måns Ehrenberg, Tanel Tenson, Johan Elf, and Vasili Hauryliuk. 2012. "Positive Allosteric Feedback Regulation of the Stringent Response Enzyme RelA by Its Product." *EMBO Reports* 13 (9): 835–39. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.106>.
- Simmons, Lyle A., Magdalena Felczak, and Jon M. Kaguni. 2003. "DnaA Protein of Escherichia Coli: Oligomerization at the E. Coli Chromosomal Origin Is Required for Initiation and Involves Specific N-Terminal Amino Acids." *Molecular Microbiology* 49 (3): 849–58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03603.x>.
- Skarstad, Kirsten, Erik Boye, and HB Steen. 1986. "Timing of Initiation of Chromosome Replication in Individual Escherichia Coli Cells." *The EMBO Journal* 5 (7): 1711–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1166998/>.
- Skarstad, Kirsten, and Anders Løbner-Olesen. 2003. "Stable Co-Existence of Separate Replicons in Escherichia Coli Is Dependent on Once-per-Cell-Cycle Initiation." *EMBO Journal* 22 (1): 140–50. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg003>.
- Skovgaard, Ole, Mads Bak, Anders Løbner-Olesen, and Niels Tommerup. 2011. "Genome-Wide Detection of Chromosomal Rearrangements, Indels, and Mutations in Circular Chromosomes by Short Read Sequencing." *Genome Research* 21 (8): 1388–93. <https://doi.org/10.1101/gr.117416.110>.
- Snow, John. 1849. "On the Mode of Communication of Cholera." <http://resource.nlm.nih.gov/0050707>.
- Souza Silva, Olga De, and Melanie Blokesch. 2010. "Genetic Manipulation of *Vibrio Cholerae* by Combining Natural Transformation with FLP Recombination." *Plasmid* 64 (3): 186–95. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2010.08.001>.

- Steen, Harald B, Kirsten Skarstad, and E Boye. 1986. "Flow Cytometry of Bacteria: Cell Cycle Kinetics and Effects of Antibiotics." *Annals of the New York Academy of Sciences* 468: 329–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2942091>.
- Stent, G S, and S Brenner. 1961. "A Genetic Locus for the Regulation of Ribonucleic Acid Synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 47 (12): 2005–14. <https://doi.org/10.1073/PNAS.47.12.2005>.
- Stokke, Caroline, Ingvild Flåtten, and Kirsten Skarstad. 2012. "An Easy-to-Use Simulation Program Demonstrates Variations in Bacterial Cell Cycle Parameters Depending on Medium and Temperature." *PloS One* 7 (2): e30981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030981>.
- Stokke, Caroline, Torsten Waldminghaus, and Kirsten Skarstad. 2011. "Replication Patterns and Organization of Replication Forks in *Vibrio Cholerae*." *Microbiology* 157 (Pt 3): 695–708. <https://doi.org/10.1099/mic.0.045112-0>.
- Sueoka, N., and H. Yoshikawa. 1965. "The Chromosome of *Bacillus Subtilis*. I. Theory of Marker Frequency Analysis." *Genetics* 52 (4): 747–57.
- Sutton, Mark D, Kevin M Carr, Matias Vicente, and Jon M Kaguni. 1998. "Escherichia Coli DnaA Protein. The N-Terminal Domain and Loading of DnaB Helicase at the E. Coli Chromosomal Origin." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (51): 34255–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9852089>.
- Tani, T. H., A. Khodursky, R. M. Blumenthal, P. O. Brown, and R. G. Matthews. 2002. "Adaptation to Famine: A Family of Stationary-Phase Genes Revealed by Microarray Analysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (21): 13471–76. <https://doi.org/10.1073/pnas.212510999>.
- Teschler, Jennifer K., David Zamorano-Sánchez, Andrew S. Utada, Christopher J. a. Warner, Gerard C. L. Wong, Roger G. Linington, and Fitnat H. Yildiz. 2015. "Living in the Matrix: Assembly and Control of *Vibrio Cholerae* Biofilms." *Nature Reviews Microbiology* 13 (5): 255–68. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3433>.
- Theisen, Patrick W., Julia E. Grimwade, Alan C. Leonard, Joseph A. Bogan, and Charles E. Helmstetter. 1993. "Correlation of Gene Transcription with the Time of Initiation of Chromosome Replication in *Escherichia Coli*." *Molecular Microbiology* 10 (3): 575–84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00929.x>.
- Tosa, T., and L. I. Pizer. 1971a. "Biochemical Bases for the Antimetabolite Action of L-Serine Hydroxamate." *Journal of Bacteriology* 106 (3): 972–82. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Tosa, T., and L I Pizer. 1971b. "Effect of Serine Hydroxamate on the Growth of *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 106 (3): 966–71. <http://j.b.asm.org/content/107/1/210.abstract>.
- Traxler, Matthew F., Sean M. Summers, Huyen Tran Nguyen, Vineetha M. Zacharia, G. Aaron Hightower, Joel T. Smith, and Tyrrell Conway. 2008. "The Global, PpGpp-Mediated Stringent Response to Amino Acid Starvation in *Escherichia Coli*." *Molecular Microbiology* 68 (5): 1128–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06229.x>.

- Trucksis, Michele, Jane Michalski, Ying Kang Deng, and James B Kaper. 1998. "The *Vibrio Cholerae* Genome Contains Two Unique Circular Chromosomes." *Microbiology* 95 (November): 14464–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14464>.
- Turcatti, Gerardo, Anthony Romieu, Milan Fedurco, and Ana Paula Tairi. 2008. "A New Class of Cleavable Fluorescent Nucleotides: Synthesis and Optimization as Reversible Terminators for DNA Sequencing by Synthesis." *Nucleic Acids Research* 36 (4). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn021>.
- Urbanczyk, H., J. C. Ast, M. J. Higgins, J. Carson, and P. V. Dunlap. 2007. "Reclassification of *Vibrio Fischeri*, *Vibrio Logei*, *Vibrio Salmonicida* and *Vibrio Wodanis* as *Aliivibrio Fischeri* Gen. Nov., Comb. Nov., *Aliivibrio Logei* Comb. Nov., *Aliivibrio Salmonicida* Comb. Nov. and *Aliivibrio Wodanis* Comb. Nov." *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 57 (12): 2823–29. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65081-0>.
- Val, Marie-Eve, Sean P. Kennedy, Alfonso J. Soler-Bistué, Valérie Barbe, Christiane Bouchier, Magaly Ducos-Galand, Ole Skovgaard, and Didier Mazel. 2014. "Fuse or Die: How to Survive the Loss of Dam in *Vibrio Cholerae*." *Molecular Microbiology* 91 (4): 665–78. <https://doi.org/10.1111/mmi.12483>.
- Val, Marie-Eve, Martial Marbouty, Francisco de Lemos Martins, Sean P Kennedy, Harry Kemble, Michael J Bland, Christophe Possoz, Romain Koszul, Ole Skovgaard, and Didier Mazel. 2016. "A Checkpoint Control Orchestrates the Replication of the Two Chromosomes of *Vibrio Cholerae*." *Science Advances* 2 (4): e1501914. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501914>.
- Val, Marie-Eve, Ole Skovgaard, Magaly Ducos-Galand, Michael J Bland, and Didier Mazel. 2012. "Genome Engineering in *Vibrio Cholerae*: A Feasible Approach to Address Biological Issues." *PLoS Genetics* 8 (1): e1002472. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002472>.
- Venkova-Canova, Tatiana, Jong Hwan Baek, Peter C Fitzgerald, Melanie Blokesch, and Dhruva K Chatteraj. 2013. "Evidence for Two Different Regulatory Mechanisms Linking Replication and Segregation of *Vibrio Cholerae* Chromosome II." *PLoS Genetics* 9 (6): e1003579. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003579>.
- Venkova-Canova, Tatiana, and Dhruva K Chatteraj. 2011. "Transition from a Plasmid to a Chromosomal Mode of Replication Entails Additional Regulators." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (15): 6199–6204. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013244108>.
- Venkova-Canova, Tatiana, A Saha, and DK Chatteraj. 2012. "A 29-Mer Site Regulates Transcription of the Initiator Gene as Well as Function of the Replication Origin of *Vibrio Cholerae* Chromosome II." *Plasmid* 67 (2): 102–10. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.12.009.A>.
- Vinella, Daniel, Christian Albrecht, Michael Cashel, and Richard D'Ari. 2005. "Iron Limitation Induces SpoT-Dependent Accumulation of PpGpp in *Escherichia Coli*." *Molecular Microbiology* 56 (4): 958–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04601.x>.
- Wahle, E., R. S. Lasken, and A. Kornberg. 1989. "The DnaB-DnaC Replication Protein

- Complex of Escherichia Coli. II. Role of the Complex in Mobilizing DnaB Functions.” *Journal of Biological Chemistry* 264 (5): 2469–75.
- Wang, Jue D., Glenn M. Sanders, and Alan D. Grossman. 2007. “Nutritional Control of Elongation of DNA Replication by (p)PpGpp.” *Cell* 128 (5): 865–75. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.043>.
- Weber, Ernst, Carola Engler, Ramona Gruetzner, Stefan Werner, and Sylvestre Marillonnet. 2011. “A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs.” *PLoS ONE* 6 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>.
- Werner, Stefan, Carola Engler, Ernst Weber, Ramona Gruetzner, and Sylvestre Marillonnet. 2012. “Fast Track Assembly of Multigene Constructs Using Golden Gate Cloning and the MoClo System.” *Bioengineered* 3 (1): 38–43. <https://doi.org/10.4161/bbug.3.1.18223>.
- Wout, P, K Pu, S M Sullivan, V Reese, S Zhou, B Lin, and J R Maddock. 2004. “The Escherichia Coli GTPase CgtAE Cofractionates with the 50S Ribosomal Subunit and Interacts with SpoT, a PpGpp Synthetase/Hydrolase.” *Journal of Bacteriology* 186 (16): 5249–57. <https://doi.org/10.1128/JB.186.16.5249-5257.2004>.
- Xiao, Hua, Miklos Kalman, Kenji Ikehara, Sharon Zemel, Gad Glaser, and Michael Cashel. 1991. “Residual Guanosine 3’,5’-Bispyrophosphate Synthetic Activity of RelA Null Mutants Can Be Eliminated by SpoT Null Mutations.” *The Journal of Biological Chemistry* 266 (9): 5980–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2005134>.
- Xie, Gary, Shannon L. Johnson, Karen W. Davenport, Mathumathi Rajavel, Torsten Waldminghaus, John C. Detter, Patrick S. Chain, and Shanmuga Sozhamannan. 2017. “Exception to the Rule: Genomic Characterization of Naturally Occurring Unusual Vibrio Cholerae Strains with a Single Chromosome.” *International Journal of Genomics* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8724304>.
- Yamaichi, Yoshiharu, Michael a Fogel, Sarah M McLeod, Monica P Hui, and Matthew K Waldor. 2007. “Distinct Centromere-like ParS Sites on the Two Chromosomes of Vibrio Spp.” *Journal of Bacteriology* 189 (14): 5314–24. <https://doi.org/10.1128/JB.00416-07>.
- Yamaichi, Yoshiharu, Michael a Fogel, and Matthew K Waldor. 2007. “Par Genes and the Pathology of Chromosome Loss in Vibrio Cholerae.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2): 630–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608341104>.
- Yamaichi, Yoshiharu, Matthew a Gerding, Brigid M Davis, and Matthew K Waldor. 2011. “Regulatory Cross-Talk Links Vibrio Cholerae Chromosome II Replication and Segregation.” *PLoS Genetics* 7 (7): e1002189. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002189>.

10. Erklärung der selbständigen Erarbeitung der Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation

„Charakterisierung der DNA-Replikation beider Chromosomen von *Vibrio cholerae* durch Methoden der Genomik und synthetischen Biologie“

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

Marburg, den 9.11.2018

Franziska S. Kemter