

**Hochdurchsatz-Mutagenese von natürlichen Plasmiden mittels
Recombineering**

High throughput mutagenesis of natural plasmids using recombineering

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Nils Keitmann
aus Dortmund

Gießen, 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Medizinische Mikrobiologie
und
Institut für Hygiene und Umweltmedizin

Gutachter/in: Prof. Dr. Linda Falgenhauer

Gutachter/in: Prof. Dr. Knut Stieger

Tag der Disputation: 14.09.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Antibiotikaresistenzen.....	1
1.2 <i>Escherichia coli</i> und Antibiotikaresistenzen	2
1.3 Colistin	4
1.4 Plasmide als Resistenz-Vehikel.....	8
1.5 pV163M	9
1.6 Mutagenese-Methoden	11
1.6.1 Lambda-Red-Mutagenese	12
1.6.2 pTOX	16
1.6.3 AQUA Cloning.....	19
1.6.4 CRISPR/Cas9	21
1.7 Zielstellung dieser Arbeit.....	23
2. Material	24
2.1 Chemikalien	24
2.2 Nährmedien.....	25
2.3 Lösungen und Puffer	26
2.3.1 Puffer für Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	26
2.3.2 Puffer für Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.3.3 Puffer für Herstellung chemisch-kompetenter Zellen	27
2.3.4 Herstellung elektrisch-kompetenter Zellen	27
2.4 Agarose-Gel	27
2.5 Bakterienstämme und Plasmid-Derivate	28
2.5.1 Antibiotika zur Kultivierung der verwendeten <i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	28
2.5.2 Verwendete Plasmide	29
2.5.3 Plasmid-Mutanten von pV163M	29
2.6 Primer	31
2.6.1 Lambda-Red-Rekombinase-Primer	31
2.6.2 Deletionsnachweis-Primer	36
2.7 Verwendete Kits	38
2.8 Verwendete Enzyme	38
2.9 Arbeitsmaterialien.....	38
2.10 Verwendete Geräte.....	39
3. Methoden	40
3.1 Mikrobiologische Methoden	40

3.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	40
3.1.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen für Lambda-Red-Mutagenese	40
3.1.3 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen	41
3.1.4 Chemische Transformation	41
3.1.5 Elektroporation	42
3.2 Molekularbiologische Methoden	42
3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	42
3.2.2 Mutagenese mittels Lambda-Red-Rekombinase	45
3.3 Charakterisierungsmethoden.....	50
3.3.1 Wachstumskurven.....	50
3.3.2 Konjugation	50
3.3.3 Plasmidkopiezahl.....	51
3.3.4 Bestimmung der Verdopplungsraten.....	52
4. Ergebnisse	54
4.1 Etablierung der pTOX-Mutagenese.....	54
4.2 Etablierung der Lambda-Red-Rekombinase-Mutagenese mittels <i>lacZ</i> -Deletion	55
4.3 Ergebnisse der Lambda-Red-Rekombinase-Mutagenese von pV163M	56
4.4 Konjugationseffizienzen von pV163M und Deletionsmutanten	58
4.5 Wachstumskurven von pV163M und Deletionsmutanten	60
4.6 Plasmidkopiezahlen von pV163M und Deletionsmutanten	62
4.7 Verdopplungsraten von pV163M und Deletionsmutanten	63
5. Diskussion	66
5.1 Etablierung Lambda-Red-Mutagenese	66
5.2 Charakterisierung der Mutanten	68
5.2.1 Tabellarische Übersicht der Assay-Ergebnisse.....	68
5.2.2 Wachstumsverhalten	69
5.2.3 Konjugationseffizienz	71
5.2.4 Plasmidkopiezahl.....	73
5.2.5 Verdopplungsraten.....	75
5.3 Ausblick.....	75
6. Zusammenfassung	77
7. Summary	78
8. Literaturverzeichnis	79
9. Anhang	86
9.1 Daten der Konjugation	86
9.2 Wachstumskurven der restlichen Deletionsmutanten	88

Abbildungsverzeichnis	90
Tabellenverzeichnis	92
Abkürzungsverzeichnis	93
Lizenzvereinbarungen	95
Publikationsverzeichnis	96
Ehrenwörtliche Erklärung	97
Danksagung	98

1. Einleitung

1.1 Antibiotikaresistenzen

Seit der Entdeckung des Penicillins 1945 durch Alexander Fleming werden Antibiotika verwendet um durch Bakterien verursachte Infektionserkrankungen zu therapieren.¹ In den letzten Jahren zeichnet sich allerdings zunehmend ein Problem ab, welches die Weltgesundheit akut bedroht und das Gesundheitssystem vor eine große Herausforderung stellt. Immer mehr Bakterien entwickeln Resistenzen gegen antibiotische Chemotherapien und sprechen nicht mehr auf die Behandlung an, für die sie bisher empfänglich gewesen sind.² Daneben führen eine wachsende Weltbevölkerung, moderne Formen der Lebensmittelproduktion und eine stagnierende Entwicklung neuer Antibiotika zu einer Verschärfung des Problems. Doch antibiotikaresistente Bakterien sind nicht nur das Resultat menschlichen Handelns. In der Natur kommen sie in nahezu allen Habitaten vor, in denen Bakterien leben. Dort ergeben sich häufig aufgrund der Resistenz evolutionäre Vorteile gegenüber anderen Bakterien. Seit des massiven und teils unkontrollierten Einsatzes von Antibiotika in Tier- und Humanmedizin wird dieser Vorteil jedoch in hohem Maße selektioniert. Der steigende Selektionsdruck auf jene Bakterien, die mit diesen Antibiotika in Kontakt kommen, fördert die weitere Entstehung und Verbreitung von Resistenzen. Auch der Einsatz von Antibiotika in der Tiermedizin trägt zu einem erhöhten Selektionsdruck auf Bakterien bei. Denn nicht immer dienen Antibiotika in der Tiermast dem genuinen Ziel der Infektionstherapie oder der Infektionsprophylaxe. Zwar sind Antibiotika mittlerweile als Wachstumsförderer in der Europäischen Union verboten, außerhalb Europas werden sie dennoch teilweise als solche eingesetzt.³ Der Prozess der Resistenzentwicklung wird durch diese Faktoren weiter beschleunigt und führt dazu, dass immer mehr Bakterien ihre Resistenzgene untereinander austauschen. Dieser horizontale Gentransfer über Konjugation findet neben der Umwelt auch im Menschen statt. Infizieren sich Patienten mit einem Resistenz-tragendem Bakterium kann das gravierende Folgen haben. Da den behandelnden Ärztinnen und Ärzten die Therapieoptionen im Sinne von wirksamen Antibiotika fehlen, verlaufen die Infektionen oft schwer. In der Konsequenz halten die Infektionserkrankungen länger an, was unter anderem auch das Risiko der Weiterverbreitung resistenter Stämme zur Folge haben kann. Patienten mit Infektionen, die durch resistente Bakterien verursacht

wurden, haben eine deutlich schlechtere klinische Prognose und benötigen daher auch mehr Ressourcen aus dem Gesundheitssystem.² Aktuell stellt die Situation der Antibiotikaresistenzen weltweit eine akute Bedrohung für die Gesundheit aller Menschen dar. Allein in der Europäischen Union starben im Jahr 2019 schätzungsweise 33.000 Menschen an den Folgen von Infektionen mit multiresistenten Keimen.⁴ Die WHO warnt bereits vor einer post-antibiotischen Ära, sollte ein koordiniertes Handeln aller Verantwortlichen ausbleiben.²

1.2 *Escherichia coli* und Antibiotikaresistenzen

Das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) ist ein Gram-negatives, sporenloses, peritrich begeißeltes Stäbchenbakterium, welches hauptsächlich den Darm von Mensch und Tier besiedelt.⁵ Dort stellt es neben anderen Enterobacteriaceae die Normalflora des Gastrointestinaltraktes dar. Gleichzeitig ist *E. coli* einer der häufigsten Erreger bakterieller Infektionen beim Menschen, wobei man extraintestinale von intestinalen Infektionen unterscheidet.⁶

Extraintestinale Infektionen entstehen dann, wenn *E. coli*-Bakterien an Orte außerhalb der eigenen Flora gelangen und sich dort aufgrund wachstumsfördernder Bedingungen vermehren und schließlich eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Solche endogenen Infektionen entstehen häufig im Urogenitaltrakt, begünstigt durch die Nähe zum Anus, durch Aszension der Erreger vom Ostium urethrae aus. Dabei tritt die Infektion zuerst in den unteren Abschnitten der Harnwege in Form einer Urethritis oder Zystitis auf, kann im Verlauf aber auch aufsteigen und eine Pyelonephritis verursachen.⁷ Daneben ist *E. coli* ein häufiger Verursacher einer Sepsis und wird zudem mit der Entstehung von Peritonitiden, Appendizitiden aber auch Meningitiden der Früh- und Neugeborenen in Verbindung gebracht.^{8,9}

Aber nicht nur außerhalb des Darms kann *E. coli* schwere Infektionen hervorrufen. Die pathogenen *E. coli* Pathotypen Enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC), Enterotoxische *Escherichia coli* (ETEC), Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) und Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) zählen zu den Erregern intestinaler Infektionen und können neben schweren Diarrhoen auch ein hämolytisch-urämisches Syndrom auslösen.⁹

Resistenzen von *E. coli* entstehen häufig durch chromosomale Mutationen, wie beispielsweise Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen.² Allerdings tragen einige Bakterien Enzyme, die Bestandteile von Antibiotika spalten können, sodass diese ihre Wirksamkeit verlieren.

Betroffen sind dabei die breit eingesetzten Beta-Lactam-Antibiotika, wie Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme, die ihre inhibierende Wirkung auf Bakterien im letzten Schritt der Peptidoglykan-Synthese (Transpeptidase-Schritt) über einen Beta-Lactam-Ring ausüben, der die Wirkung der Transpeptidasen und somit den Aufbau der bakteriellen Zellwand blockiert. Spezielle bakterielle Enzyme, wie Extended-Spektrum Beta-Lactamasen (ESBL) und Carbapenemasen, können Beta-Lactam-Antibiotika inaktivieren, indem sie den Beta-Lactam-Ring hydrolysieren. Dadurch verliert das Antibiotikum seine Funktion (Abbildung 1).

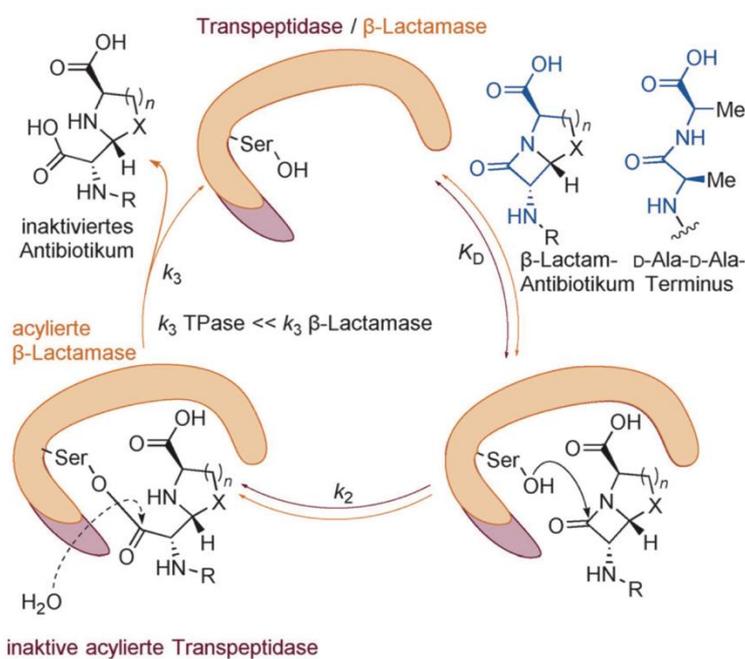


Abbildung 1 Wirkmechanismus von Transpeptidasen (violett) und Beta-Lactamasen (orange). Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus: Antibiotikaresistenzen gezielt überwinden¹⁰

Durch die häufige Lokalisation der Beta-Lactamase-Gene auf Plasmiden wird ein schneller Austausch der genetischen Information und damit der Resistenzen zwischen Bakterien ermöglicht. Inzwischen gibt es zunehmend Gram-negative Spezies, die gegenüber drei oder mehr Antibiotika-Klassen resistent sind.¹¹ Das Resistenzmuster dieser multiresistenten Erreger (MRE) erreicht die Grenzen therapeutischer Möglichkeiten, da die gängigen und meist auch nebenwirkungsarmen Antibiotika wie Cephalosporine oder Penicilline nicht mehr anschlagen.¹² Um Patienten mit Infektionen dennoch behandeln zu können, werden daher sogenannte Reserve-Antibiotika, wie beispielweise Colistin, eingesetzt.

1.3 Colistin

Colistin ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Polymyxine und wurde 1949 erstmals in dem Bakterium *Bacillus polymyxa subspecies colistinus* Koyama entdeckt.¹³ Das kationische Polypeptid ist gegen viele Bakterien der Familie der Enterobacteriaceae wirksam (Abbildung 2).

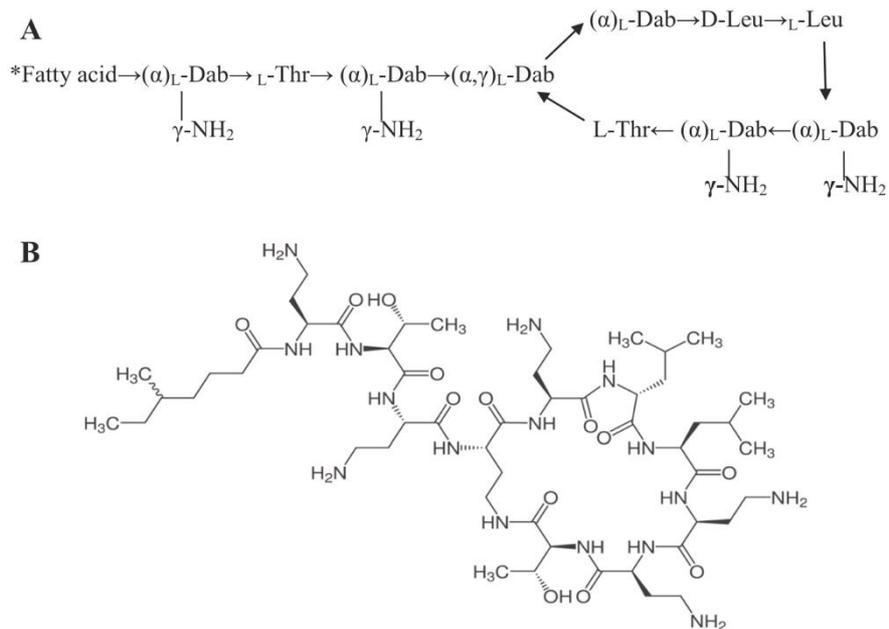


Abbildung 2 (A) Primärstruktur von Colistin [*Fettsäure: (S)-6-Methyloctansäure für Colistin A, (S)-6-Methylheptansäure für Colistin B; Thr-Threonin, Leu Leucin, Dab α,γ-diaminobuttersäure]. (B) Strukturformel von Colistin. Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus: Colistin for lung infection: An update¹⁴

Die bakterizide Wirkung von Colistin auf Gram-negative Bakterien beruht auf der elektrostatischen Interaktion von Colistin mit dem Lipid A des Lipopolysaccharids (LPS) der äußeren Membran und führt so zur Schädigung beider Zellmembranen (Abbildung 3).

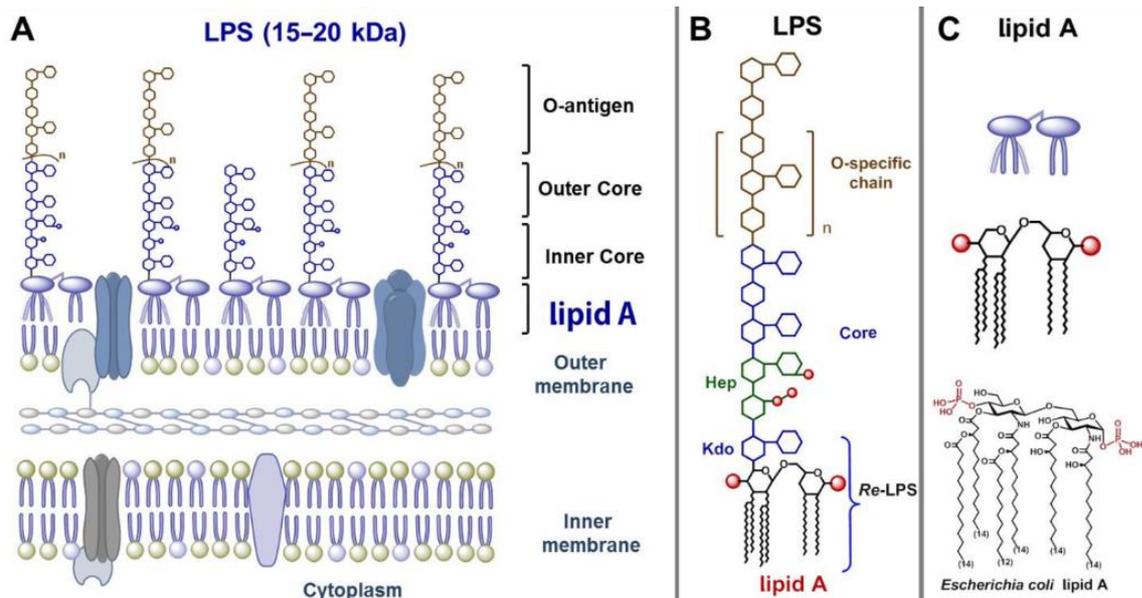


Abbildung 3 (A) Gram-negative Bakterienmembran mit LPS als Hauptbestandteil der äußeren Membran; (B) strukturelle Bestandteile von LPS: Lipid A, innerer/äußerer Kern und O-spezifische Kette. Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus: Aminosugar-based immunomodulator lipid A: synthetic approaches¹⁵

Die Bindung von Colistin an die äußere Membran kommt dabei durch die elektrostatische Interaktion zwischen positiv geladenen L-Dab-Resten von Colistin und negativ geladenen Phosphatgruppen von Lipid A zustande. Die stabilisierenden Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} werden somit von Colistin verdrängt, wodurch es zu einer Lockerung der Struktur der äußeren Membran kommt.¹⁶ Aufgrund seines lipophilen Fettsäure-Restes kann Colistin in die Membran eindringen, diese permeabilisieren und schließlich passieren. Durch die Permeabilisierung der äußeren Membran resultiert der Zusammenbruch des Membranpotentials und damit der Verlust der Zellintegrität, was letztlich zum Zelltod führt (Abbildung 4).¹⁷

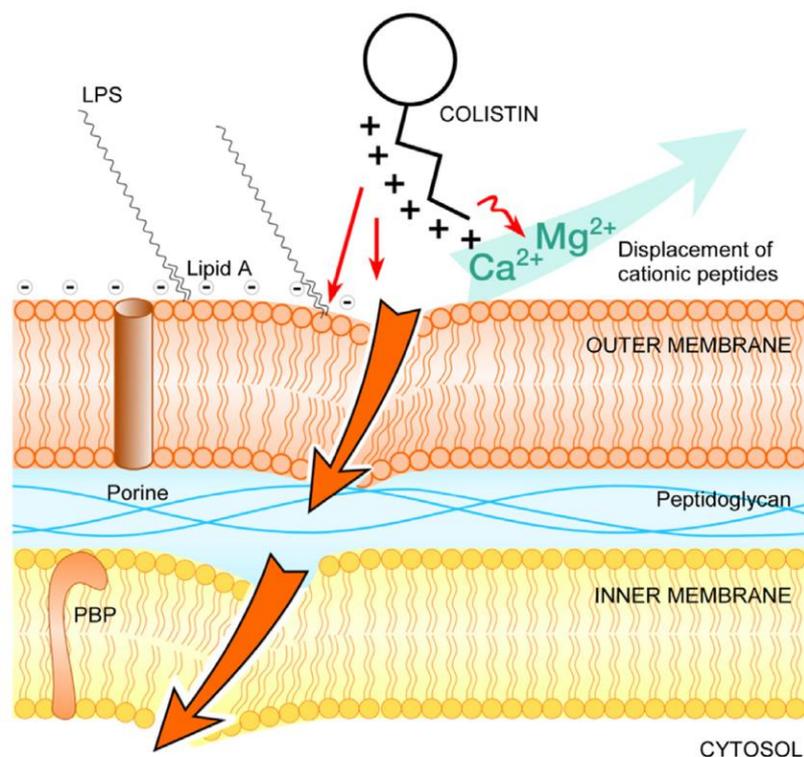


Abbildung 4 Wirkung von Colistin auf die Bakterienmembran. LPS: Lipopolysaccharid; PBP: Penicillin-bindendes Protein. Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus: Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections: A narrative review for the clinician¹⁸

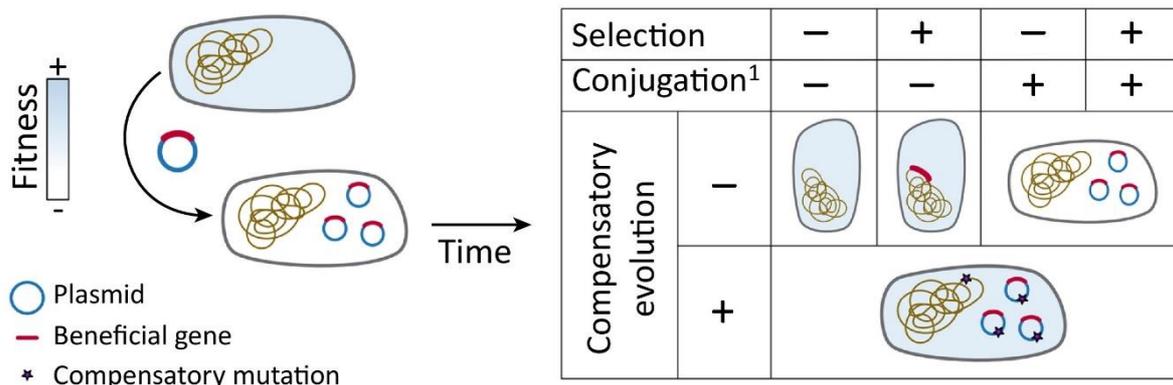
In den 1950er Jahren wurde Colistin in Japan und Europa erstmals zu therapeutischen Zwecken eingesetzt. Allerdings stellte man früh fest, dass das Antibiotikum einige unerwünschte Arzneimittelwirkungen hervorruft. Aufgrund der nachgewiesenen Nephrotoxizität und Neurotoxizität wurde die klinische Verwendung von Polymyxinen bis Mitte der 1970er Jahre weitgehend eingestellt.¹⁹ In Anbetracht der steigenden Zahlen an Infektionen mit multiresistenten Erregern und der Mangel an neuen antimikrobiellen Wirkstoffen gegen Gram-negative Bakterien werden Polymyxine heutzutage wieder als therapeutische Option berücksichtigt.¹³ In der Massentierhaltung trug die orale Verabreichung von Colistin seit den 1960er Jahren entscheidend zur Prophylaxe von Infektionen durch Enterobacteriaceae bei.¹⁷ Nach Jahrzehnten des Gebrauchs von Colistin in der Schweinezucht wurden seit 2008 vermehrt Resistenzen gegenüber Colistin von aus Schweinen stammenden *E. coli*-Bakterien registriert.²⁰ Es gibt zwei Kategorien von Resistenzen gegenüber Colistin: Intrinsische Resistenz und erworbene Resistenz. Die als natürliche Resistenz geltende intrinsische Resistenz beruht neben der Ausbildung von Pumpen und Porinen auf der Modifikation des LPS, sodass der Ladungszustand des LPS verändert und

dadurch die elektrostatische Anziehung zwischen der äußeren Membran und Colistin abgeschwächt wird. Bei letzterem Mechanismus werden Fettsäuren, Phosphoethanolamin oder 4-amino-4-deoxy-L-Arabinose an das Core- Polysaccharid oder an den Lipid A-Anteil des LPS hinzugefügt.²¹ Ein weiterer intrinsischer Resistenzmechanismus gegenüber Colistin stellt die Bildung einer Polysaccharid-Kapsel dar. Dabei wird das LPS maskiert, was ebenfalls zu einer Abschwächung der elektrostatischen Anziehung führt. Bei den erworbenen Resistenzen hingegen kommt es auf chromosomaler Ebene zu Mutationen, die die Synthese von LPS beeinflussen können.²¹ Diese zufälligen Mutationen entstehen meist durch vorheriges Ausüben eines Selektionsdrucks, beispielsweise in Form der Anwesenheit eines Antibiotikums, und verschaffen dem Bakterium dadurch einen Selektionsvorteil. Im Jahr 2015 wurde ein neuer Colistin-Resistenzmechanismus im Rahmen der Arbeiten der chinesischen Arbeitsgruppe um Yi-Yun Liu entdeckt: ein Plasmid-lokalisiertes Colistin-Resistenzgen, genannt *mcr-1* (mobile colistin resistance 1).²² Das *mcr-1* Gen kodiert eine Phosphoethanolamin-Transferase, die in der Lage ist, Phosphoethanolamin auf Lipid A zu übertragen. Die Veränderung des Lipid A führt zu einer Veränderung der Nettoladung des LPS, sodass die Affinität zwischen Colistin und Lipid A verringert wird. Die Bakterienzelle ist somit resistent gegen Colistin. Nach der ersten Entdeckung von *mcr-1* in China konnten *mcr-1*-kodierende Gram-negative Erreger auch in anderen Ländern, darunter auch in Deutschland, beobachtet werden.²³ Zu den *mcr1*-tragenden Isolaten, die hauptsächlich in Nutztieren gefunden wurden, gehörten unter anderem Erreger der Spezies *E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei* und *Salmonella enterica*.²⁴ Als führender Produzent von Schweinefleisch setzte China bis 2015 jährlich bis zu 12.000 t Colistin zur Infektionsprophylaxe sowie als Futterzusatz für Mastschweine ein.²⁵ Aufgrund der hohen Zahl weltweit nachgewiesener Colistin-Resistenzen wurde China 2016 der Einsatz von Colistin in der Massentierhaltung untersagt.²⁶ Die 2020 veröffentlichte Studie von Perez et al. zeigt, dass die damals seitens des chinesischen Landwirtschaftsministeriums getroffenen Maßnahmen zu einem erheblichen Rückgang der Verwendung von Colistin als Futtermittelzusatzstoff in der chinesischen Landwirtschaft führte. Zudem konnte bis 2018 ein deutlicher Rückgang der Nachweise des Colistin-Resistenzgens sowohl in tierischen als auch in menschlichen Isolaten bestätigt werden.²⁷

1.4 Plasmide als Resistenz-Vehikel

Das bakterielle Genom setzt sich aus dem Chromosom und gegebenenfalls extrachromosomaler DNA in Form von Plasmiden zusammen. Durch Expression bestimmter Gene sind Bakterien in der Lage, sich schnell an spezifische Lebensbedingungen anzupassen und sich damit einen Selektionsvorteil zu verschaffen.²⁸

Plasmide bestehen meist aus zirkulärer doppelsträngiger DNA, die für Proteine und RNA-Moleküle kodieren. Die Größe kann zwischen wenigen tausend Basenpaaren bis hin zu mehreren Kilobasenpaaren variieren. Plasmide liegen typischerweise in mehreren Kopien vor, wobei die Kopiezahl relativ stabil ist. Dabei variiert die Anzahl der Plasmidkopien je nach Plasmid und reicht von nur 1-2 Kopien (*low-copy* Plasmide) bis 800 Kopien (*high-copy* Plasmide) pro Bakterienzelle.²⁹ Plasmid-lokalisierte Gene sind für das Bakterium in der Regel entbehrlich, da sie keine zum Überleben essentiellen Eigenschaften kodieren. Eine Ausnahme stellt eine Klasse von großen Plasmiden dar, die als "Chromide" bekannt sind und häufig sogenannte „core“ Gene tragen, also Gene, die bei allen Bakterien einer Spezies zu finden sind.³⁰ Größtenteils verursachen Plasmide eine erhebliche metabolische Belastung für ihre Wirte.³¹ Im Falle eines fehlenden Selektionsdruckes bedeutet das Erhalten der Plasmide eine Fitness-Einbuße, die sich in einer Reduktion der Wachstumsrate zeigen kann.³² Plasmide mit hoher Kopiezahl, wie Klonierungsvektoren, gehen bei Populationen ohne Selektion typischerweise schnell verloren (Abbildung 5).³³



Trends in Microbiology

Abbildung 5 Die evolutionäre Dynamik einer Plasmid-Bakterium-Assoziation. Die durch das Plasmid verursachte Fitness-Einbuße wird durch eine Farbänderung im Wirtsbakterium nach dem Plasmiderwerb dargestellt (blau, hohe Fitness; weiß, niedrige Fitness). Die Tabelle auf der rechten Seite zeigt das erwartete Schicksal der Plasmid-Bakterien-Assoziation. Wenn das Plasmid nicht in der Lage ist, sich horizontal schnell genug auszubreiten wird das Plasmid aus der Bakterienpopulation entfernt. Nur durch kompensatorische Mutationen kann das Plasmid unabhängig von Selektionsdruck und Konjugationseffizienz ohne Fitness-Einbuße im Bakterium verbleiben. Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus: Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context³⁴

Auf der anderen Seite tragen Plasmide als Vehikel zur Evolution bei, indem Bakterien Plasmide über Konjugation – einem Mechanismus des horizontalen Gentransfers – an andere Bakterien weitergeben.³⁵ Da Plasmide sehr häufig Antibiotika-Resistenzgene tragen, ist der horizontale Transfer von Resistenz-tragenden Plasmiden ein wesentlicher Mechanismus für die Ausbreitung der antimikrobiellen Resistenz.³⁶ Dieser freie Austausch von Plasmid-übertragenen Genen war für die in den letzten 10 Jahren weltweite rapide Zunahme der Resistenz gegen Antibiotika von zentraler Bedeutung.³⁷ 2013 konnte die Arbeitsgruppe um Alessandra Carattoli weltweit und speziesübergreifend Plasmide mit verschiedenen Resistenzgenen identifizieren, die für Carbapenemasen und ESBL kodieren. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass von Plasmiden eine enorme Gefahr hinsichtlich der Verbreitung antimikrobieller Resistenzen ausgeht.³⁶

1.5 pV163M

Bis heute ist nur eine geringe Anzahl an Plasmiden, die *mcr-1* kodieren, bekannt. Sie beinhalten Plasmide der Inkompatibilitätsgruppen IncHI2, IncX4 und IncI2, wobei das IncX4-Plasmid sehr weit verbreitet ist.³⁸ Inkompatibilität von Plasmiden bedeutet das Unvermögen von zwei verschiedenen Plasmiden einer identischen Inkompatibilitätsgruppe, ohne selektiven Druck in einer Bakterienzelle koexistieren zu können.³⁹ Sind Plasmide genetisch verwandt, wird ihre Replikation und Segregation durch ähnliche Kontrollmechanismen reguliert und sie können deshalb nicht stabil in dem gleichen Organismus erhalten werden. Somit bestimmt die Art des Replikationsursprungs eines Plasmids die Zugehörigkeit zu einer Inkompatibilitätsgruppe (Inc).⁴⁰ Heutzutage sind 27 Inkompatibilitätsgruppen in Enterobacteriaceae durch die Plasmid-Sammlung der National Collection of Type Cultures (NCTC) beschrieben.⁴¹ Die Kategorisierung ist unter anderem nützlich, um ihre Verteilung in der Natur und ihren evolutionären Ursprung bestimmen zu können.⁴² Der Nachweis von *mcr-1* auf verschiedenen Klassen von Plasmiden und ihr Vorhandensein in Isolaten verschiedener Sequenztypen lässt vermuten, dass es mehrere Wege für die horizontale Übertragung dieser Resistenz gibt. Nach der Entdeckung von *mcr-1* durch Liu et al. 2015 wurden auch in der Datenbank des Instituts für Medizinische Mikrobiologie in Gießen *mcr-1*-kodierende *E. coli* auf unterschiedlichen Plasmiden (IncHI2, IncX4) gefunden, darunter auch das Plasmid pV163M (MF381176, Genbank). Es handelt sich dabei um ein 36,5 kb großes konjugatives IncX4-

Plasmid, welches 2016 entdeckt wurde und aus dem *E. coli*-Isolat V163 vom Schwein stammt.³⁸

Konjugative Plasmide sind extrachromosomale genetische Elemente, die Determinanten für adaptive Eigenschaften tragen und es dem Wirtsorganismus ermöglichen, sich an verschiedene Umweltbedingungen anzupassen. Diese Plasmide sind häufig relativ groß (>30 kb) und kommen meist in niedriger Kopiezahl vor (low copy plasmids), so wie es auch bei pV163M der Fall ist. Um den Erfolg der vertikalen und horizontalen Übertragung zu gewährleisten, tragen konjugative Plasmide Kernregionen, die für die Replikation, die Partitionierung und andere Stabilitätsfunktionen sowie den konjugativen Transfer erforderlich sind.⁴³ Insgesamt befinden sich 52 Gene auf pV163M (Abbildung 6).

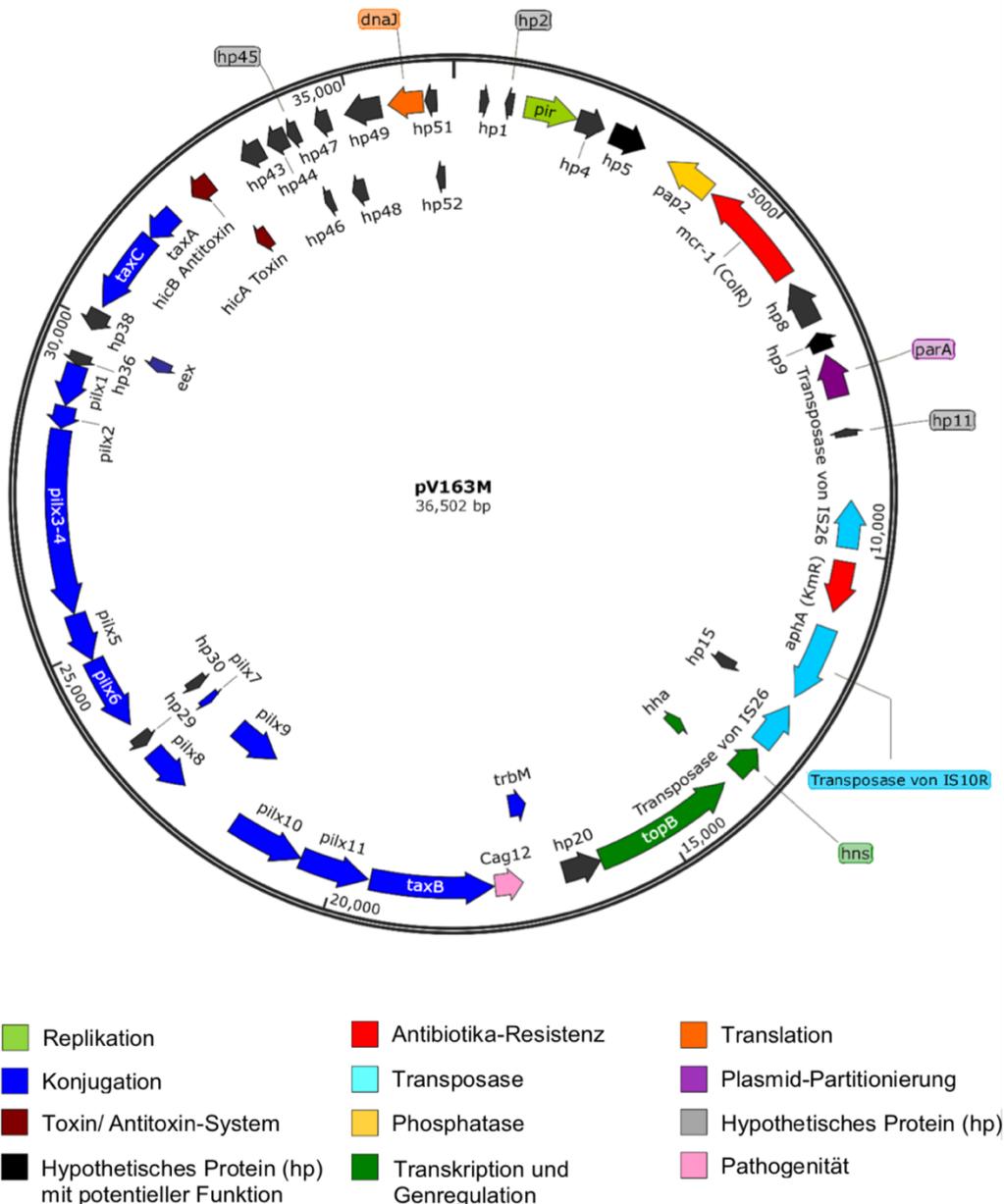


Abbildung 6 Plasmidkarte von pV163M⁴⁴

Als Replikationsgen dient das Gen *pir*.⁴⁵ Daneben ist das Plasmid mit einer circa 15 kb großen Konjugationsmaschinerie ausgestattet, die neben den Genen des Sekretionssystems (*pilx1-11*), die Gene *taxABC* und *trbM* beinhaltet. pV163M besitzt in Form der Gene *hicA/B* außerdem ein Typ II Toxin/ Antitoxin-System (TAS).⁴⁶ Dieses System dient dabei dem Postsegregational Killing (PSK) und sorgt dafür, dass die Bakterienzelle ohne das Plasmid abstirbt, da das langlebigere Toxin dann nicht vom kurzlebigen Antitoxin inaktiviert wird. PSK stellt somit sicher, dass die Mehrheit der Zellen in einer Population plasmidhaltig bleibt. Es wird allgemein angenommen, dass dieser offensichtliche Beitrag zur vertikalen Stabilität des Plasmids den Erfolg der plasmidbasierten PSK-Systeme verursacht hat.⁴⁷ *Hha* und *hns* kodieren Homologe der chromosomal kodierten Proteine Hha (Hemolysin expression-modulating protein) und H-NS (Heat-stable nucleoid-structuring protein) von *E. coli* und dienen somit der Transkription und Genregulation. Zu dieser Kategorie zählt ebenso *topB*, das für eine Topoisomerase kodiert und als Enzym dazu in der Lage ist, die DNA-Topologie zu verändern. pV163M trägt neben des Phosphoethanolamin-Transferase kodierenden Colistin-Resistenzgens *mcr-1* ein weiteres Resistenzgen, *aph(3')-Ia*. Es vermittelt als Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase eine Unempfindlichkeit gegenüber Kanamycin.

1.6 Mutagenese-Methoden

Die Grundlage für die Veränderung bakteriellen Erbgutes in der biologischen und medizinischen Forschung bildet die künstliche Erzeugung von Mutationen. Während in der Natur Mutationen durch die zufällige Veränderung von Basensequenzen einen zentralen evolutionären Vorgang darstellen, dienen sie in der Forschung häufig der Schaffung neuer genetischer Varianten. Durch die veränderten Gene können beispielsweise die Eigenschaften eines Organismus beeinflusst und Rückschlüsse auf die Funktion der beteiligten Gene gezogen werden. Der Forschungsansatz der Genetik, bei dem zunächst die Sequenz des zu analysierenden Gens verändert wird um anschließend dessen Rolle innerhalb des Organismus zu erforschen, wird als Reverse Genetik bezeichnet.⁴⁸ Das Verfahren beginnt nicht mit einem mutierten Phänotyp, dessen genetische Ursache gesucht wird, sondern direkt auf DNA-Ebene. Als Mutagenese werden Techniken zusammengefasst, mit deren Hilfe die spontanen

Mutationsraten eines Organismus gesteigert und somit *in vitro* Mutanten hergestellt werden können.⁴⁹ Man unterscheidet ungerichtete von ortsgerichteten Mutagenesemethoden.

Die konventionelle Zufallsmutagenese, bei der erbgutverändernde Bedingungen eingesetzt werden, führt zu Mutationen im Genom mit unbekannter Position. Diese erbgutverändernden Bedingungen, auch Mutagene genannt, können mutagene Agenzien wie Ethylmethansulfonat oder Methylmethansulfonat aber auch hochenergetische Strahlung wie z.B. UV-Strahlung sein.⁵⁰ Durch Screeningverfahren kann im Anschluss eine Selektion der Mutanten mit dem Phänotyp vorgenommen werden, der auf dem mutationsbedingten Ausfall der jeweiligen Genfunktion beruht. Bei der Exposition von Organismen gegenüber Mutagenen ist die richtige Dosis des Mutagens sowie die Dauer der Exposition gegenüber den Mutagenen entscheidend, da der Organismus auch selbst Schaden nehmen kann.⁵¹

Bei der ortsgerichteten Mutagenese werden DNA-Basen gezielt durch andere ersetzt, sodass Punktmutationen oder Insertionen in beliebigen Positionen und darüber hinaus Deletionen ganzer Gene ermöglicht werden. Somit erlaubt die ortsgerichtete Mutagenese eine genaue Kontrolle der Anzahl, der Platzierung und des Basenaustauschs der Mutanten.⁵² Es stehen zahlreiche Mutagenesemethoden zur Verfügung, wobei die heute verwendeten Methoden meist auf einer Kombination der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit klassischen Klonierungstechniken basieren, wie beispielweise die Overlap-extension-PCR oder Megaprimer-PCR.⁵³ Im Gegensatz zur klassischen Klonierung mittels Restriktionsenzymen und Ligation sind die PCR-basierten Methoden sequenzunabhängig. Das Amplifikat kann demnach an jeder beliebigen Stelle im Zielvektor eingesetzt werden.⁵⁴

1.6.1 Lambda-Red-Mutagenese

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach einem Verfahren gesucht, mit dem sich einzelne Gene aus bakterieller DNA deletieren lassen. Als besonders erfolgreich hat sich dabei ein System gezeigt, bei dem Rekombinasen spezifische Sequenzen auf zwei DNA-Molekülen erkennen und diese neu kombinieren.⁵⁵ Das verwendete Lambda-Red-Rekombinase-Mutageneseverfahren beruht auf homologer Rekombination und ist unabhängig von Restriktions-Schnittstellen. Dabei macht man sich die ursprünglich von Bakteriophagen Lambda stammenden Rekombinasen Gamma, Beta und Exo zu nutze. Die Gene für diese Rekombinasen befinden sich auf einem synthetischen Plasmid pKD46 (Abbildung 7).

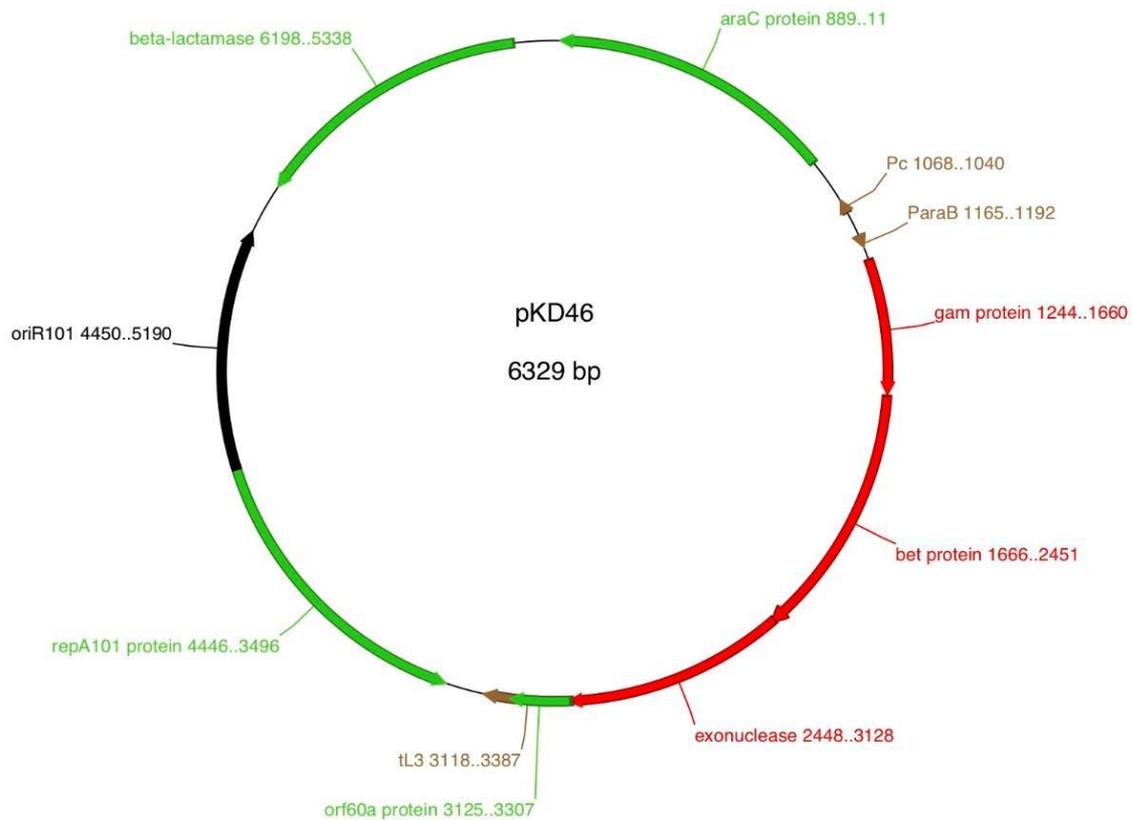


Abbildung 7 Die Plasmidkarte zeigt das für die Lambda-Red-Methode verwendete Plasmid pKD46

Das Gen *exo* kodiert für eine 5'-3' Exodesoxyribonuklease, die lineare doppelsträngige DNA abbaut und dabei 5'-Mononukleotide sowie die komplementäre einzelsträngige DNA freisetzt.⁵⁶ Das an Exo gebundene Genprodukt von *bet* bindet einzelsträngige DNA und fördert die Renaturierung von komplementärer einzelsträngiger DNA.⁵⁷ Somit moduliert das Beta-Protein sowohl die nukleolytische als auch die rekombinationsfördernden Aktivitäten von Exo.⁵⁸ Während Exo und Bet also gemeinsam an der Prozessierung linearer dsDNA beteiligt sind, inhibiert Gam zelleigene Exonukleasen des RecBCD-Komplexes. Dadurch wird der Verdau der eingebrachten linearen DNA verhindert (Abbildung 8).⁵⁹ Die Produktion dieser drei Rekombinasen in *E. coli* ermöglicht eine Integration synthetischer linearer PCR-Produkte in chromosomale DNA.

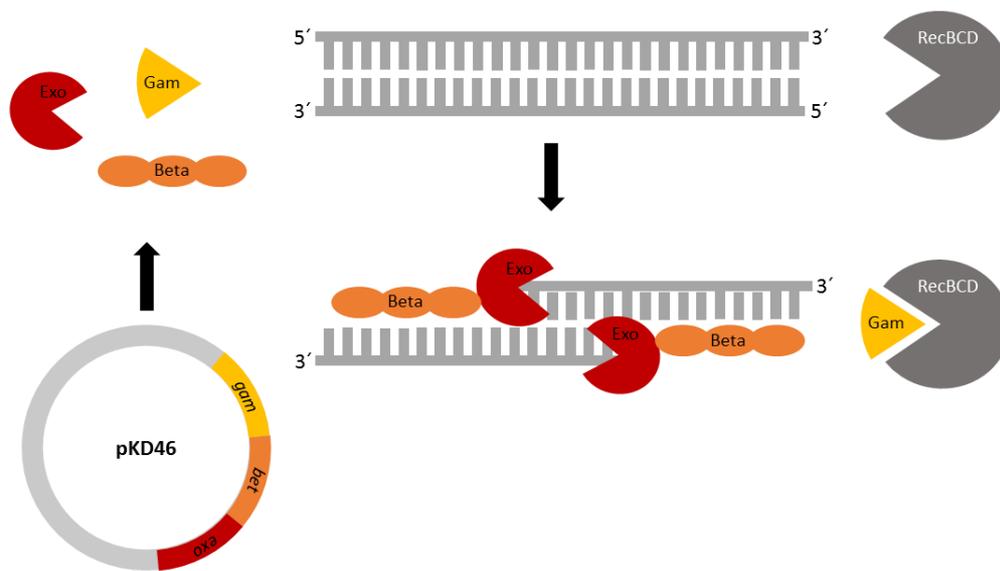


Abbildung 8 Die drei Komponenten des Lambda-Red-Systems: Exo, Beta, Gam

Daneben hat das Plasmid pKD46 die Besonderheit, dass der den Rekombinase-Genen vorgeschaltete Promotor P_{araB} mit Arabinose induzierbar ist. Ein wichtiger Teil des Arabinose-Operons ist dabei das Gen *araC*, das unter der Kontrolle des P_c -Promotors divergent transkribiert wird und für das regulatorische Protein AraC kodiert. In Gegenwart von Arabinose bindet diese an AraC, sodass die Transkription von P_{araB} initiiert wird und die Rekombinase-Gene exprimiert werden. In Abwesenheit von Arabinose wird die Transkription von P_{araB} durch AraC gehemmt. Somit stehen *exo*, *bet* und *gam* unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren P_{araB} -Promotors aus dem Arabinose-Operon.⁶⁰ Des Weiteren besitzt pKD46 den thermosensitiven Replikationsursprung *repA101*, um das Plasmid einfach durch Anheben der Temperatur von 30 auf 37°C eliminieren zu können. Eine ebenfalls auf dem Plasmid befindliche Ampicillin-Resistenzkassette dient der Selektion von pKD46. Positive Klone können durch diesen Selektionsmarker durch ein einfaches Screening identifiziert werden.

Mit der Lambda-Red-Methode werden durch Rekombination kurze homologe Sequenzen effizient rekombiniert.⁶¹ Dadurch wird die Verwendung von synthetischen PCR-Produkten als Rekombinationssubstrate ermöglicht, sodass sich einzelne Gene an jeder gewünschten Position auf dem Chromosom oder Plasmid deletieren lassen.⁵⁵ In dieser Arbeit dient als

Zielpasmid pV163M. Um Deletionsmutanten von pV163M zu erzeugen, muss das Plasmid in verschiedenen Arbeitsschritten mit den Rekombinasen und den auszutauschenden Sequenzen zusammengeführt werden. Erst dann kann die homologe Rekombination stattfinden. Mit speziellen Primern, welche eine 40 bp homologe Sequenz zu flankierenden Bereichen des Zielgens besitzen, werden zunächst PCR-DNA-Fragmente erzeugt. Dabei dient das Plasmid pKD3 als Template, welches die zur späteren Selektion benötigte Chloramphenicolkassette trägt (Abbildung 9).

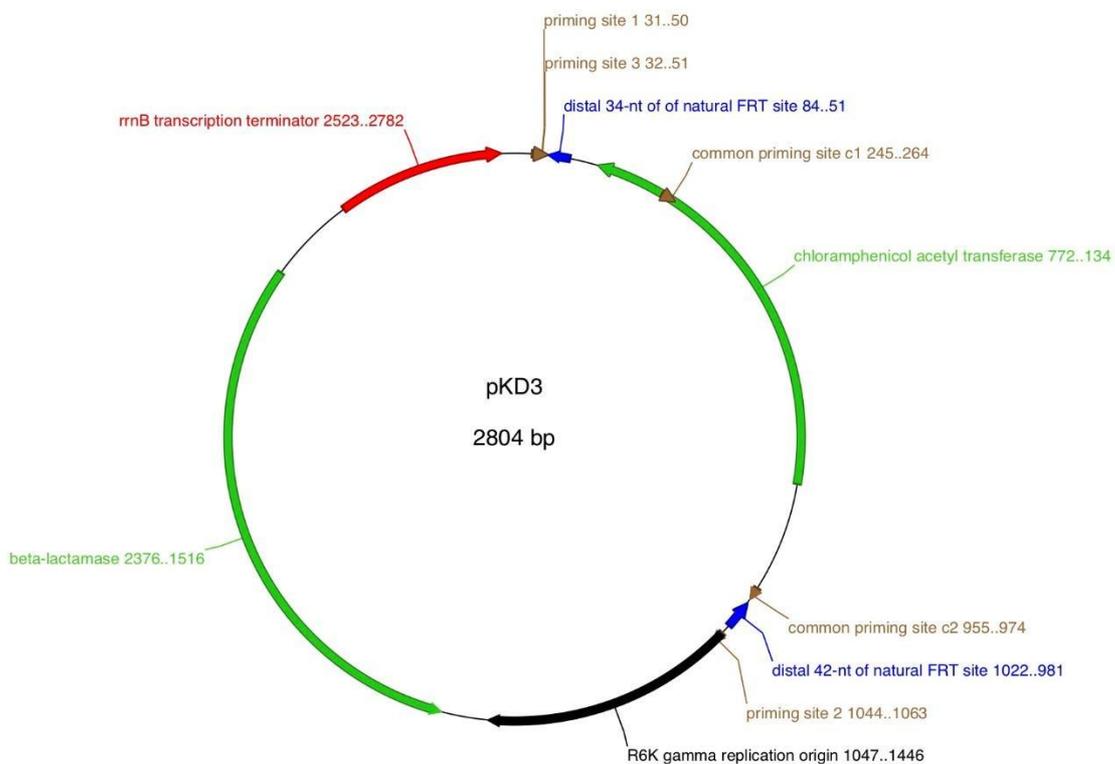


Abbildung 9 Die Plasmidkarte zeigt das für die Lambda-Red-Methode verwendete Plasmid pKD3

Die resultierenden PCR-Fragmente enthalten somit die Chloramphenicolkassette und die angrenzenden Regionen des Gens, welches über homologe Rekombination deletiert werden soll. Während der Rekombination erkennen die Rekombinasen die übereinstimmenden Sequenzen und binden an diese. An den Rekombinationsstellen werden die DNA-Stränge anschließend geschnitten, die Enden vertauscht und die neu kombinierten Stränge wieder verbunden (Abbildung 10).

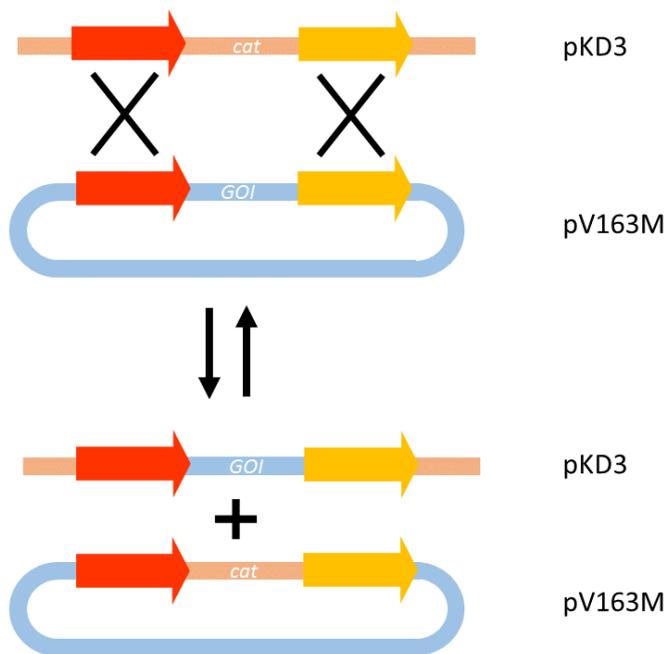


Abbildung 10 Mutagenese mit der Lambda-Red-Methode

Durch eine abschließende Inkubation über Nacht bei 37°C verlieren die Zellen das auf pKD46 kodierte Rekombinations-System aufgrund des thermosensitiven Replikationsursprungs (repA101). Als Resultat trägt das mutierte pV163M Plasmid an der Stelle des deletierten Gens eine Chloramphenicolkassette.

1.6.2 pTOX

Ein weiteres Mutagenese-Verfahren ist die Verwendung sogenannter Suizidvektoren, wie zum Beispiel die von Lazarus et al. entwickelte pTOX-Mutagenese-Methode.⁶² Das Prinzip des Allelaustausches mittels Suizidvektoren besteht darin, ein DNA-Fragment zu verwenden, das sich im Wirt selbst nicht replizieren kann, und dadurch über homologe Rekombination ins Chromosom integriert wird. Dabei werden die endogenen homologen Rekombinationsenzyme eingesetzt, um den Austausch einer eigenen Genregion durch eine fremde Sequenz zu ermöglichen. Die amerikanische Arbeitsgruppe um Jacob E. Lazarus entwickelte dazu mehrere Typen des Suizidplasmides pTOX, welches dazu verwendet werden kann, definierte Duplikationen, Punktmutationen oder Deletionen innerhalb eines Zielgenoms zu erzeugen.⁶² Anschließend können Rückschlüsse auf die Funktion einzelner Gene gezogen werden (Reverse Genetik). Ein Vorteil dabei ist, dass sie keine Narben auf dem Chromosom

hinterlassen („scarless mutagenesis“) und daher die Kombination mehrerer Mutationen auf demselben Genom möglich ist. Der eingesetzte Plasmidvektor pTOX weist einige Besonderheiten auf (Abbildung 11).

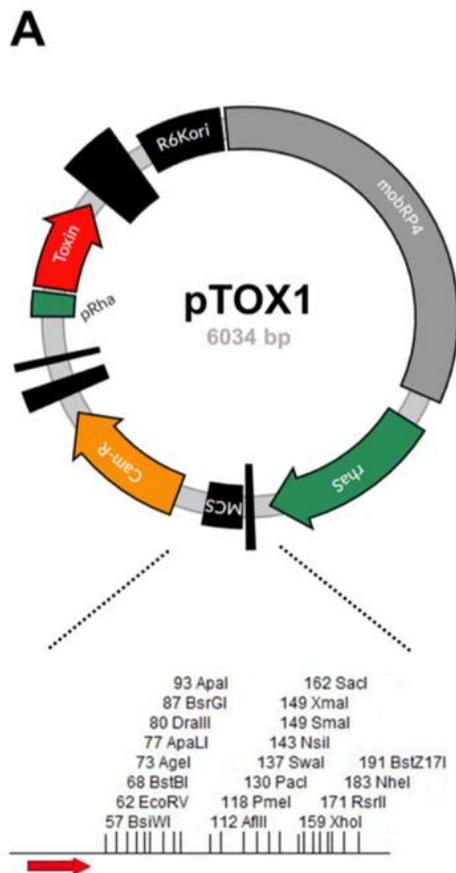


Abbildung 11 Darstellung des pTOX1-Plasmides. Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus: A new suite of allelic-exchange vectors for the scarless modification of proteobacterial genomes⁶²

Neben dem konditionellen Replikationsursprung aus dem Plasmid R6K und einem selektierbaren Marker (Antibiotikaresistenz), besitzen die pTOX-Suizidplasmide mehrere Klonierungsstellen innerhalb der sogenannten *multiple cloning site* (MCS) mit verschiedenen Restriktionsenzym-schnittstellen. Der konditionelle R6K-Replikationsursprung führt dazu, dass sich die pTOX-Plasmide lediglich in *E. coli*-Laborstämmen replizieren können, die das Replikationsgen *pir* tragen. In Stämmen, die *pir* nicht enthalten, wird das Plasmid daher über homologe Rekombination ins Chromosom integriert. Die pTOX-Plasmide kodieren entweder für eine Chloramphenicol- oder Gentamicinresistenz. Des Weiteren benötigt der Vektor ein Gegenselektionsgen, um ihn später wieder aus dem Bakterium entfernen zu können. Ein weit

verbreitetes Gegenselektionssystem stellt die Verwendung des *sacB*-Gens dar, welches Gram-negativen Bakterien eine Saccharose-Empfindlichkeit verleiht.⁶³ Die *sacB*-Kassette wurde bei pTOX durch ein Rhamnose-induzierbares Toxin-System, bestehend aus 3 Toxinen (kodiert durch *yhaV*, *mqsR* und *tse2*), aus der pSLC-Vektorserie ersetzt.⁶⁴ Die unterschiedlichen pTOX-Plasmide tragen jeweils eines dieser Toxine. Durch den *rhaS*-Promotor wird eine enge Kontrolle der Toxin-Aktivierung ermöglicht, da er durch Rhamnose induziert und durch Glukose unterdrückt wird. Des Weiteren besitzen pTOX-Plasmide ein zusätzliches Modul, das für das AmilCP-Protein kodiert. AmilCP ist ein von der Koralle *Acropora millepora* stammendes blaues Chromoprotein und erleichtert den visuellen Nachweis von pTOX-Transkonjuganten. Zur Vorbereitung der Mutagenese werden die entsprechenden PCR-Produkte zunächst mit pTOX isotherm assembliert, um den Vektor anschließend mittels Elektroporation in einen *E. coli*-Stamm zu übertragen (Abbildung 12).

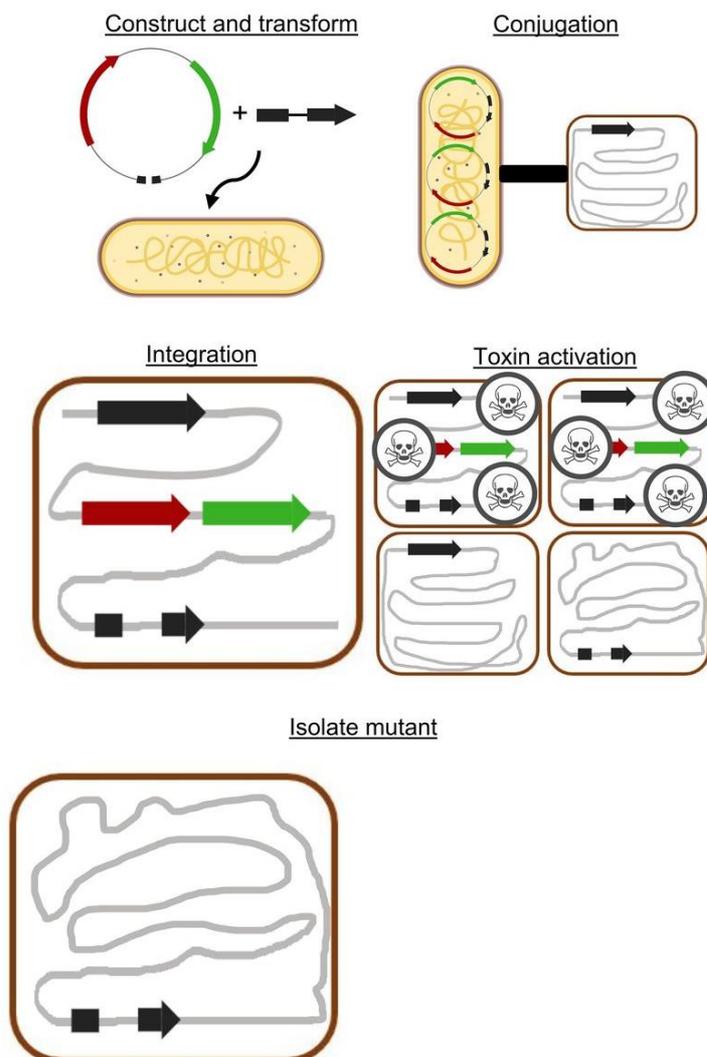


Abbildung 12 Darstellung der Strategie zur Deletion von Genen über die pTOX-Mutagenese. Abbildung mit Erlaubnis entnommen aus: A new suite of allelic-exchange vectors for the scarless modification of proteobacterial genomes⁶²

Es können unterschiedliche PCR-Produkte in die pTOX-Varianten eingefügt werden. Bei Deletion eines Gens werden die flankierenden Regionen dieses Gens über die MCS in die pTOX-Varianten kloniert. Soll ein Gen über site directed mutagenesis verändert werden, wird eine veränderte Version des Gens integriert.

Dieser *E. coli* dient bei der darauffolgenden Konjugation (Abbildung 12, „*Conjugation*“, gelbes Bakterium) als Donor, um das Plasmid schließlich in den Zielorganismus (z.B. *E. coli* MG1655 mit pV163M, weißes Bakterium) zu schleusen. Bei einem ersten homologen Rekombinationsereignis wird das gesamte Plasmid in das Chromosom der Wirtszelle integriert (Abbildung 12, „*Integration*“). Durch das dabei zur Selektion eingesetzte Antibiotikum und die Tatsache, dass es sich bei dem pTOX-Plasmid um ein Suizid-Plasmid handelt, welches im Zielorganismus nicht repliziert werden kann, ist das Bakterium gezwungen das Plasmid durch homologe Rekombination aufzunehmen, um zu überleben. Die Antibiotika-Selektion führt demnach zu Isolaten, die das Plasmid über die Homologie zwischen dem klonierten Fragment und der entsprechenden Region des Empfängerchromosoms in das Wirtschromosom bzw. das zu verändernde Plasmid integriert haben. Bei der Gegenselektion wird in einem zweiten Rekombinationsvorgang (Abbildung 12, „*Toxin activation*“) der integrierte Vektor wieder aus dem Chromosom oder Plasmid entfernt. Durch Zugabe von Rhamnose wird das Toxinsystem aktiviert, sodass nur die Bakterien, die den Vektor durch homologe Rekombination aus ihrem Chromosom/Plasmid entfernt haben und bei denen gleichzeitig der Austausch des *gene of interest* stattgefunden hat, überleben. So wird eine direkte Selektion auf den Verlust des Plasmids erreicht. Um das Vorhandensein der (chromosomalen) Mutation (Abbildung 12, „*isolate mutant*“) zu überprüfen, kann zum Größenvergleich eine Kolonie-PCR durchgeführt werden. Handelt es sich um eine Insertion oder Deletion, die zu einem signifikanten Größenunterschied führt, kann dadurch der Allelaustausch bestätigt werden.

1.6.3 AQUA Cloning

Die Assemblierungsklonierung ersetzt aus Gründen der Effizienz und Leistungsfähigkeit zunehmend die klassischen Klonierungsmethoden, die von Restriktionsenzymen und DNA-Ligasen abhängig sind. Eine einfache und kostengünstige Assemblierungs-Technik stellt Advanced quick assembly (AQUA) Cloning dar. Der Anwendungsbereich reicht von der DNA-

Fragment-Assemblierung, der Insertions- und Deletionsmutagenese, bis hin zum Einbringen von Punktmutationen in Zielsequenzen. In der Forschung wird AQUA Cloning deshalb häufig dazu genutzt, kleine Plasmide aus mehreren linearen Fragmenten zu generieren bzw. zu mutieren.⁶⁵

Im Prinzip wird dabei die intrinsische *in vivo* Prozessierung von DNA-Fragmenten mit kurzen homologen Regionen von 16 bis 32 bp durch *E. coli* genutzt. Um einzelne Gene zu deletieren, müssen die homologen Sequenzen so gestaltet werden, dass bestimmte Regionen während des Assemblierens ausgelassen werden. Dazu ist ein systematisches Primerdesign notwendig. Die speziellen Mutagenese-Primer müssen also neben ihrer Komplementarität zum Zielplasmid überlappende Sequenzen zu angrenzenden Fragmenten (*upstream* und *downstream*) aufweisen (Abbildung 13).

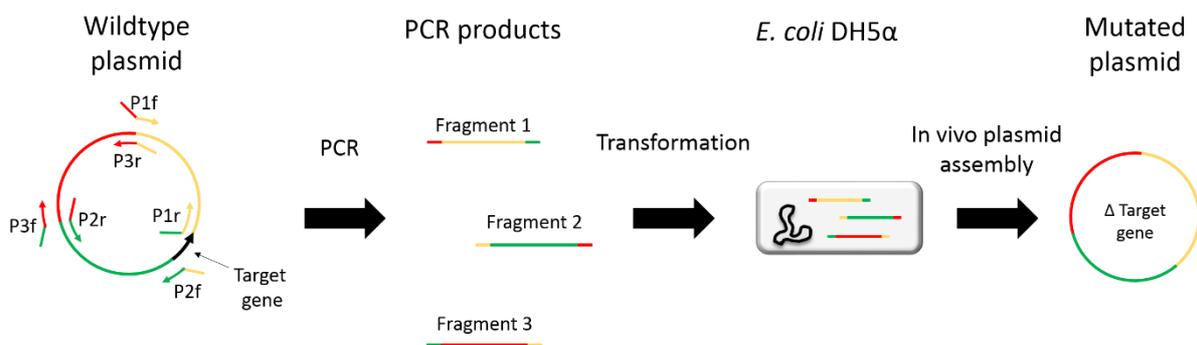


Abbildung 13 Darstellung der Funktionsweise des AQUA Clonings.

So werden PCR-Produkte generiert, die anschließend chemisch in hocheffiziente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert werden. Treffen die homologen Abschnitte in der Zelle aufeinander, lagern sich die komplementären Basenpaare aneinander und das DNA-Reparatursystem der Zelle verknüpft die Fragmente *in vivo* über homologe Rekombination. Vorteilhaft ist, dass diese Methode weder Kits, Enzyme noch spezielle Reagenzien zur Durchführung erfordert. Außerdem werden im Gegensatz zu klassischen Ligationen die Enden bei dem AQUA Cloning nahtlos ohne „Narben“ miteinander verbunden (seamless cloning). Am Folgetag kann durch Größenvergleich zweier PCR-Produkte mittels simpler Kolonie-PCR innerhalb weniger Stunden überprüft werden, ob eine Deletion erfolgreich war. Problematisch ist, dass diese Methode von der Generierung der Primer limitiert wird. Da für Deletions-Mutagenesen jedes Mal eine PCR durchgeführt werden muss, die ein bestimmtes Gen auslöst, ergeben sich je nach Position im Plasmid Schwierigkeiten eine der Annealing-Temperatur des PCR-Ansatzes

entsprechende Primersequenz zu generieren. Die Annealing-Temperatur liegt ungefähr 3-5°C unterhalb der Schmelztemperatur und richtet sich nach der verwendeten Polymerase. Da die Schmelztemperatur eines Primers von seiner Länge und seiner Zusammensetzung abhängt, muss die Länge des Primers so gewählt werden, dass eine optimale Anlagerung der Primer an der DNA-Matrize gewährleistet ist. Dabei sollte die Schmelztemperatur des Primers weder zu hoch noch zu niedrig sein, da die Effizienz der PCR maßgeblich davon abhängt. Auch müssen Stapelwechselwirkungen, wie Dimerisierungen oder *Hairpins*, berücksichtigt werden, die durch ein unausgewogenes Verhältnis von GC-Paaren zu AT-Paaren entstehen können.⁶⁶ So hängt die Qualität des eingesetzten Primers direkt von der generierten Primersequenz ab. Die Primer-Generierung ist dementsprechend durch die vorgegebenen Basensequenzen an den flankierenden Sequenzen des zu deletierenden Gens limitiert.

1.6.4 CRISPR/Cas9

Mit der CRISPR/Cas-Methode (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) lässt sich DNA mittels einer Nuklease gezielt schneiden und verändern (*Genome Editing*). Der Doppelstrangbruch der DNA wird von der Zelle repariert, wobei durch ungenaue Reparatur einige Nukleotide verloren gehen oder eingefügt werden. Neben Insertionen und Deletionen einzelner Nukleotide können aber auch ganze Gene mit dem CRISPR/Cas-System eingefügt, entfernt oder ausgeschaltet werden.⁶⁷ Aufgrund der einfachen Durchführung und der geringen Kosten wird die CRISPR/Cas-Methode vermehrt in der Forschung eingesetzt.⁶⁸ CRISPR stellt ursprünglich zusammen mit den CRISPR-assoziierten Proteinen einen adaptiven antiviralen Abwehrmechanismus im Erbgut dar, mit dem sich Bakterien gegen Bakteriophagen-Infektionen schützen.⁶⁹ Der CRISPR-Genlocus setzt sich aus dem CRISPR-Array, der Leader-Sequenz und den Cas-Genen zusammen. Bei einer Infektion mit Fremd-DNA bauen die Bakterien kurze Abschnitte der Virus-DNA in den CRISPR-Bereich, der aus sich abwechselnden Spacern und Repeats besteht, ein. Die Repeat-Sequenzen stellen kurze DNA-Abschnitte dar, die eine palindromische Struktur aufweisen. Sie werden durch die aus dem Erbgut der Viren stammenden Spacer-Sequenzen unterbrochen. Bei einer Reinfektion durch die Phagen wird der CRISPR-Array, der die Phagensequenzen enthält, abgelesen und es entsteht die prä-crRNA. In weiteren Schneideschritten entstehen aus dem langen Strang

kürzere crRNA-Stücke, die jeweils einen Spacer enthalten. Außerdem wird zur Reifung der crRNA eine tracrRNA benötigt, die teilweise komplementär zur prä-crRNA ist und an diese bindet. Dabei bildet sie eine RNA-Doppelhelix aus und die tracrRNA wird durch die RNase III in die aktive Form überführt.⁷⁰ Die fertige crRNA weist dann den Endonukleasen, wie Cas9, den Weg zu der DNA-Sequenz, die sie zerschneiden sollen. Dazu lagern sich die RNA-Moleküle an das komplementäre DNA-Stück an, woraufhin das Enzym beide Stränge der DNA zerschneidet. Es entsteht ein Doppelstrangbruch. Für die molekularbiologische Anwendung wurden die tracrRNA und die crRNA zu einer sgRNA fusioniert, die in der Natur so nicht vorkommt und die Cas9 zum DNA-Zielabschnitt leitet. Bei der Genom Editierung werden mehrere sgRNAs gleichzeitig in die Zielzelle eingebracht, um mehrere Zielsequenzen in einem Experiment durch Cas9 schneiden zu können.⁷¹ Die PAM-Sequenz (Protospacer Adjacent Motif) ist eine aus drei Basen bestehende Erkennungssequenz (NGG), die in einem definierten Abstand zur Schnittstelle liegen muss und ein versehentliches Schneiden der eigenen DNA mit derselben Sequenz verhindert.⁷² Allerdings führt dies auch zu Einschränkungen der Methode, da dadurch nicht jede Stelle punktgenau geschnitten werden kann. Der entstandene Doppelstrangbruch wird von der Zelle selbst repariert, wobei der Reparaturmechanismus vom Zelltyp abhängt. Die meisten eukaryotischen Zellen führen ein *Non Homologous End Joining* (NHEJ) durch, bei dem kleine Fehler und dadurch Deletionen oder Insertionen entstehen. Einige wenige Zellen, wie meristematische Zellen, können Schnitte exakt reparieren, durch *Homology-Directed Repair* (HDR). Um Gene komplett auszuschalten, kann der Schnitt so gesetzt werden, dass das Startcodon ATG zerstört wird (*Knock-out*). Um lineare DNA einzufügen, muss dieses mit den Bereichen beiderseits des Schnitts homolog sein, sodass es durch die zelleigene DNA-Reparatur mit den Enden der Schnittstelle verbunden und das fremde Gen ins eigene Genom integriert werden kann (*Knock-in*).⁷¹

1.7 Zielstellung dieser Arbeit

Die weltweite Verbreitung des Plasmid-kodierten Colistin Resistenzgens *mcr-1* lässt darauf schließen, dass es Plasmid-Gene gibt, welche die Verbreitung von *mcr-1*-kodierenden IncX4-Plasmiden fördern. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der auf pV163M kodierten Gene dahingehend zu überprüfen. Um die Funktionen einzelner Gene zu analysieren, werden Gene des Plasmids deletiert und die Auswirkung auf unterschiedliche Plasmideigenschaften, wie beispielsweise die Konjugationseffizienz, untersucht. In einer vorausgegangen Arbeit der Medizinischen Mikrobiologie Gießen konnte die AQUA Cloning-Methode bereits genutzt werden, um Gene von pV163M zu deletieren.⁴⁴ Die oben genannten Primer-assoziierten Probleme führten allerdings zu einer Limitierung des Verfahrens, sodass weitere Deletions-Mutagenesen gescheitert sind. Teil dieser Arbeit ist demnach die Etablierung eines geeigneten Mutageneseverfahrens, um gezielte Mutationen in natürlichen Plasmiden herzustellen.

2. Material

2.1 Chemikalien

Tabelle 1 Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und ihre Abkürzungen sind gemeinsam mit dem Hersteller in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Bezeichnung	Hersteller	Abkürzung
1 Kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	1 Kb Ladder
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid	Serva	X-Gal
Agarose	Roth	
Aqua ad iniectabilia	Braun	Aqua a.i.
Bacto™-Agar	BD	
Borsäure	Merck	
Bromphenolblau	Serva	
Calciumdichlorid	Roth	CaCl ₂
Chloramphenicol	Roth	Cm
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Biochrom	PBS
Ethanol, absolute; 99,8 %	Sigma-Aldrich	
Ethidiumbromid _{aq} [5 mg/ mL]	Roth	
Ficoll (Typ 400)	Pharmacia	
Gelatine	Biorad	
Glycerol \geq 99,5%	Roth	
Hefeextrakt	BD	
Isopropanol, puriss. p.a.; 99,8 %	Sigma-Aldrich	
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Serva	IPTG
Kalciunacetat	Merck	KAc
Kaliumchlorid	Merck	KCl
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich	Km
Kristallviolett	Sigma-Aldrich	KV
L(+)-Arabinose	Roth	
Magnesiumdichlorid	Merck	MgCl ₂

Bezeichnung	Hersteller	Abkürzung
Mangan(II)-chlorid	Merck	MnCl ₂
Natriumazid reinst	Merck	
Natriumchlorid	Honeywell	NaCl
PCR Nukleotide Mix [10 mM]	Roche	dNTPs
Salzsäure 32 % reinst	Merck	
TRIS Pufferan ≥99,9%	Roth	TRIS
Trypton	Merck	
Tween®20 pure	Sigma-Aldrich	
Deionisiertes Wasser	hauseigen	
Reinstwasser	hauseigen; Millipore	ddH ₂ O

2.2 Nährmedien

LB- Medium

Hefeextrakt 5 g/ L

Trypton 10 g/ L

NaCl 10 g/ L

ddH₂O *ad* 1000 mL

Das LB-Medium wird vor dem Gebrauch für 30 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von Agar-Platten wird das Medium mit 1,5% Bacto-Agar versetzt und in 25 ml-Portionen in Petri-Schalen gegossen. Antibiotika können vor dem Gießen der Platten je nach Bedarf in der gewünschten Konzentration zugegeben werden, sobald die Temperatur des Mediums auf ca. 50°C abgekühlt ist.

Zur Herstellung von IPTG/X-Gal-Platten werden dem LB-Agar IPTG und X-Gal in entsprechenden Konzentrationen zugegeben.

	<u>Stocklösung</u>	<u>Lösungsmittel</u>	<u>Endkonzentration</u>
X-Gal	20 mg/ml	N,N-Dimethylformamid	40 µg/ml
IPTG	100 mM	Aqua a.i.	0,1 mM

2.3 Lösungen und Puffer

2.3.1 Puffer für Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

PCR-Puffer	1 M TRIS	200 µL
	1 M MgCl ₂	20 µL
	1 M KCl	250 µL
	10% Tween [®] 20	50 µL
	10 mg/ mL Gelatine	100 µL
	ddH ₂ O ad 2 mL	

2.3.2 Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

Ficoll-Lösung 25%	Ficoll (Typ 400, autoklaviert)	2,5 g
	Bromphenolblau	0,03 g
	ddH ₂ O ad 10 mL	

TBE (10x)	TRIS	108 g
	Borsäure	55 g
	0,5 M EDTA, pH 8	20 mL
	ddH ₂ O ad 1000 mL	

Für die Herstellung eines 1x TBE Puffers werden 100mL 10x TBE-Puffer mit ddH₂O auf 1L aufgefüllt.

DNA-Auftragspuffer 6x	Ficoll-Lösung 25%	400 µL
	Aqua a.i.	600 µL

2.3.3 Puffer für Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

CCMB80-Puffer	CaCl ₂	11,76 g/ L
	MnCl ₂	3,96 g/ L
	MgCl ₂	2,03 g/ L
	1 M KAc	10 mL
	Glycerol ≥99,5%	100 mL

Magnesiumchlorid und Mangan(II)-chlorid werden in 800 mL ddH₂O gelöst. Anschließend werden die KAc-Lösung und das Glycerol hinzugegeben und der pH-Wert mit 1 M HCl(aq) auf 6,4 eingestellt. Danach wird das Volumen mit ddH₂O auf 1 L aufgefüllt und der Puffer sterilfiltriert (0.22 µm Porengröße).

2.3.4 Herstellung elektrisch-kompetenter Zellen

Glycerol 10%	Glycerol ≥99,5%	100 mL
	ddH ₂ O	900 mL

Nach dem Zusammenmischen wird der Puffer autoklaviert.

2.4 Agarose-Gel

Agarose-Gel 1%ig	1x TBE	400 mL
	Agarose	4 g

Das Agarose-Pulver wird in 1x TBE-Puffer eingerührt und in der Mikrowelle aufgeköcht, bevor ein Tropfen Ethidiumbromid [5 mg/ mL] zugegeben wird. Anschließend wird das Gel gegossen.

2.5 Bakterienstämme und Plasmid-Derivate

Tabelle 2 Verwendete *E. coli*-Bakterienstämme dieser Arbeit sowie der jeweilige Genotyp sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Stamm	Genotyp	Referenz
J53	F- <i>met pro Azi^r</i>	Jacoby <i>et al.</i> ⁷³
DH10β	K-12 F- <i>endA1 deoR+ recA1 galE15 galk16 nupG rpsL Δ(lac)X74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) StrR λ-</i>	openwetware.org
MG1655	K-12 F- <i>λ- ilvG- rfb-50 rph-1</i>	openwetware.org

2.5.1 Antibiotika zur Kultivierung der verwendeten *Escherichia coli*-Stämme

Tabelle 3 Informationen zu Antibiotikaresistenzen der verwendete *E. coli*-Bakterienstämme

Stamm	Antibiotikum	Konzentration [μg/ mL]	Lösungsmittel	Abkürzung
J53	Natriumazid	200	Aqua a.i.	NaZ
DH10β [pV163M] und Mutanten	Kanamycin	50	Aqua a.i.	Km
MG1655 [pV163M] und Mutanten	Kanamycin	50	Aqua a.i.	Km
DH10β [pV163M] Δ IS_26	Chloramphenicol	20	Ethanol	Cm
MG1655 [pV163M] Δ IS_26	Chloramphenicol	20	Ethanol	Cm

2.5.2 Verwendete Plasmide

Tabelle 4 Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pTOX1	R6K _γ ori, Cm ^R , oriT, P _{Rha}	Lazarus et al. ⁶²
pKD46	<i>oriR101</i> , <i>repA101(ts)</i> , <i>araC</i> , P _{araB-gam-bet-exo} , Ap ^R	Datsenko & Wanner, ⁵⁵
pKD3	<i>oriR_γ</i> , Cm ^R , Ap ^R	Datsenko & Wanner, ⁵⁵

pTOX1 war ein Geschenk von Matthew Waldor und wurde über Addgene beschafft (Addgene plasmid # 127446 ; <http://n2t.net/addgene:127446> ; RRID:Addgene_127446).

2.5.3 Plasmid-Mutanten von pV163M

Tabelle 5 Im Zuge dieser Arbeit erzeugte Plasmid-Mutanten von pV163M sind in der nachfolgenden Tabelle spezifiziert.

Plasmid	Abkürzungen	Deletionsbereich [bp]/ Gen
pV163M	<i>ΔparA</i>	7032 - 7679/ <i>parA</i>
	<i>Δhp29</i>	23.369 - 23.554/ hypothetisches Protein 29 (<i>hp29</i>)
	<i>Δhp30</i>	23.574 - 23.753/ hypothetisches Protein 30 (<i>hp30</i>)
	<i>Δhp36</i>	29.313 - 29.489/ hypothetisches Protein 36 (<i>hp36</i>)
	<i>Δhp38</i>	29.878 - 30.171/ hypothetisches Protein 38 (<i>hp38</i>)
	<i>Δhp45</i>	34.006 - 34.179/ hypothetisches Protein 45 (<i>hp45</i>)
	<i>Δhp49</i>	34.898 - 35.440/ hypothetisches Protein 49 (<i>hp49</i>)
	<i>Δhp52</i>	36.198 - 36.350/

		hypothetisches Protein 52 (<i>hp52</i>)
	$\Delta pilx2$	28.350 - 28.676/ <i>pilx2</i>
	$\Delta pilx3-4$	25.584 - 28.331/ <i>pilx3-4</i>
	$\Delta pilx5$	24.856 - 25.572/ <i>pilx5</i>
	$\Delta pilx6$	23.750 - 24.844/ <i>pilx6</i>
	$\Delta pilx7$	23.228 - 23.356/ <i>pilx7</i>
	$\Delta pilx8$	22.549 - 23.235/ <i>pilx8</i>
	$\Delta pilx9$	21.644 - 22.549/ <i>pilx9</i>
	$\Delta pilx10$	20.533 - 21.651/ <i>pilx10</i>
	$\Delta pilx11$	19.503 - 20.531/ <i>pilx11</i>
	$\Delta hicA$	32.689 - 32.937/ <i>hicA</i> -Toxin
	$\Delta hicA/B$	32.345 - 32.937/ <i>hicA</i> -Toxin; <i>hicB</i> -Antitoxin
	$\Delta taxA$	31.481 - 31.978/ <i>taxA</i>
	$\Delta taxB$	17.654 - 19.471/ <i>taxB</i>
	$\Delta cag12$	17.223 - 17.642/ cytotoxin-associated gene 12 (<i>cag12</i>)
	Δeex	29.666 - 29.881/ <i>eex</i>

	ΔSM (stealth module)	13.208 - 16.623/ <i>hns; hha; topB</i> ; hypothetisches Protein 20 (<i>hp20</i>)
	$\Delta dnaJ$	35.545 - 36.060/ <i>dnaJ</i>
	$\Delta trbM$	16.934 - 17.239/ <i>trbM</i>
	$\Delta parA$	7032 - 7679/ <i>parA</i>
	ΔIS_{26}	9167 - 13.184/ Transposase von <i>IS26</i> ; Transposase von <i>IS10R</i> ; hypothetisches Protein 15; Aminoglykosid 3'- Phosphotransferase

2.6 Primer

2.6.1 Lambda-Red-Rekombinase-Primer

Zur Etablierung der Lambda-Red-Rekombinase-Technik wurde zunächst das Gen *lacZ* in MG1655 mit den unten genannten Oligonukleotiden amplifiziert.

Tabelle 6 Die für die Lambda-Red-Mutagenese von MG1655 verwendeten Primer. Grün und blau markiert sind die mit pKD3 übereinstimmenden Bereiche

Bezeichnung	Deletion von	Sequenz 5'→3'
LF_LacRF2	lacZ	GGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTGTGTA GGCTGGAGCTGCTC
LF_LacZR2		TTACGCGAAATACGGGCAGACATGGCCTGCCCGTTATTACATAT GAATATCCTCCTAG

Zur Mutagenese von pV163M mittels Lambda-Red-Rekombinase wurden nachfolgende Oligonukleotide verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7 Die für die Lambda-Red-Mutagenese von pV163M verwendeten Oligonukleotide sind in der nachfolgenden Tabelle mit Namen und Sequenz aufgeführt. Grün und blau markiert sind die mit pKD3 übereinstimmenden Bereiche.

Bezeichnung	Deletion von	Sequenz 5'→3'
NK_hp20_F	hp20	TGCTACTGCGGGTTTTTCTGCGATAAAAAGTCTCATTTTTG GTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
NK_hp20_R		GGCACAACCTGACTATTTAAGTTACCTGGAGGATTAACAC CATATGAAT ATCCTCCTTAG
NK_hp29_F	hp29	GGAAAAACAAAAGAATCACACATCGCATAAATTCACCTTA GTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
NK_hp29_R		ATCAGTCAGAGCTGGTTGTGACATGCTTCATTATTTTGTC CATATGAATA TCCTCCTTAG
NK_hp30_F	hp30	TAGGACAAAATAAAGTATCATGACAAAATAATGAAGCATG GTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
NK_hp30_R		GACTTGCATCCCTGGAAAAAGCACGAGCGAGGAACGCCGC CATATGAA TATCCTCCTTAG
NK_hp36_F	hp36	GCCGCACACAGCAACAAGGCTGGGAATAAAGACGCCATAG GTGTAGG CTGGAGCTGCTTC
NK_hp36_R		CTAAAACAAATCCAAAACACACTTATAGTGGATTGATTAAC CATATGAAT ATCCTCCTTAG
NK_hp38_F	hp38	CCAACAACGAAGAACGGCAAAGCAAAAAGCAGATATTTTT GTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
NK_hp38_R		GCTCACCTGCTGATCACAACAACCTACGAGGGAGGTTATC CATATGAAT ATCCTCCTTAG
NK_hp45_F	hp45	ACAGATGAGCATTTTCATTTTAAATCTCCTGCCCTGCTGGG GTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
NK_hp45_R		CCTGGTACGTTTCGTCAGCGGCTGCGCCGCGCTTCGGGGCG CATATGAA TATCCTCCTTAG

NK_hp49_F	<i>hp49</i>	TCTTTTTCAAGAAAATAAGTCACATCACCTTTATTTTTTC GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC
NK_hp49_R		AAAGACGGGAACAGCAGCCACGTAGCAAAAAGGGAAACAG CATATGA ATATCCTCCTTAG
NK_hp52_F	<i>hp52</i>	TCCCGTTTTTTTACTCGATAAGTGATTGTTATCACGTTTT GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC
NK_hp52_R		GCGCTAACTGCGGCATTCTGCGGCGCAAATCAGCATAATC CATATGAAT ATCCTCCTTAG
NK_pilx2_F	<i>pilx2</i>	TCGCTTTATAAAGTGTAGACATACTATCGTCCCCGCTTTA GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC
NK_pilx2_R		TCACATCCAACAAAAGTTATTAATTAACAGGACTTATAAA CATATGAAT ATCCTCCTTAG
NK_pilx3-4_F	<i>pilx3-4</i>	ATCAGCATCAATGTTTTTACACGTTTCATAAATTCACCTG GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC
NK_pilx3-4_R		TGCATCAATGATGGTTAACTAATAAAGCGGGGACGATAGT CATATGAA TATCCTCCTTAG
NK_pilx5_F	<i>pilx5</i>	TTATATTTAACGAAAAACCCTGAGCCATATATCCACCTT GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC
NK_pilx5_R		TTCCTGAATATCTCGAACGGGCAATCTGACAGGTGAATTT CATATGAAT ATCCTCCTTAG
NK_pilx6_F	<i>pilx6</i>	CAGTTCAGGGACATCACATAAAAAAACGTTTCATTATTT GTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
NK_pilx6_R		AAGAAGCTGAACCATTAACCTTTGATTAAGGTGGATAT CATATGAAT ATCCTCCTTAG
NK_pilx7_F	<i>pilx7</i>	TTCGAAGGATTTAGCTGTCTCAATCTTCTTTTCGATTTTT GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC
NK_pilx7_R		TCTCTAAAGGTGTTCTGTAACGCTTAATAAGGTGAATTT CATATGAAT ATCCTCCTTAG
NK_pilx8_F	<i>pilx8</i>	CCAGGAAGCAATAAACATGTAGCAATAAATAATTTCTTCA GTGTAGGCT GGAGCTGCTTC

NK_pilx8_R		GGCGAACTGGAACCCATTAACCACAGCCAGGTAATCAGTTCATATGAAT ATCCTCCTTAG
NK_pilx9_F	<i>pilx9</i>	CTGATTTCGCATCATCAACTAAATCATCTGTTTTTTCATAGTGTAGGCTG GAGCTGCTTC
NK_pilx9_R		TAACCAGTTACCAGACAGATCGGGAAGTCAGGGGGGAATGCATATGA ATATCCTCCTTAG
NK_pilx10_F	<i>pilx10</i>	CGATTTATTGCTAATGCTGACAGGAATAACGCCACTCATA GTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
NK_pilx10_R		AATACATCTTCTCCTGCGGTAGAACGTGTTGAGGTGAATA CATATGAAT ATCCTCCTTAG
NK_pilx11_F	<i>pilx11</i>	AACAAGCATAACAGCGAATATAAAAACAGATTGCGACTTA GTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
NK_pilx11_R		ATTGATTTTTCTGATATCTATGAGTTAAAGGTAAAATAGT CATATGAATA TCCTCCTTAG
NK_hicA_F	<i>hicA</i>	GGTTCAACCGTGCCTAAATATCCTTTATATTTTAAATGTT GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC
NK_hicA_R	<i>hicA/B</i>	TGTAACTATAATTAGTTGCATATCTATAGGGGATGGATTT CATATGAAT ATCCTCCTTAG
NK_hicB_F	<i>hicB</i>	GCGCCTCCCATGCCCTTACAGGGCATAAAAACAAGGGCAA GTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
NK_taxA_F	<i>taxA</i>	GTTAATACGGTATTCTGTTCTACATACACACCATAAA GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC
NK_taxA_R		CCTGTGCCTGCCGAGGCTCTGTTGGGGTGACTTATGAAG CATATGAAT ATCCTCCTTAG
NK_taxB_F	<i>taxB</i>	GAAATCAATAAAAACACTAACTTCTTCATCATGTTCTCCT GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC
NK_taxB_R		AACTTTTAATAAGTCGCAATCTGTTTTTATATTCGCTGTT CATATGAATAT CCTCCTTAG
NK_Cag12_F	<i>cag12</i>	TGATATTAATCCTAACGCCAGCAAGGCTGGTAAAACCACT GTGTAGGCT GGAGCTGCTTC

NK_Cag12_R		ATGTTCTGATCTCGATAAAGCGGCATAAAGGAGAACATG CATATGAA TATCCTCCTAG
NK_eex_F	eex	AAGCGCCCATATGGGCGCTCTAGTATGATTGAAACATTAG GTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
NK_eex_R		TCGTGTCAAGTCTTCCAGGATCAGTGAGAGGGGAATTT CATATGAAT ATCCTCCTAG
LF_SM_F2	Stealth module	GGCACAACCTGACTATTTAAGTTACCTGGAGGATTAACAC GTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
LF_SM_R2		CTATTTGCAACAGTGCCCTGTGTGATGTATACTTGGCGGG CATATGAAT ATCCTCCTAG
NK_DJ_MF	dnaJ	GGCTGGCTATAATATCGGGGGCTTCTCGCCCCGTTCTGG GTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
NK_DJ_MR		CCCCTCTACAATAGCCCAGCAGGGCAGGAGATTAATAAA CATATGAA TATCCTCCTAG
NK_trbM_F	trbM	CAGTACCCTGATACCCGTTGGCGGGTATCAGGTTTTAA GTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
NK_trbM_R		GTAATAATAGTTTTATTAAAGCACAAAATGAGGTGAAAA CATATGAAT ATCCTCCTAG
NK_ParA_F	parA	GTATATCATGATGATGTACATTAGTGTATGTCACTATGAT GTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
NK_ParA_R		AATACACATGAGTAAATCACTGTGACATACAAGGGGACT CATATGAAT ATCCTCCTAG
NK_IS26_F	IS26- Bereich	GGTATGTCACACAGACATACCTATGTGTATGTCTGTGTGA GTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
NK_IS26_R		CGGAACAGGCAGAATAACCCGCCAAGTATACATCACACAG CATATGAA TATCCTCCTAG

2.6.2 Deletionsnachweis-Primer

Die zum Nachweis von Deletionen verwendeten spezifischen Primer sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet (Tabelle 8, Tabelle 9).

Tabelle 8 Die zum Deletionsnachweis verwendeten Oligonukleotide sind in der nachfolgenden Tabelle mit Namen und Sequenz aufgeführt.

Nachweis Mutanten	Primer-Name	Sequenz 5'→3'
pV163MΔ <i>hp49</i> , pV163MΔ <i>hp52</i>	NK_K48_52_F	ACTCAAACCTCAACCAGTGACAGACTTTGAC
	NK_K48_52_R	CCCCGCCATGCTGCAATG
pV163MΔ <i>dnaJ</i>	NK_DJ_KF	GCTGTTCCCGTCTTTTTGGGTTC
	NK_DJ_KR	GGAATGGCCCCTCTCACAATAGC
pV163MΔ <i>hp36</i> , pV163MΔ <i>hp38</i> , pV163MΔ <i>eex</i>	NK_K38_36_F	GTATCCGGATGAACTGACGCCG
	NK_K38_36_R	CAAGGTCACAATATCGGGTTTGCTC
pV163MΔ <i>hp29</i> , pV163MΔ <i>hp30</i>	NK_K30_29_F	CCGGAAACATCAGAAGGAAGGTTATTC
	NK_K30_29_R	GCTGAATGGGCGGGTGAAAAG
pV163MΔ <i>hp20</i>	NK_K20_F	GGTAAAATTGCCACCAAGTGCCTTAAC
	NK_K20_R	GAGCGTTCAGGAAGCAGATGAAGATATAG
pV163MΔ <i>hp45</i>	NK_K47_43_F	GATCTGCCGCGTTGACATTTAAAAAC
	NK_K47_43_R	ATCGGGAACAAAACACTACGAAAATTACATTG
pV163MΔ <i>hicA</i> , pV163MΔ <i>hicA/B</i> , pV163MΔ <i>taxA</i>	Kontrollprimer1_F	GCGTTTAATACGGTATTCCTG
	Kontrollprimer1_R	GCTTATAATGATGCTCTGTTAG
pV163MΔ <i>pilx2</i>	Kontrollprimer2_F	TAAGAGGGACGACAGGAAC
	Kontrollprimer2_R	ACAAAAGCAGGCAGAGTG TG
pV163MΔ <i>pilx3-4</i>	Kontrollprimer3_F	GCGCAGTTTCGGACCATTG
	Kontrollprimer3_R	GTAGTTATGGCAGTCGCCG
pV163MΔ <i>pilx5</i>	Kontrollprimer4_F	CATAAGTTATCTAAAGTTTGCCA
	Kontrollprimer4_R	TCATGAAGGAATGGAGCCTG
	Kontrollprimer5_F	GTCGCTGCTGAATACACAAG

pV163MΔ <i>pilx7</i> , pV163MΔ <i>pilx8</i>	Kontrollprimer5_R	CAGCCATGATGGGGCTGG
pV163MΔ <i>taxB</i>	Kontrollprimer6_F	GGATTGATCACTTCATTTGCC
	Kontrollprimer6_R	ATATTGTTGTTCATGTAGGCAG
pV163MΔ <i>cag12</i> , pV163MΔ <i>trbM</i>	Kontrollprimer7_F	CTTCAGAACACCGAATTCAAG
	Kontrollprimer7_R	CCGATTCGTTGTGAAAAGGC
pV163MΔ <i>parA</i>	Kontr_ParA_F	GATGTACATTAGTGTATGTCAC
	Kontr_ParA_R	TACACATGAGTAAATCACTGTG
pV163MΔ <i>IS_26</i>	Kontr_IS26_F	CTTTTAGATGAATGCTATAGCA
	Kontr_IS26_R	CGAGATCAGAGAATGGTCTG
pV163MΔ <i>SM</i>	LF_UE_F	TGCCCTGTGTGATGTATACTTG
	LF_UE_R	CCTCGATCTGAGCGTTCAG

Restliche Kontrollprimer, bei denen das deletierte Gen nahezu der Größe der Cm-Kassette entspricht:

Tabelle 9 Die restlichen zum Deletionsnachweis verwendeten Oligonukleotide sind in der nachfolgenden Tabelle mit Namen und Sequenz aufgeführt.

Deletierte Gene	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
pV163MΔ <i>pilx11</i>	NK_pilx11_R	ATTGATTTTTCTGATATCTATGAGTTAAAGG TAAAATAGTCATATGAATATCCTCCTTAG
	Kontrollprimer6_F	GGATTGATCACTTCATTTGCC
pV163MΔ <i>pilx10</i>	NK_pilx10_F	CGATTTATTGCTAATGCTGACAGGAATAACG CCTCATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	Kontrollprimer5_R	CAGCCATGATGGGGCTGG
pV163MΔ <i>pilx9</i>	NK_pilx9_F	CTGATTCGCATCATCAACTAAATCATCTGTTT TTTTCATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
	Kontrollprimer5_R	CAGCCATGATGGGGCTGG
pV163MΔ <i>pilx6</i>	NK_pilx6_R	AAGAAGCTGAACCATTAACCTTTTGATTAATAA GGTGGATATCATATGAATATCCTCCTTAG
	Kontrollprimer5_F	GTCGCTGCTGAATACACAAG

2.7 Verwendete Kits

Tabelle 10 Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Name	Hersteller
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Genomic DNA Kit, Pure Link® Pro 96	Thermo Fisher Scientific
MSB® Spin PCRapace (500)	STRATEC Molecular
Nextera XT library preparation kit	Illumina
Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 indexes, 384 samples)	Illumina
Nextera XT Index Kit v2 Set B (96 indexes, 384 samples)	Illumina
Nextera XT Index Kit v2 Set C (96 indexes, 384 samples)	Illumina
Nextera XT Index Kit v2 Set D (96 indexes, 384 samples)	Illumina
NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 Cycles)	Illumina
NGS Fragment Kit (1-6000bp), 500	Agilent Technologies Sales & Services GmbH

2.8 Verwendete Enzyme

Tabelle 11 Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Name	Hersteller
Q5®-High-Fidelity-DNA-Polymerase [500 U]	New England Biolabs (NEB)
Taq-DNA-Polymerase [500 U]	Thermo Fisher Scientific

2.9 Arbeitsmaterialien

Tabelle 12 Die in dieser Arbeit verwendeten Arbeitsmaterialien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Bezeichnung	Hersteller
Cellstar® Pipetten (50 mL; 25 mL; 10 mL; 5 mL)	Greiner Bio-One
Cellstar® tubes (50 mL; 15 mL)	Greiner Bio-One
Elektroporationsküvetten 100 µl	Roth
Impfösen 10 µL	Sarstedt

Mikroreaktionsgefäße (2 mL; 1,5 mL)	Sarstedt
Mikrotiterplatten (96 well, Polystyrol (PS))	Greiner Bio-One
Pipetten (1000 µL; 200 µL; 100 µL; 20 µL; 10 µL)	VWR
RNase free Filterspitzen	Nerbe plus

2.10 Verwendete Geräte

Tabelle 13 Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Bezeichnung	Hersteller
Biometra TAdvanced	AnalytikJena
Brutschrank IN450	Memmert
Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific
Inkubationsschüttler KS 4000i control	IKA
Milli-Q® Direct 8	Millipore
NanoDrop™	Thermo Fisher Scientific
NanoQuant infinite M200 Pro	Tecan
Plate reader Scan 500	Interscience
Sorvall® Superspeed RC2-B	DuPont
Sterilwerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific
Table top Zentrifuge 5424	Eppendorf
Thermal Cycler 2720	Applied Biosystems
Thermomixer comfort	Eppendorf
Ultrospec 10 Cell Density Meter	Biochrom
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Gene Pulser (Elektroporationsgerät)	Bio-Rad
Gelelektrophorese-Kammer	Werkstatt Uni Gießen
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Pharmacia biotech
Universal Hood II Gel Imager	Bio-Rad
NextSeq 500	Illumina

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Das Bakterium *E. coli* kann auf verschiedene Weisen kultiviert werden. Um Einzelkolonien zu erhalten, eignet sich die Kultivierung auf Agarplatten, welche mit einer sterilen Impföse (3-Ösen-Ausstrich) beimpft und über Nacht bei der geeigneten Temperatur (30°C oder 37°C) im Brutschrank bebrütet werden. Um eine möglichst hohe Zahl an Bakterien zu erhalten, um daraus beispielweise Plasmide zu isolieren, wird ein Flüssigmedium verwendet. Für eine Übernachtkultur werden 20 mL LB-Medium mit einer Bakterien-Kolonie oder 20µL einer Glycerin-Kultur beimpft und unter Schütteln bei 180 rpm für 16 bis 20 Stunden bei der geeigneten Temperatur (30°C oder 37°C) inkubiert.

3.1.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen für Lambda-Red-Mutagenese

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wird eine Übernachtkultur der gewünschten Zellen benötigt. Die Bebrütung erfolgt bei 30°C und ggf. unter Zugabe entsprechender Antibiotika. 500µL der Übernachtkultur werden 1:100 verdünnt (LB-Medium; Endvolumen 50mL) und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 bei 600 nm Wellenlänge (OD_{600}) bei 30°C inkubiert (Tagkultur). Bei der Herstellung elektrokompetenter Zellen im Rahmen der Lambda-Red-Rekombinase-Mutagenese ist zu beachten, dass das verwendete Plasmid pKD46 einen Arabinose-induzierbaren Promotor (P_{araB}) für die Expression der Rekombinase-Gene besitzt. Deshalb wird der Bakterien-Kultur vor der Bebrütung der Tagkultur neben Ampicillin (100 µg/mL) und Kanamycin (50 µg/mL) auch 20 mM Arabinose zugefügt. Außerdem besitzt pKD46 einen thermosensitiven Replikationsursprung ($repA101$), weshalb die Bebrütung bei 30°C erfolgen muss. Sobald die Kultur eine OD_{600} von 0,6 erreicht hat, wird der Kolben für 5 min in eiskaltem Wasser geschwenkt und anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Danach erfolgt eine Zentrifugation für 8 min bei 5000 rpm und 4°C. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 50 mL kaltem 10%igen Glycerol resuspendiert und der Zentrifugationsschritt 3-mal wiederholt. Nach dem letzten Schritt wird das Pellet in 500 µL 10%igen Glycerol

resuspendiert und in 50 µL-Aliquots in 1,5 mL- Mikroreaktionsgefäßen mit Schraubverschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.3 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Die zur Herstellung chemisch-kompetenter Zellen benötigte Übernachtskultur der gewünschten Zellen wird bei 37°C und ggf. unter Zugabe entsprechender Antibiotika unter Schütteln bebrütet und anschließend 1 mL davon 1:50 verdünnt (LB-Medium; Endvolumen 50mL). In einer Tagkultur werden die Zellen so lange bei 37°C bebrütet, bis eine OD₆₀₀ von 0,3 erreicht wird. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wird die Kultur abzentrifugiert (10 min; 4000 rpm; 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 17 ml kaltem CCMB80-Puffer resuspendiert und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Dieser Waschvorgang wird wiederholt und die Zellen schließlich in 4,2 mL CCMB80-Puffer resuspendiert. Die anschließende Portionierung in 200 µL-Aliquots erfolgt in 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäßen mit Schraubverschluss. Im letzten Schritt werden die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.4 Chemische Transformation

Für die chemische Transformation werden Aliquots von 200 µL chemisch kompetenten Zellen benötigt. Diese werden 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend die gewünschte Menge DNA hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgt für 1 min ein Hitzeschock bei 42°C. Nach einer Inkubation auf Eis für 10 min erfolgt die Zugabe von 500 µL LB-Medium. Auf einem Thermoblock werden die Zellen nun bei 37°C und 450 rpm für 1 h inkubiert. Aufgrund der generell relativ geringen Transformationseffizienz werden die Zellen mithilfe eines kurzen Zentrifugationsschrittes (2 min; 2000 rpm) konzentriert. Nach der Zentrifugation werden 500µl des Überstandes verworfen und das Zellpellet in den restlichen 200µl resuspendiert. Die Ausplattierung dieser Suspension erfolgt auf vorgewärmte Selektivplatten. Bei erfolgreicher Transformation zeigen sich nach einer Inkubation über Nacht bei geeigneter Temperatur (30°C oder 37°C) Kolonien auf der Agarplatte. Bei 30°C sind Kolonien häufig erst nach 48 Stunden Inkubation zu beobachten.

3.1.5 Elektroporation

50 μL elektrokompetenter Zellen werden 10 min auf Eis aufgetaut und PCR-Produkte in der gewünschten Menge hinzugegeben. Im Rahmen der Lambda-Red-Rekombinase-Mutagenese hat sich eine Menge von 100 ng bewährt. Anschließend wird die Suspension in eine Elektroporationsküvette überführt und die Küvette in den Schlitten des Elektroporationsgeräts gestellt. Die Elektroporation wird unter einer Spannung von 1 V, einem Widerstand von 200 Ω und einer elektrischen Kapazität von 25 μFD durchgeführt. Direkt im Anschluss werden 500 μL LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37°C und 180 rpm auf dem Heizblock inkubiert. Auch hier erfolgt aufgrund der generell geringen Transformationseffizienz ein kurzer Zentrifugationsschritt (2 min; 2000 rpm). Danach folgt die Ausplattierung von 200 μL der Suspension auf vorgewärmten Selektionsplatten.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für den Ansatz einer PCR wird ein DNA-template mit dem jeweiligen Puffer, dNTPs, Primern und einer Polymerase in PCR-Reaktionsgefäße gegeben. Zur Erzeugung der benötigten PCR-Fragmente im Rahmen der Lambda-Red-Rekombinase-Mutagenese wird eine PCR mittels Q5[®] High-Fidelity DNA-Polymerase der Firma NEB[®] durchgeführt. Diese Polymerase weist eine niedrigere Fehlerrate als eine vergleichbare Taq-DNA-Polymerase auf. Zum generellen Nachweis von Deletionen oder Insertionen ist eine PCR unter Verwendung der Taq-DNA-Polymerase ausreichend. Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des PCR-Produkts (Taq-DNA-Polymerase: 1 kb \approx 1 min; Q5[®] High-Fidelity DNA-Polymerase: 1 kb \approx 30 s). Im Folgenden sind die PCR-Ansätze (Tabelle 14, Tabelle 16) und die Reaktionsbedingungen (Tabelle 15, Tabelle 17) für die unterschiedlichen Polymerasen aufgeführt. Die Annealing-Temperatur richtet sich dabei nach den individuellen Eigenschaften der eingesetzten Primer. Bei den hier durchgeführten PCR-Ansätzen ist eine Zyklenzahl von 25-30 ausreichend, um die entsprechenden Banden in der nachfolgenden Gel-Elektrophorese zu erkennen.

Q5® High-Fidelity-DNA-Polymerase

PCR-Ansatz (50µl):

Tabelle 14 PCR-Ansatz (50µl) Q5® High-Fidelity-DNA-Polymerase

Chemikalie [Konzentration]	Volumen
Q5-DNA-Polymerase	0,5 µL
DNA-template	1 Kolonie
Primer forward [10 pM]	2,5 µL
Primer reverse [10 pM]	2,5 µL
dNTPs [2 mM]	5,0 µL
Q5-Puffer [5x]	10,0 µL
Aqua a.i.	29,5 µL

Angegebene Konzentrationen beziehen sich auf die Ausgangskonzentration.

Temperaturprofil:

Tabelle 15 Temperaturprofil Q5® High-Fidelity-DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Dauer	
1. Initiale Denaturierung	98°C	30 s	
2. Denaturierung	98°C	10 s	25x
3. Primer-Annealing	55°C	30 s	
4. Elongation	72°C	1 min	
5. Finale Elongation	72°C	2 min	
6. Lagerung	4°C	∞	

Taq-DNA-Polymerase

PCR-Ansatz (50µl):

Tabelle 16 PCR-Ansatz (50µl) Taq-DNA-Polymerase

Chemikalie [Konzentration]	Volumen
Taq-DNA-Polymerase	0,2 µL
DNA-template	1 Kolonie
Primer forward [10 pM]	1,0 µL
Primer reverse [10 pM]	1,0 µL
dNTPs [2 mM]	2,0 µL
PCR-Puffer [10x]	5,0 µL
Aqua a.i.	40,8 µL

Angegebene Konzentrationen beziehen sich auf die Ausgangskonzentration.

Temperaturprofil:

Tabelle 17 Temperaturprofil Taq-DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Dauer	
1. Initiale Denaturierung	94°C	30 s	
2. Denaturierung	94°C	10 s	30x
3. Primer-Annealing	55°C	30 s	
4. Elongation	72°C	2 min	
5. Finale Elongation	72°C	2 min	
6. Lagerung	4°C	∞	

3.2.2 Mutagenese mittels Lambda-Red-Rekombinase

Die Lambda-Red-Mutagenese-Methode ist ein auf Phagen-Rekombinasen basierendes Mutageneseverfahren, mit dem sich Gene an jeder gewünschten Position auf einem Chromosom oder Plasmid deletieren lassen. Die Mutagenese beruht dabei auf homologer Rekombination von synthetischen PCR-Produkten als Rekombinationssubstrate und erfordert ein spezielles Primerdesign. Die Generierung der in 2.6.1 aufgeführten Primer-Sequenzen sowie die einzelnen Arbeitsschritte der angewandten Lambda-Red-Mutagenese-Methode sind im Folgenden aufgeführt.

3.2.2.1 Primerdesign

Die für die Lambda-Red-Mutagenese von pV163M verwendeten Oligonukleotide müssen sowohl eine Überlappung mit den flankierenden Bereichen des Resistenzmarkers als auch eine Überlappung mit dem Ziel-Gen aufweisen. Da als Resistenzmarker die Chloramphenicol-Kassette *cat* von pKD3 verwendet wurde, muss demnach das 3' Ende der Primersequenz 20 bp der flankierenden Sequenzen von *cat* beinhalten (Abbildung 14).

pKD3 *cat*:

```
GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCATTTAAATGGCGCGCCTTACGCCCCGCCCTGCCA
CTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTG
CGTATAATATTTGCCATGGTGAACCGGGGCGAAGAAGTTGCCATATTGCCACGTTTAAATCAAACCTGGTGAACCTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAA
ACATATTCTCAATAAACCCCTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGAAATCGTCGTGGTATTCAC
CCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGGTGAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCCTTTTCATTGCCATACGTAATCCGG
ATGAGCATTATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGATAAAAATTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTGAACGGTCTG
GTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAATGTTCTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTCTCCATTTAGCTT
CCTTAGCTCTGAAAATCTGACAACTCAAAAAATACGCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAGTTGGAACCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGC
CAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTCCGTACACAGGTAGGCGCGCCGAAGTTCCTACTTTCT
AGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATG
```

Abbildung 14 Chloramphenicol-Kassette *cat* aus pKD3

Der Forward-Primer enthält demnach die ersten 20bp (GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC), der Reverse-Primer die letzten 20 bp (CTAAGGAGGATATTCATATG) der flankierenden Bereiche des *cat*-Gens. Allerdings muss beim Reverse-Primer darauf geachtet werden, dass hier die rückwärts komplementäre Sequenz verwendet wird (CATATGAATATCCTCCTTAG). Für eine erfolgreiche Rekombination muss der vordere Teil der beiden Primer jeweils 40 bp der flankierenden Sequenzen zu deletierenden Gens von pV163M besitzen. Auch hier wird für die

Generierung des Reverse-Primers die Originalsequenz in die rückwärts komplementäre Sequenz überführt. So ergeben sich Oligonukleotide mit einer Gesamtlänge von 60 bp (siehe 2.6.1).

Forward-Primer: 40 bp upstream des zu deletierenden Gens + **GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC**

Reverse-Primer: 40 bp downstream des zu deletierenden Gens + **CATATGAATATCCTCCTTAG**

In Abbildung 15 wird die Anwendung der generierten Primer schematisch dargestellt.

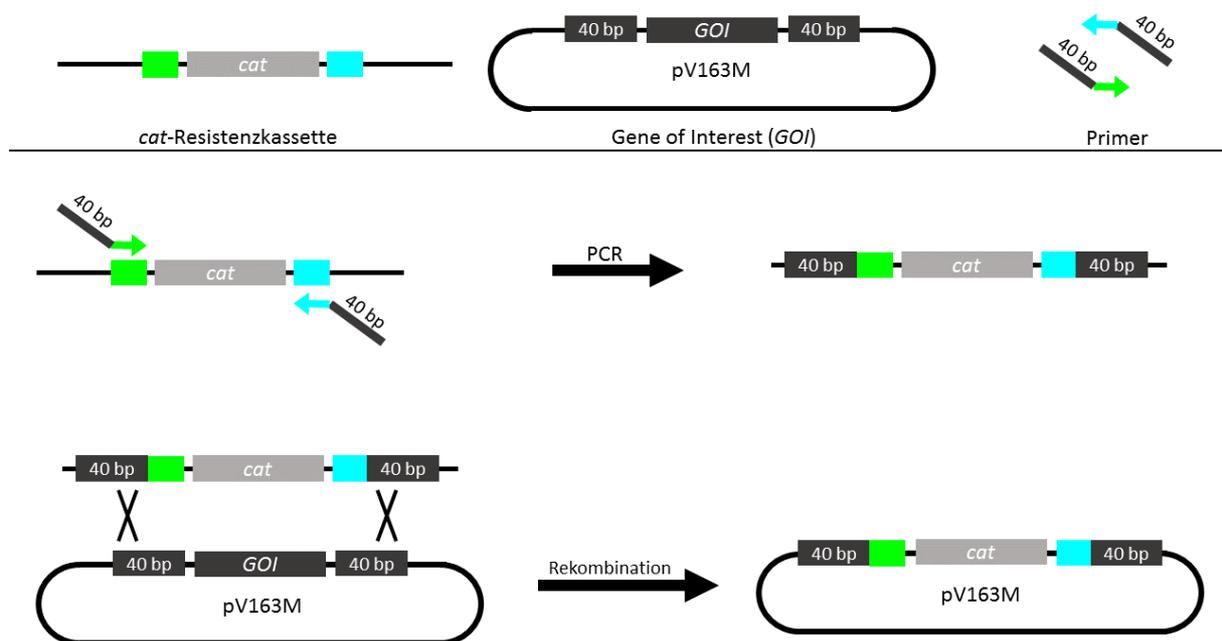


Abbildung 15 Gen-Austausch durch homologe Rekombination. Die wie in 3.2.2.1 generierten Primer lagern sich während der PCR an die homologen Sequenzen der flankierenden Sequenzen von *cat* an. Dabei dient das Plasmid pKD3 als Template. Die amplifizierten PCR-Produkte enthalten neben der *cat*-Resistenzkassette am 3'- und am 5'-Ende jeweils 40 bp der flankierenden Sequenzen des GOI (Gene of Interest) von pV163M. Während der anschließenden Rekombination mit dem Zielplasmid pV163M wird das GOI durch die *cat*-Resistenzkassette ausgetauscht.

3.2.2.2 PCR mittels Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB®)

Die benötigten PCR-Produkte der Lambda-Red-Rekombinase-Mutagenese werden in einer PCR mittels Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase hergestellt. Als DNA-template dient dabei das Plasmid pKD3, welches eine von FRT-Sequenzen flankierte Chloramphenicol-Resistenzkassette (1014 bp) besitzt. Die Primer werden so konstruiert, dass sie am 3'-Ende eine Überlappung mit der Chloramphenicol-Resistenzkassette von pKD3 und am 5'-Ende eine Überlappung mit den flankierenden Sequenzen des zu deletierenden Gens von pV163M

aufweisen. Dabei werden die Primer (Tabelle 7) mithilfe des Programmes *NEBuilder*[®] (<https://nebuilder.neb.com>) designed und von der Firma Eurofins bezogen. Das Auflösen der Primer erfolgt mit Aqua a.i. nach Herstellerangaben, um eine Konzentration von 100pM zu erreichen.

3.2.2.3 Chemische Transformation von pKD46

Die chemische Transformation von pKD46 erfolgt in den Stamm *E. coli* MG1655, welcher bereits das Zielplasmid pV163M trägt. Dabei werden 100 ng pKD46-Plasmid zu 200 µl der chemisch kompetenten Zellen gegeben und nach dem Hitzeschock bei 37°C inkubiert. Die Ausplattierung erfolgt auf vorgewärmten Selektionsplatten (100 µg/mL Ampicillin; 50 µg/mL Kanamycin). Kolonien sind nach einer Inkubation über 24-48h bei 30°C zu erwarten.

3.2.2.4 Elektroporation der PCR-Produkte

Die Zellen, die in 3.2.2.3 gewonnen wurden, werden wie in 3.1.2 beschrieben elektrokompent gemacht, um während der folgenden Elektroporation die mittels Q5[®] High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB[®]) hergestellten PCR-Produkte aufnehmen zu können. Zu 50 µL der elektrokompenten Zellen werden 100 ng der PCR-Produkte gegeben und in eine vorgekühlte 1 mm Elektroporationsküvette überführt. Wie in 3.2.5 beschrieben wird die Elektroporation durchgeführt. Die anschließende Ausplattierung erfolgt auf vorgewärmten Selektionsplatten (20 µg/mL Chloramphenicol; 50 µg/mL Kanamycin), welche bei 37°C über Nacht inkubiert werden.

3.2.2.5 Kolonie-PCR

Die auf den Selektionsplatten gewachsenen Kolonien werden mit einem Zahnstocher angetippt und der *Colony*-PCR-Ansatz, wie in 3.2.1 beschrieben, durchgeführt. Dabei ist der Ansatz mit der Taq-DNA-Polymerase ausreichend, um Deletionen nachzuweisen. Zum Nachweis einer erfolgreichen Deletion müssen Primer generiert werden, die das Zielgen flankieren (2.6.2 Deletionsnachweis-Primer). Da die verwendete Austausch cassette *cat* 1014 bp groß ist, kann nach der Kolonie-PCR ein Größenvergleich der PCR-Produkte mit dem Wildtyp von pV163M erfolgen. So ist bei erfolgreicher Deletion eine Verkürzung bzw.

Verlängerung des PCR-Produkts im Vergleich zum PCR-Produkt des Wildtyp-Plasmids pV163M zu erwarten. Dies ist davon abhängig, ob das durch die Chloramphenicolkassette ersetzte Gen größer oder kleiner als 1014 bp ist. Der Größenunterschied entspricht demnach der Differenz von 1014 bp und der Anzahl der Basenpaare des deletierten Gens. Die PCR verläuft in 30 Zyklen mit entsprechendem Temperaturprofil (Tabelle 17).

3.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Größe des PCR-Produktes verifizieren zu können wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu werden 10 µL des PCR-Produktes mit 6 µL DNA-Auftragspuffer vermischt und auf ein 1%iges 1x-TBE-Agarosegel aufgetragen. Die 1-stündige Elektrophorese läuft bei den folgenden Parametern: 150 V, 250 mA, 100 W. Da die Nukleinsäuren negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode und werden somit aufgetrennt. Durch Ethidiumbromid, welches im Agarosegel enthalten ist, kann die DNA mittels UV-Licht-Bestrahlung sichtbar gemacht werden. Um die Größe der PCR-Produkte einschätzen zu können, vergleicht man die sichtbaren Banden mit denen des 1kb DNA Markers.

3.2.2.7 Validierung der Mutanten mittels Next Generation Sequencing (NGS)

Die in der Kolonie-PCR positiv getesteten Klone von *E. coli* MG1655 werden in einer ÜNK bei 37°C angezüchtet. Anschließend wird aus 1 mL ÜNK mithilfe des Genomic DNA Kit, Pure Link® Pro 96 nach Herstellerangaben genomische DNA isoliert. Danach wird eine Nextera XT library des Genoms (Illumina) mithilfe der NextSeq 500 Maschine in einem 2x150 bp- Lauf sequenziert. Die Roh-Daten werden mit dem Programm SPAdes⁷⁴ (integriert in der Pipeline ASA^{3P75}) zu sogenannten *contigs* assembliert.

Um die Deletionsmutanten validieren zu können, wird die *search page blastn* des NCBI verwendet (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Das Plasmid pV163M dient in dieser Arbeit als Referenz (*query*) und die Sequenz der jeweiligen Deletionsmutante als *subject*.

Das BLASTN-Ergebnis wird als *hit table* in Microsoft-Excel exportiert und die *contigs* nach der Anfangsposition im Referenz-Plasmid sortiert. Außerdem wird die Anzahl der *gaps* und *mismatches* überprüft. *Contigs* mit 0 *gaps* und 0 *mismatches* gelten dabei als fehlerfrei. Die

Deletionsmutante gilt als fehlerfrei, wenn die gesamte Sequenz bis auf den erwarteten Deletionsbereich von fehlerfreien *contigs* abgedeckt wird (Beispiel siehe Tabelle 18).

Tabelle 18 Vereinfachte Darstellung eines blast-Ergebnisses einer erfolgreichen Deletion am Beispiel der pV163M Δ cag12-Deletionsmutante. Grau schattiert sind Bereiche, die noch in der Mutante enthalten sind.

<i>Subject</i>	<i>Query</i>	Identität [%]	Länge [bp]	<i>gaps</i>	<i>Mis-matches</i>	Position Start pV163M	Position Ende pV163M	Position Anfang pV163M Δ cag12	Position Ende pV163M Δ cag12
pV163M	pV163M Δ cag12	100	17222	0	0	1	17222	32847	15449
Deletion <i>cag12</i> (Position 17223-17642)									
pV163M	pV163M Δ cag12	100	14432	0	0	17643	32074	14432	1
pV163M	pV163M Δ cag12	100	2066	0	0	31998	34063	37529	35464
pV163M	pV163M Δ cag12	100	2518	0	0	33985	36502	35365	32848

3.2.2.8 Plasmidisolation Maxiprep

Die verifizierten Plasmide werden unter Verwendung des Plasmid Maxi Kits von QIAGEN entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Die einzige Veränderung der Arbeitsschritte gegenüber den Herstellerangaben stellt das verwendete Volumen an Isopropanol während des Fällungsschrittes nach dem Durchfluss durch die Affinitätssäule dar. Hier werden 15 mL statt 10,5 mL Isopropanol vorgelegt. Alle weiteren Schritte entsprechen denen der Gebrauchsanweisung.

Die eingesetzte Menge an Bakterien richtet sich nach der Plasmidkopienzahl. Da es sich bei pV163M um ein *low copy* Plasmid handelt, werden 300 mL einer Übernachtskultur eingesetzt. Nach der Durchführung aller in der Gebrauchsanweisung beschriebenen Schritte wird das Plasmidpellet in 100 μ L ddH₂O resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt. Die Konzentration der DNA wird mithilfe des Spektralphotometers NanoDrop™ ermittelt.

3.2.2.9 Chemische Transformation des zirkulären Plasmids

Als Plasmid-Empfänger-Organismus wird in dieser Arbeit *E. coli* DH10 β verwendet. Deshalb werden die in *E. coli* MG1655 mutierten und anschließend über Plasmid-MaxiPrep isolierten Plasmide in *E. coli* DH10 β chemisch transformiert (3.1.4). Die eingesetzte Menge an Plasmid-DNA für die Transformation beträgt 100 ng.

3.3 Charakterisierungsmethoden

Die im Folgenden angewandten Charakterisierungsmethoden sollen die Auswirkung der Deletion verschiedener Gene des Plasmids pV163M in Hinblick auf mögliche Funktionen darlegen. Bis *dato* waren die meisten Gene von pV163M lediglich annotiert.

3.3.1 Wachstumskurven

Zur Erstellung der Wachstumskurven der erzeugten Deletionsmutanten von pV163M in *E. coli* DH10 β wird als Medium LB mit Kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bzw. Chloramphenicol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) verwendet, um zu verhindern, dass pV163M während der Kultivierung verlorengeht. Die Übernachtskulturen werden zunächst mit demselben LB-Medium (inklusive Antibiotikum) 1:50 verdünnt. Anschließend werden in eine 96 *well* Platte pro *well* 200 μL der verdünnten Probe als technisches Replikat vorgelegt. Das Wachstum wird über die Bestimmung der OD₆₀₀ im NanoQuant Infinite M200 Pro (Tecan) in zwanzigminütigen Intervallen über einen Zeitraum von 24 h gemessen und aus den Messwerten eine Wachstumskurve erzeugt.

3.3.2 Konjugation

Zur Bestimmung der Konjugationseffizienz von pV163M sowie dessen Mutanten wird neben *E. coli* DH10 β (Donor) der Stamm *E. coli* J53 (Rezeptor) eingesetzt. Da *E. coli* J53 eine Resistenz gegenüber Natriumazid (NAz) besitzt, wird nach erfolgreicher Konjugation eine Selektion auf LB-NAz/Km-Agarplatten (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NAz, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Km) vorgenommen. Zunächst werden J53 sowie DH10 β [pV163M] bzw. dessen Derivate in einer Übernachtskultur angezüchtet. Am nächsten Tag wird jeweils 1 mL der Übernachtskulturen bei 5000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 1 mL LB-Medium resuspendiert. Dieser Waschschriff zur Entfernung der für

die Anzucht eingesetzten Antibiotika wird zweimal wiederholt, bevor jeweils 100 µL der J53-Suspension mit 50 µL des jeweiligen Donor-Stammes in einem Mikroreaktionsgefäß vermischt und auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte mittig pipettiert werden. Der Konjugationsansatz trocknet anschließend 20 min bei Raumtemperatur und wird dann für 20 h bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung der eingesetzten Zellzahl werden die verwendeten Bakteriensuspensionen in einer Verdünnungsreihe (10⁻¹–10⁻⁸) in PBS verdünnt, die Verdünnungsstufen 10⁻⁷ und 10⁻⁸ auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am Folgetag werden die Kolonien gezählt und die *colony forming units (cfu)* bestimmt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die gesamte Zellmasse des Konjugationsansatzes mit einer sterilen Impföse abgeschabt und in 1 mL PBS resuspendiert. Um die Bakterien voneinander zu lösen wird jeder Ansatz anschließend für 1 min auf dem Vortex durchmischt. Nach der Herstellung einer Verdünnungsreihe (10⁻¹–10⁻⁷) in PBS werden die Verdünnungsstufen 10⁻⁶ und 10⁻⁷ auf LB-Agarplatten mit NAz (200µg/mL) und Km (50µg/mL) ausplattiert und für 48h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit können die *cfu* bestimmt werden. Die Konjugationseffizienz lässt sich mit folgender Formel bestimmen:

$$\text{Konjugationseffizienz} = \frac{\text{cfu [Transkonjugant]}}{\text{cfu [Donor]}}$$

Formel 1 Formel zur Berechnung der Konjugationseffizienz

3.3.3 Plasmidkopiezahl

Die Kopiezahl der Plasmide wurde aus der Ganzgenomsequenzierung der Mutanten (in MG1655) extrapoliert. Hierzu wurde zunächst die Abdeckung (*coverage*) des längsten Plasmidcontigs und diejenige des längsten Chromosomcontigs aus den Assembly-Daten ermittelt. Die Plasmidkopiezahl wurde dann über die folgende Formel definiert:

$$\text{Plasmidkopiezahl} = \frac{\text{Coverage Plasmidcontig}}{\text{Coverage Chromosomcontig}}$$

Formel 2 Formel zur Bestimmung der Plasmidkopiezahl

Die Plasmidkopiezahl der Mutanten wurde dann ins Verhältnis zur Kopiezahl des Wildtyps gestellt.

3.3.4 Bestimmung der Verdopplungsraten

Die Verdopplungsraten wurden mit dem Programm Growthrates v. 6.2 aus den Wachstumskurven berechnet. Hierfür wurde zunächst mittels Microsoft Excel aus den technischen Replikaten der Mittelwert der optischen Dichte (OD_{600}) für jeden einzelnen Zeitpunkt gebildet. Die Mittelwerte wurden in eine Standardtabelle eingetragen (siehe Abbildung 16) und als .txt-Datei gespeichert.

Min	A1	A2	A3	A4	A5
0	0.22333	0.21198	0.19916	0.23961	0.21335
60	0.25035	0.23955	0.24055	0.25445	0.24269
120	0.28881	0.27707	0.28791	0.29341	0.28023
180	0.37778	0.36795	0.38344	0.38401	0.36946
240	0.44812	0.43957	0.44972	0.45194	0.43867
300	0.50701	0.50209	0.50965	0.51294	0.50021
360	0.56194	0.56041	0.56872	0.56543	0.55398
420	0.61427	0.61441	0.63419	0.62671	0.6037
480	0.68185	0.68519	0.67006	0.67929	0.65722
540	0.71558	0.71741	0.70228	0.71202	0.69819
600	0.74789	0.74715	0.73384	0.74368	0.72497
660	0.77963	0.77861	0.76521	0.77465	0.75314
720	0.80897	0.80773	0.79525	0.80372	0.78123
780	0.83613	0.83431	0.82283	0.83183	0.80783
840	0.85932	0.85708	0.84595	0.85639	0.83331
900	0.87967	0.87624	0.86537	0.87751	0.85531
960	0.89701	0.89307	0.88328	0.89507	0.87391

Abbildung 16 Ausschnitt der verwendeten Standardtabelle

Mit dieser Tabelle wurde das Programm Growthrates ausgeführt. Das Ergebnis waren zwei Dateien, eine *results*- (Abbildung 17) und eine *summary*-Datei (Abbildung 18).

```

Well A1
5 points from 60.0 through 140.0 minutes were used to estimate the growth rate.
The growth rate ± s.e. is 0.02633 ± 0.000345 per minute or 1.5796 ± 0.02068 per hour .
This is equivalent to a doubling time of 26.3 ± 0.34 minutes.
The correlation coefficient R is 0.99974
The maximum OD is 0.68731.
The lag time is 59.8 minutes
*****

Well A2
5 points from 160.0 through 240.0 minutes were used to estimate the growth rate.
The growth rate ± s.e. is 0.00931 ± 0.001059 per minute or 0.5585 ± 0.06355 per hour .
This is equivalent to a doubling time of 74.5 ± 8.47 minutes.
The correlation coefficient R is 0.98113
The maximum OD is 0.69279.
The lag time is -53.1 minutes
*****

```

Abbildung 17 Ausschnitt aus einer *results*-Datei

Well	Growth Rate min	Growth Rate hours	R	Max OD	lag time (minutes)	
A1	0.02633	1.58	0.99974	0.68731	59.8	
A2	0.00931	0.559	0.98113	0.69279	-53.1	Warning! R is <0.99. GrowthRate may be unreliable!
A3	0.0077	0.462	0.98441	0.68538	-224.8	Warning! R is <0.99. GrowthRate may be unreliable!
A4	0.02195	1.317	0.99845	0.71176	82.7	
A5	0.03357	2.014	0.98781	0.70242	74.7	Warning! R is <0.99. GrowthRate may be unreliable!
A6	0.01653	0.992	0.999	0.6827	95.2	

Abbildung 18 Ausschnitt aus einer *summary*-Datei

Aus der *results*-Datei wurde die Verdopplungsrate (*doubling rate*) extrahiert. Die *summary*-Datei dient der Überprüfung der Ergebnisse. Ist der Korrelationskoeffizient (R) $< 0,99$, konnte das Programm die Verdopplungsraten nicht zuverlässig bestimmen. Aus diesem Grund wurden Ergebnisse mit $R < 0,99$ aus der Auswertung herausgenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung der pTOX-Mutagenese

Zur Etablierung der pTOX-Mutagenese-Methode wurde zunächst die Mutagenese des *lacZ*-Gens in *E. coli* MG1655 durchgeführt. Dazu wurden die flankierenden Sequenzen von *lacZ* mittels Restriktionsenzymen und anschließender Ligation in die MCS von pTOX integriert. Nach der Transformation in den Donor *E. coli* CC118 konnte das Plasmid schließlich durch Konjugation in den Zielorganismus *E. coli* MG1655 übertragen werden. *E. coli* CC118 wurde dabei als Donor gewählt, da sich pTOX-Plasmide nur in Stämmen replizieren können, die das Produkt des *pir*-Gens exprimieren. Die Aktivierung der pTOX-Toxine erfolgte schließlich durch Glucose-Entzug, sodass die identischen Sequenzen ausgetauscht und *lacZ* deletiert wurde. Das Resultat der Mutagenese des *lacZ*-Gens von *E. coli* MG1655 ist visuell durch die Blau-Weiß-Selektion möglich. Da durch das Entfernen von *lacZ* keine funktionale Beta-Galactosidase mehr gebildet wird, sind weiße Kolonien als positive Klone zu werten.

Bei dem Versuch, die pTOX-Mutagenese-Methode zu etablieren (sie wurde bis dato nicht im Institut für Medizinische Mikrobiologie an der JLU Gießen verwendet) gab es im Laufe des gesamten Ablaufes zahlreiche Schwierigkeiten.

Der erste Schritt in der pTOX-Mutagenese ist die Kombination des PCR-Produktes mit pTOX1. Bereits dieser Schritt, also die Generierung des pTOX1-Plasmides mit flankierenden Regionen des *lacZ*-Gens, war von enormen Schwierigkeiten begleitet. Es wurden mehrere Methoden zur Assemblierung angewandt (Ligation der beiden links/rechts-flankierender Regionen, Gibson-Assembly, Fusions-PCR), wobei allerdings keine dieser Methoden zur erfolgreichen Generierung von pTOX mit den flankierenden Regionen führte. Aus diesem Grund wurde daraufhin als *template* für die Generierung des *lacZ*-Deletions-templates die *lacZ*-Deletionsmutante aus der Keio *collection*⁷⁶ verwendet. Bei dieser Mutante ist über das Lambda-Red-Recombineering von Datsenko und Wanner⁵⁵ das *lacZ* mit einer Kanamycin-Resistenz-Kassette ersetzt worden. Unter Verwendung dieses *templates* konnte das pTOX1 mit *lacZ*-flankierenden Regionen generiert werden, allerdings erst nachdem über Klärung mit den Autoren der pTOX-Methode ermittelt wurde, dass das pTOX-*lacZ*-Konstrukt lediglich mittels Elektroporation in das *pir*-tragende *E. coli* transformiert werden konnte. Tatsächlich war eine chemische Transformation nicht erfolgreich. Nach der Generierung des pTOX1/*lacZ*-

Plasmides erfolgte die Konjugation in den Zielorganismus und darauffolgend die Gegenselektion und Screening der generierten Klone. Trotz intensiven Screenings konnten keine positiven Klone (= deletiertes *lacZ*) beobachtet werden. Aufgrund der gescheiterten Mutagenese von *lacZ* über die pTOX-Mutagenese-Methode wurde diese als ungeeignet erachtet und nach alternativen Möglichkeiten zur gezielten Deletion ausgewählter Gene von pV163M gesucht.

4.2 Etablierung der Lambda-Red-Rekombinase-Mutagenese mittels *lacZ*-Deletion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lambda-Red-Rekombinase-Mutagenese als neues Verfahren zur Herstellung von Plasmid-Deletionsmutanten in der Medizinischen Mikrobiologie Gießen etabliert. Um den Erfolg der Methode nachweisen zu können, wurde zunächst die Mutagenese des *lacZ*-Gens in *E. coli* MG1655 durchgeführt. Ziel dabei war es, das *lacZ*-Gen zu deletieren. Das *lacZ*-Gen, als Teil des *lac*-Operons, codiert in Bakterien wie *E. coli* für die β -Galactosidase, die es dem Bakterium ermöglicht, das Disaccharid Lactose in seine Bestandteile Glucose und Galactose zu hydrolysieren.⁷⁷ Dieser Vorgang und damit das Vorhandensein der β -Galactosidase lässt sich durch Zugabe von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) und IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) zum verwendeten Nährboden makroskopisch sichtbar machen, da die β -Galactosidase ebenso den gelben Farbstoff X-Gal in den blauen Indigo-Farbstoff (5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo) und Galaktose spalten kann.⁷⁸ Das Galaktose-Derivat IPTG dient dabei als Induktor des Promotors, indem es an das *lac*-Repressorprotein (LacI) bindet und die Transkription des *lac*-Operons eingeleitet wird. Da es vom Bakterium nicht fermentiert werden kann, bleibt dessen Konzentration in der Zelle relativ konstant, sodass eine kontinuierliche Expression des *lacZ*-Gens stattfindet.⁷⁹ Das Resultat der Mutagenese mithilfe der Lambda-Red-Rekombinase-Methode ist in diesem Beispiel demnach visuell durch Detektion von blauen oder weißen Kolonien auf LB-Agarplatten mit IPTG und X-Gal möglich. Dabei sind weiße Kolonien als positive Klone zu werten, da in diesem Fall durch das Entfernen des *lacZ*-Gens keine funktionale β -Galactosidase mehr gebildet wird. Somit kann durch die fehlende Spaltung von X-Gal kein blauer Farbstoff entstehen. In Abbildung 19 ist das Ergebnis der *lacZ*-Mutagenese von *E. coli* MG1655 dargestellt.

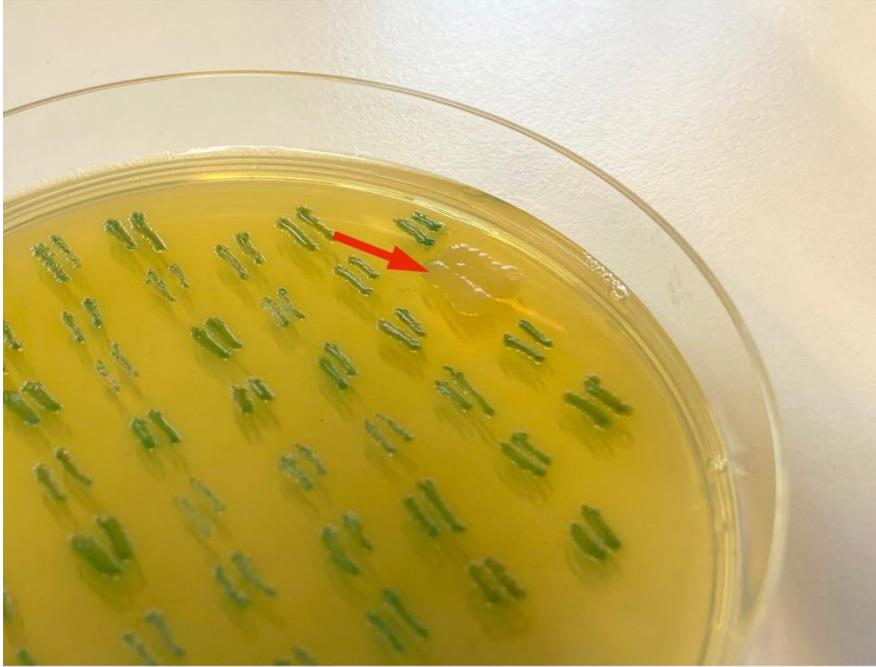


Abbildung 19 Blau-Weiß-Selektion nach Deletion des *lacZ*-Gens. Der rote Pfeil markiert einen positiven Klon.

Die Mutagenese war erfolgreich, wie man anhand der weiß gefärbten Kolonie erkennen kann. Somit wurde die Lambda-Red-Mutagenese Methode erfolgreich etabliert. Die Effizienz lag bei 1/50.

4.3 Ergebnisse der Lambda-Red-Rekombinase-Mutagenese von pV163M

Nachfolgend ist die Anzahl der pro Transformation erhaltenen Klone aufgeführt, die mittels der Lambda-Red-Rekombinase-Mutagenese erzeugt wurden. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 28 Deletionsmutanten hergestellt (Tabelle 19). Über die Effizienz kann nur bedingt eine Aussage gemacht werden, da nicht für jede Mutante die gleiche Anzahl an Klonen sequenziert wurden.

Tabelle 19 Ergebnisse der Lambda-Red-basierten Mutagenese von pV163M

Mutante	Gesamtzahl der Klone	Anzahl sequenzierter Klone mit korrekter Deletion (Anzahl positiver/Anzahl sequenzierter)
<i>Δhp20</i>	11	3/3
<i>Δhp29</i>	1	1/3
<i>Δhp30</i>	2	1/3
<i>Δhp36</i>	6	3/3
<i>Δhp38</i>	3	3/3
<i>Δhp45</i>	2	1/3
<i>Δhp49</i>	1	1/3
<i>Δhp52</i>	5	3/3
<i>Δpilx2</i>	2	1/3
<i>Δpilx3-4</i>	2	2/3
<i>Δpilx5</i>	1	1/3
<i>Δpilx6</i>	5	3/3
<i>Δpilx7</i>	1	1/3
<i>Δpilx8</i>	2	2/3
<i>Δpilx9</i>	4	3/3
<i>Δpilx10</i>	13	3/3
<i>Δpilx11</i>	12	3/3
<i>ΔhicA</i>	4	3/3
<i>ΔhicA/B</i>	2	2/3
<i>ΔtaxA</i>	2	2/3
<i>ΔtaxB</i>	2	2/3
<i>Δcag12</i>	3	2/3
<i>Δeex</i>	3	1/3
<i>ΔSM</i>	7	2/3
<i>ΔdnaJ</i>	2	2/3
<i>ΔtrbM</i>	4	3/3
<i>ΔparA</i>	4	3/3
<i>ΔIS_26</i>	2	2/3

Bei acht Genen (*Δpilx1*, *ΔtaxC*, *Δhp43*, *Δhp44*, *Δhp46*, *Δhp47*, *Δhp48*, *Δhp51*) wurde die Mutagenese mehrfach wiederholt, es wurden aber keine Mutanten erhalten.

4.4 Konjugationseffizienzen von pV163M und Deletionsmutanten

Um die Konjugationseffizienz von pV163M und den verschiedenen Deletionsmutanten zu ermitteln, wird die Konjugation, wie in 3.3.2 beschrieben, durchgeführt. Die einzelnen Konjugationseffizienzen ergeben sich dabei aus dem Quotienten aus Transkonjugant und Donor. Zur Berechnung der relativen Konjugationseffizienzen werden die Effizienzen der Deletionsmutanten durch die der in jedem Lauf mitbestimmten Effizienz des Wildtyps pV163M dividiert. Dadurch wird eine Objektivierbarkeit erreicht, die für den Vergleich der Konjugationseffizienzen der verschiedenen Mutanten unerlässlich ist. Um nachvollziehen zu können, ob die relative Konjugationseffizienz der Deletionsmutanten verglichen mit der durchschnittlichen Konjugationseffizienz des Wildtyp pV163M höher oder niedriger ist, wird die durchschnittliche Effizienz von pV163M auf den Ausgangswert 1,0 gesetzt. Ist die relative Konjugationseffizienz im Vergleich zu pV163M höher, ist die relative Effizienz der Deletionsmutante größer als 1. Bei einem Wert unter 1 ist die Konjugationseffizienz verglichen mit pV163M verringert. Detaillierte Ergebnisse der Bestimmung der relativen Konjugationseffizienz der verschiedenen Deletionsmutanten sind in den Abbildungen 20 und 21 dargestellt.

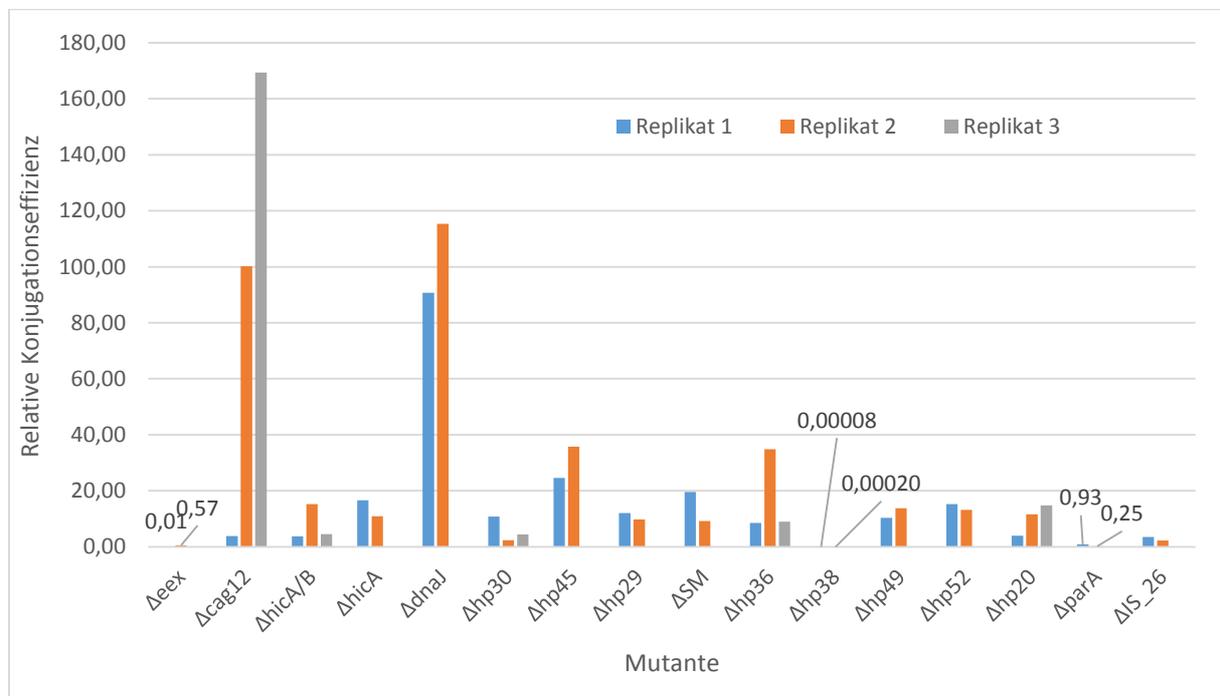


Abbildung 20 Relative Konjugationseffizienzen verschiedener Mutanten im Vergleich zu pV163M.

Für eine bessere Vergleichbarkeit sind die Deletionen der Gene, die an der Konjugationsmaschinerie beteiligt sind, gesondert aufgeführt (Abbildung 21). Hier wurde eine logarithmische Skala eingesetzt.

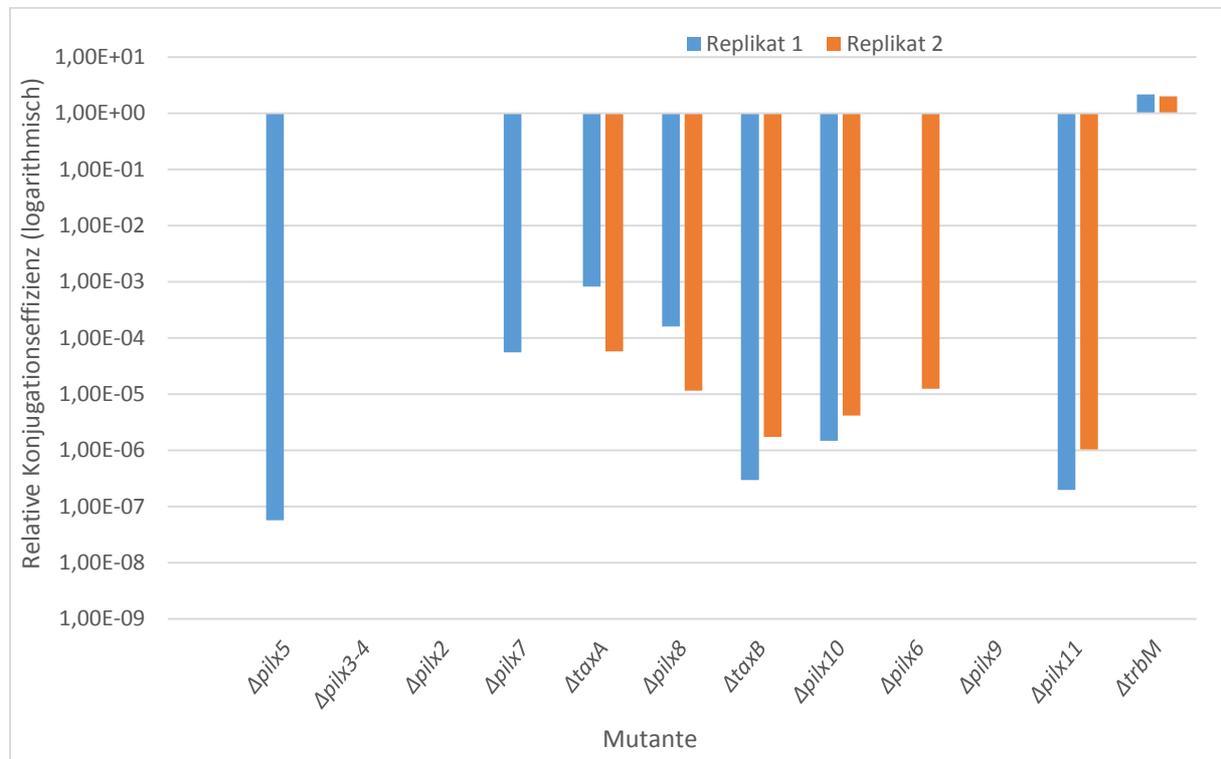


Abbildung 21 Relative Konjugationseffizienzen der Mutanten der deletierten Konjugationsmaschinerie-Gene im Vergleich zu pV163M. Die Mutanten $\Delta pilx3-4$, $\Delta pilx2$ und $\Delta pilx9$ weisen in beiden Replikaten eine relative Konjugationseffizienz von 0 auf, die auf der logarithmischen Skala nicht dargestellt werden kann. $\Delta pilx5$, $\Delta pilx7$ und $\Delta pilx6$ weisen in einem der beiden Replikate eine Konjugationseffizienz von 0 auf.

Generell ist eine Erhöhung der Konjugationseffizienz für die Deletionsmutanten $\Delta cag12$, $\Delta hicA/B$, $\Delta hicA$, $\Delta dnaJ$, $\Delta hp30$, $\Delta hp45$, $\Delta hp29$, ΔSM , $\Delta hp36$, $\Delta hp49$, $\Delta hp52$, $\Delta hp20$ und ΔIS_{26} und $\Delta trbM$ zu erkennen. Die Konjugationseffizienz der Deletionsmutanten Δeex , $\Delta pilx5$, $\Delta pilx3-4$, $\Delta pilx2$, $\Delta pilx7$, $\Delta taxA$, $\Delta hp38$, $\Delta pilx8$, $\Delta taxB$, $\Delta pilx10$, $\Delta pilx6$, $\Delta pilx9$, $\Delta pilx11$ und $\Delta para$ ist hingegen reduziert. Die höchsten relativen Konjugationseffizienzen weisen die Mutanten $\Delta cag12$ und $\Delta dnaJ$ auf. $\Delta cag12$ erreicht in Replik 3 eine fast 170-fach höhere Konjugationseffizienz als der Wildtyp. Den zweithöchsten Wert erzielt $\Delta dnaJ$ in Replik 2 mit einer relativen Konjugationseffizienz von 114. Unter den Mutanten, bei denen Gene der Konjugationsmaschinerie deletiert wurden, findet sich nur eine Mutante, $\Delta trbM$, die eine höhere relative Konjugationseffizienz als der Wildtyp aufweist. Mit Werten von 2,16 in Replik 1 und 1,98 in Replik 2 ist die Konjugationseffizienz allerdings nur geringfügig erhöht. Die restlichen Deletionsmutanten der Konjugationsmaschinerie-Gene weisen Werte weit

unter 1,0 (Abbildung 21, Tabelle 23) und somit eine geringere Konjugationseffizienz als der Wildtyp auf. Besonders stechen hier die Mutanten $\Delta pilx3-4$, $\Delta pilx2$ und $\Delta pilx9$ heraus, die eine Konjugationseffizienz von 0 aufweisen. Diese mutierten Plasmide können somit nicht mehr über Konjugation weitergegeben werden.

4.5 Wachstumskurven von pV163M und Deletionsmutanten

Die nachfolgenden Wachstumskurven von *E. coli* DH10 β pV163M sowie der Deletionsmutanten wurden mittels photometrischer Bestimmung der OD₆₀₀ über einen Zeitraum von 24 h bei 37°C erstellt. Dazu wird der Versuch, wie in 3.3.1 beschrieben, durchgeführt. Bis auf fünf Deletionsmutanten weisen alle Stämme ein vergleichbares Wachstum wie der Wildtyp von *E. coli* DH10 β pV163M auf. Eine Sonderstellung nehmen die Deletionsmutanten $\Delta hp29$ und $\Delta hp30$ ein. In Abbildung 22 sind für $\Delta hp29$ und $\Delta hp30$ deutlich veränderte Phänotypen erkennbar.

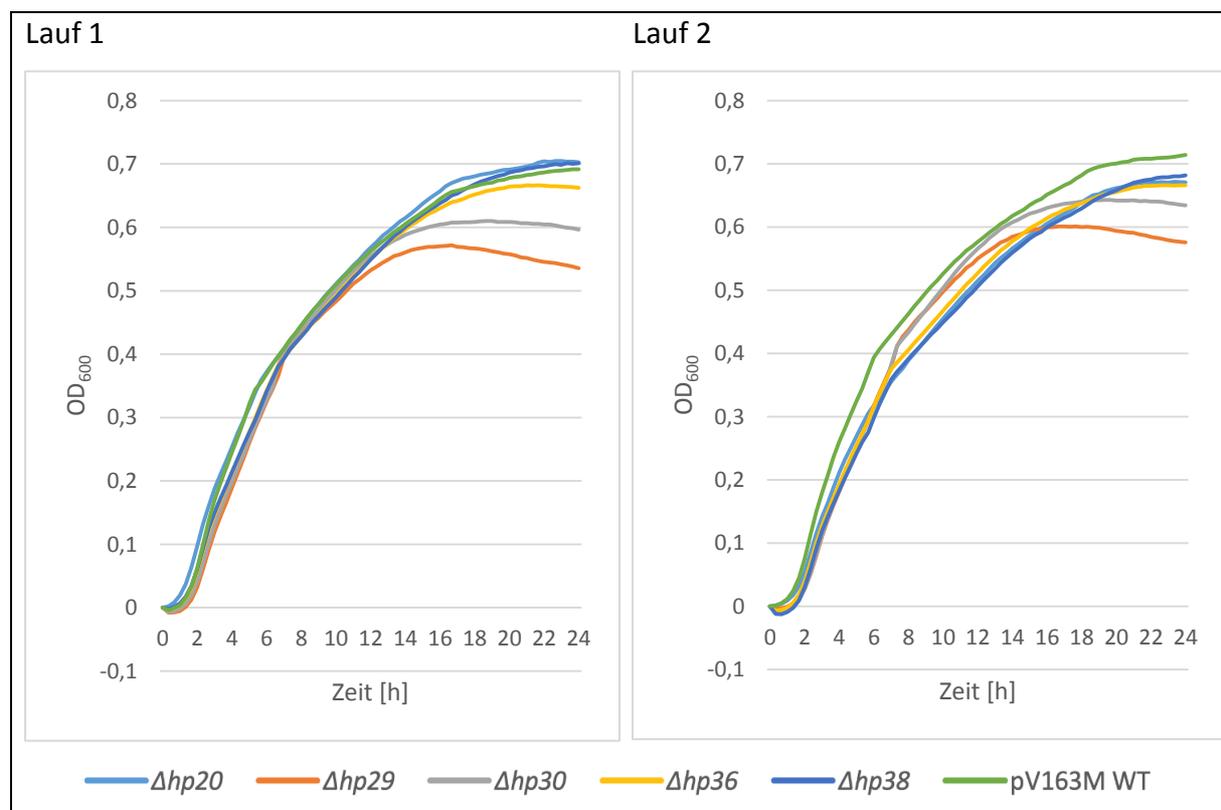


Abbildung 22 Wachstumskurven von *E. coli* DH10 β pV163M Wildtyp (WT) sowie der Deletionsmutanten $\Delta hp20$, $\Delta hp29$, $\Delta hp30$, $\Delta hp36$ und $\Delta hp38$

So erreicht $\Delta hp30$ im ersten Lauf im Vergleich zu den anderen Stämmen deutlich eher seine stationäre Phase. Das Maximum erreicht die Mutante dabei bei einer OD_{600} von 0,61. Die Deletionsmutante $\Delta hp29$ weist sogar in beiden Läufen ein erheblich geringeres Wachstum auf. Sie erreicht die stationäre Phase schneller als alle anderen Stämme und zeigt als Maximum eine OD_{600} von 0,57 in Lauf 1 und 0,6 in Lauf 2. Die finale OD_{600} der Stämme $\Delta hp29$ und $\Delta hp30$ ist ebenso niedriger als die der anderen getesteten Stämme, obwohl aus den photometrischen Messdaten hervorgeht, dass die Start- OD_{600} -Werte vergleichbar sind. So liegt der finale OD_{600} -Wert von $\Delta hp29$ im ersten Lauf bei 0,54 und für $\Delta hp30$ bei 0,6. Im zweiten Lauf liegt der Wert für $\Delta hp29$ bei 0,58. Die Mutante $\Delta hp30$ erreicht im zweiten Lauf eine mit den anderen Stämmen vergleichbare OD_{600} von 0,63. Ein ebenfalls leicht verringertes Wachstum zeigen die Deletionsmutanten $\Delta hp49$, $\Delta pilx6$ und $\Delta pilx9$ (Abbildung 23 und Abbildung 24).

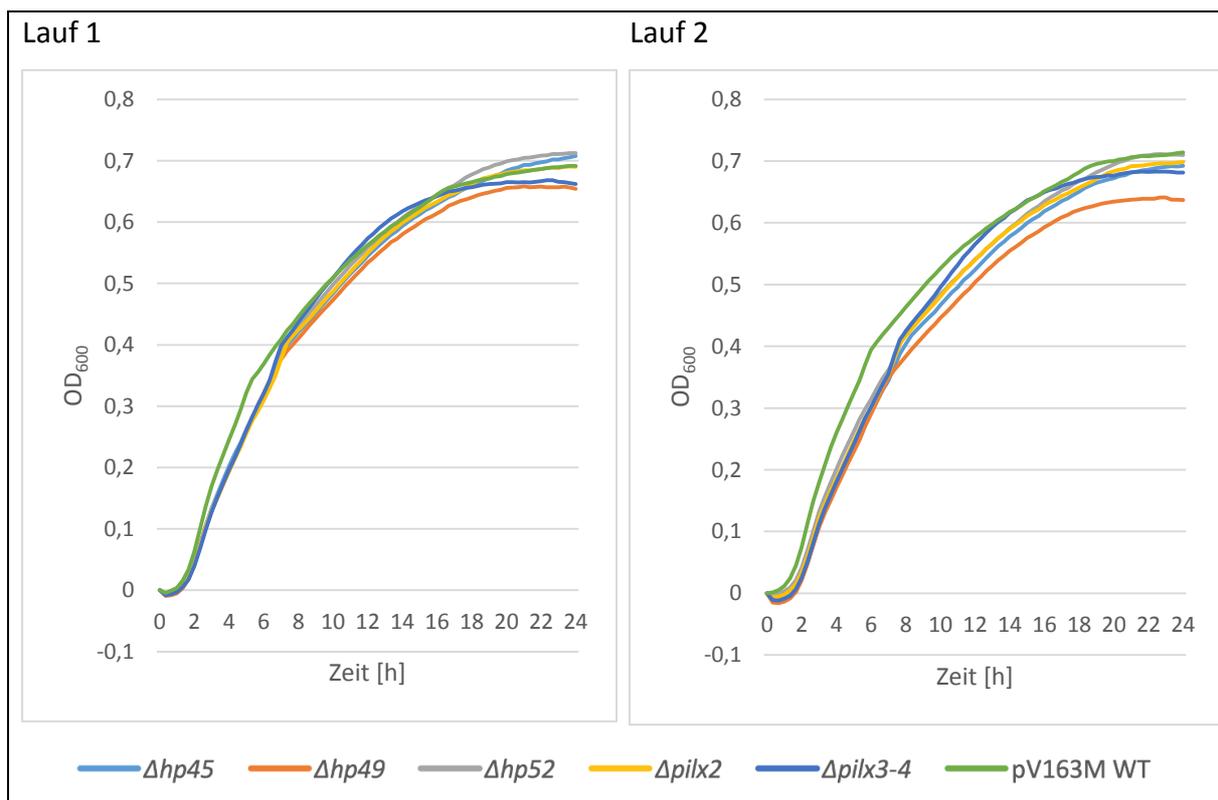


Abbildung 23 Wachstumskurven von *E. coli* DH10β pV163M Wildtyp (WT) sowie der Deletionsmutanten $\Delta hp45$, $\Delta hp49$, $\Delta hp52$, $\Delta pilx2$ und $\Delta pilx3-4$

Das veränderte Wachstumsverhalten wird besonders in Lauf 2 deutlich. Die Mutante $\Delta hp49$ erreicht dabei in ihrer stationären Phase eine maximale OD_{600} von 0,64 (Abbildung 23).

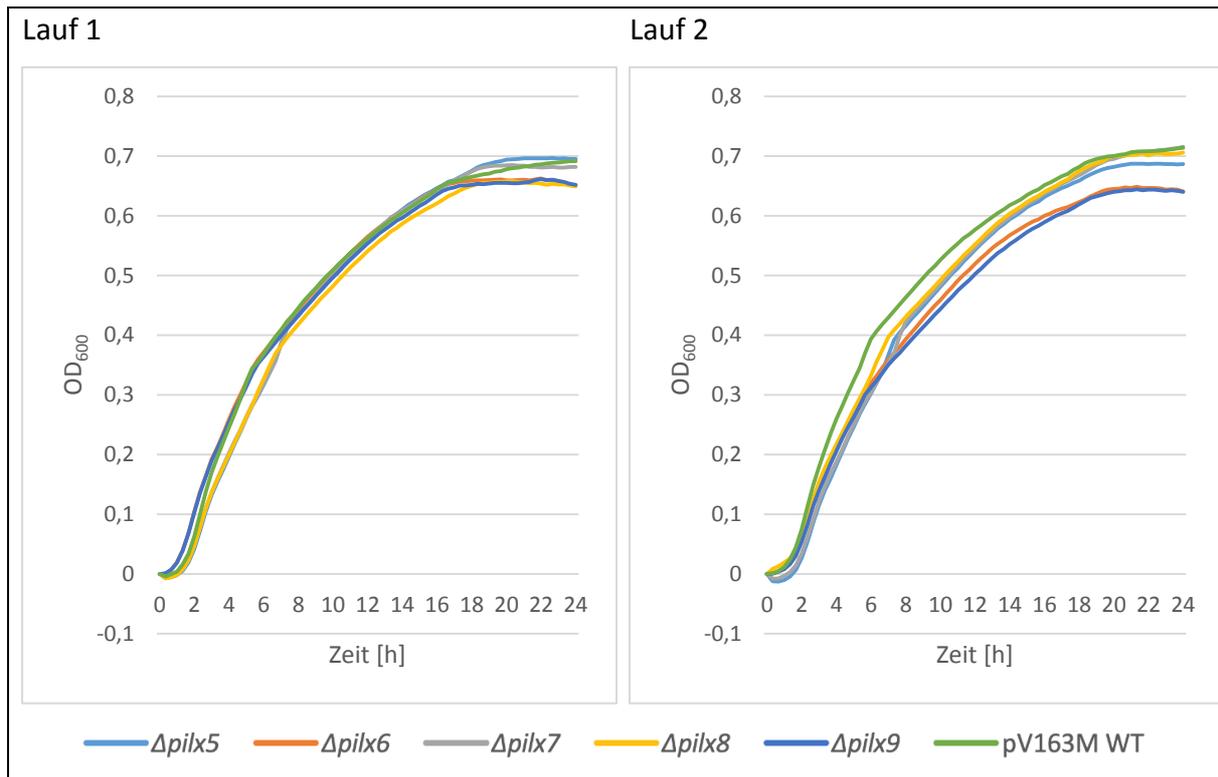


Abbildung 24 Wachstumskurven von *E. coli* DH10 β pV163M Wildtyp (WT) sowie der Deletionsmutanten $\Delta pilx5$, $\Delta pilx6$, $\Delta pilx7$, $\Delta pilx8$ und $\Delta pilx9$

Ein ähnliches Ergebnis erzielen $\Delta pilx6$ und $\Delta pilx9$, die ihre stationären Phasen beide deutlich früher als der Wildtyp von *E. coli* DH10 β pV163M erreichen. Die finalen OD₆₀₀-Werte liegen auch hier in Lauf 2 jeweils bei 0,64 (Abbildung 24).

Insgesamt weisen im Vergleich zum Wildtyp demnach zwei Deletionsmutanten ($\Delta hp29$ und $\Delta hp30$) ein signifikant verringertes und drei Deletionsmutanten ($\Delta hp49$, $\Delta pilx6$ und $\Delta pilx9$) ein leicht verringertes Wachstum auf. Die restlichen Deletionsmutanten zeigen ein nahezu unverändertes Wachstumsverhalten (Abbildungen 31-33, siehe Anhang).

4.6 Plasmidkopiezahlen von pV163M und Deletionsmutanten

Die Plasmidkopiezahlen der einzelnen Deletionsmutanten wurden wie in 3.3.3 ermittelt und anschließend zur besseren Vergleichbarkeit mit der durchschnittlichen Plasmidkopiezahl des pV163M Wildtyps in Verhältnis gesetzt. In Abbildung 25 sind detaillierte Ergebnisse der Bestimmung der Plasmidkopiezahlen dargestellt.

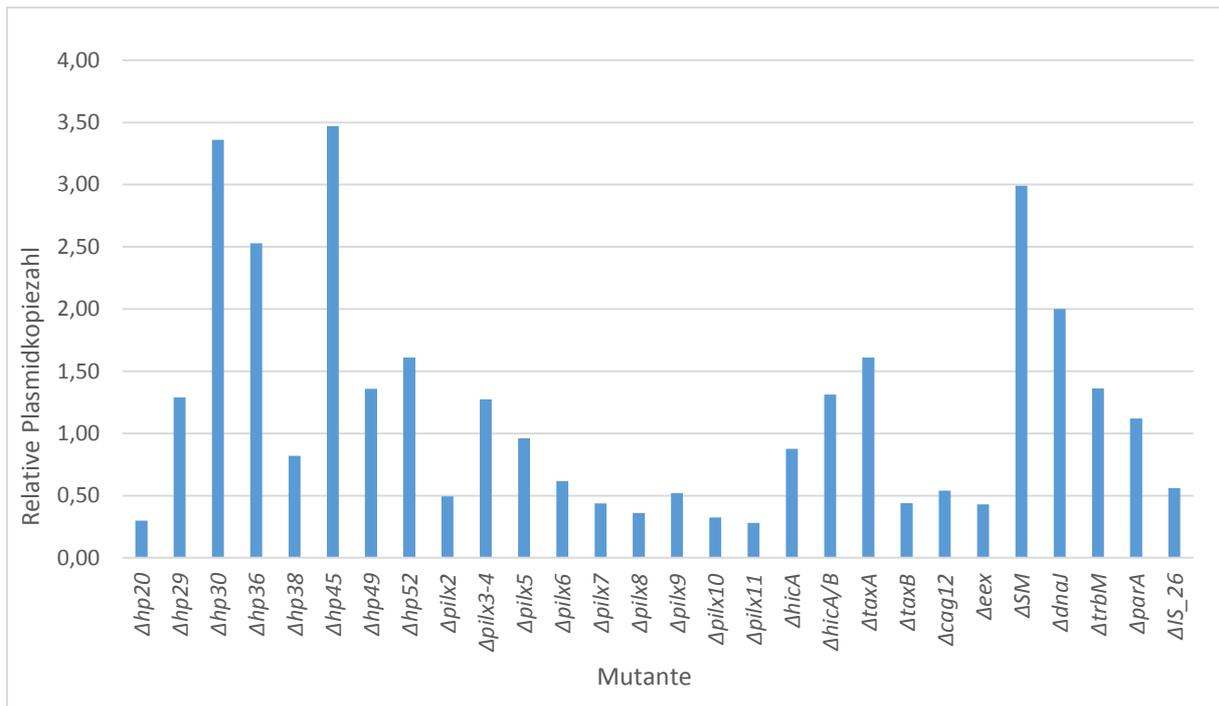


Abbildung 25 Plasmidkopiezahlen verschiedener Mutanten im Vergleich zu pV163M

Die Deletionsmutanten $\Delta hp29$, $\Delta hp30$, $\Delta hp36$, $\Delta hp45$, $\Delta hp49$, $\Delta hp52$, $\Delta pilx3-4$, $\Delta hicA/B$, $\Delta taxA$, ΔSM , $\Delta dnaJ$, $\Delta trbM$ und $\Delta parA$ weisen höhere Plasmidkopiezahlen als der pV163M Wildtyp auf. Die Deletionsmutanten $\Delta hp20$, $\Delta hp38$, $\Delta pilx2$, $\Delta pilx5$, $\Delta pilx6$, $\Delta pilx7$, $\Delta pilx8$, $\Delta pilx9$, $\Delta pilx10$, $\Delta pilx11$, $\Delta hicA$, $\Delta taxB$, $\Delta cag12$, Δeex und ΔIS_{26} besitzen durchschnittlich weniger Plasmidkopien als der Wildtyp. Die höchsten Plasmidkopiezahlen erreichen $\Delta hp30$, $\Delta hp36$, $\Delta hp45$ und ΔSM , wobei $\Delta hp30$ und $\Delta hp45$ durchschnittlich vier Plasmide mehr als der Wildtyp aufweisen.

4.7 Verdopplungsraten von pV163M und Deletionsmutanten

Die Verdopplungsraten wurden für 23/28 Mutanten bestimmt. Sie sind in Tabelle 20 und 21 aufgeführt. Bei vier Mutanten waren die Daten aufgrund der zu geringen Korrelationskoeffizienten nicht auswertbar. Weitere drei Mutanten wiesen in den zwei durchgeführten Durchläufen einen gegenläufigen Trend auf.

Bei den anderen 16 Mutanten wies lediglich eine Mutante eine identische Verdopplungsrate auf wie der WT ($hp36$). Alle anderen Mutanten wiesen eine geringere Verdopplungsrate als der Wildtyp auf.

Tabelle 20 Verdopplungsraten Versuch A. Grau schattiert markiert sind solche Mutanten, bei denen kein klarer Trend gefunden wurde.

	Lauf 1			Lauf 2			Übereinstimmung Replikat 1/2	Interpretation
	Verdopplungsrate [min]	R	Trend 1	Verdopplungsrate [min]	R	Trend 2		
WT	24,2 ± 0,93	0,99707	WT	21,1 ± 1,14	0,99565	ND	ND	Nicht zutreffend
<i>Δcag12</i>	38,5 ± 1,05	0,99852	>WT	26,3 ± 0,34	0,99974	>WT	ja	>WT
<i>ΔdnaJ</i>	37,8 ± 0,9	0,99887	>WT	25,3 ± 0,29	0,99981	>WT	ja	>WT
<i>Δeex</i>	42,6 ± 1,12	0,99897	>WT	31,6 ± 0,88	0,99845	>WT	ja	>WT
<i>ΔhicA</i>	58,7 ± 1,68	0,99836	>WT	42,4 ± 1,37	0,9979	>WT	ja	>WT
<i>ΔhicA/B</i>	45,4 ± 1,09	0,99913	>WT	23,7 ± 0,62	0,99898	>WT	ja	>WT
<i>Δhp29</i>	37,8 ± 1,04	0,99887	>WT	21,5 ± 1,55	0,99231	= WT	nein	kein klarer Trend
<i>Δhp30</i>	47,4 ± 0,95	0,9994	>WT	24,8 ± 1,7	0,99308	>WT	ja	>WT
<i>Δhp36</i>	23,9 ± 1,43	0,99471	= WT	21,2 ± 1,31	0,99433	= WT	ja	identisch wie WT
<i>Δhp38</i>	21,8 ± 1,71	0,99095	= WT	24,7 ± 0,61	0,99909	>WT	nein	kein klarer Trend
<i>Δhp45</i>	41,8 ± 1,33	0,99848	>WT	36,7 ± 0,95	0,99901	>WT	ja	>WT
<i>Δhp49</i>	42,0 ± 1,08	0,99869	>WT	41,9 ± 1,08	0,999	>WT	ja	>WT
<i>Δhp52</i>	43,7 ± 1,25	0,99878	>WT	25,5 ± 0,39	0,99953	>WT	ja	>WT
<i>Δpilx2</i>	48,4 ± 1,25	0,999	>WT	23,7 ± 1,82	0,99127	= WT	nein	kein klarer Trend
<i>Δpilx3-4</i>	59,3 ± 1,97	0,9978	>WT	40,0 ± 0,83	0,99936	>WT	ja	>WT
<i>Δpilx5</i>	42,1 ± 1,16	0,99887	>WT	29,8 ± 0,81	0,99851	>WT	ja	>WT
<i>Δpilx7</i>	46,3 ± 1,18	0,99903	>WT	28,0 ± 0,37	0,99974	>WT	ja	>WT
<i>Δpilx8</i>	27,8 ± 1,02	0,99798	>WT	90,0 ± 9,28	0,98441	nicht auswertbar (R<0,99)	nur eine Kurve	kein klarer Trend
<i>ΔSM</i>	42,3 ± 1,13	0,99892	>WT	20,6 ± 1,88	0,98781	nicht auswertbar (R<0,99)	nur eine Kurve	kein klarer Trend
<i>ΔtaxA</i>	30,2 ± 0,71	0,99918	>WT	74,5 ± 8,47	0,98113	nicht auswertbar (R<0,99)	nur eine Kurve	kein klarer Trend
<i>ΔtaxB</i>	52,6 ± 1,46	0,99885	>WT	45,7 ± 1,31	0,99836	>WT	ja	>WT

Tabelle 21 Verdopplungsraten Versuch B. Grau schattiert markiert sind solche Mutanten, bei denen kein klarer Trend beobachtet wurde.

	Lauf 1			Lauf 2				
	Ver- dopplungs- rate [min]	R	Trend 1	Ver- dopplungs- rate [min]	R	Trend 2	Überein- stimmung Replikat 1/2	Inter- pretation
WT	37.4 ± 0.91	0.99881	ND	28.2 ± 0.8	0.99879	ND	ND	WT
ΔIS_{26}	61.9 ± 0.66	0.99983	>WT	53.2 ± 1.48	0.99885	>WT	ja	>WT
$\Delta parA$	38.4 ± 1.17	0.99816	=WT	24.8 ± 2.56	0.98439	nicht auswertbar (R<0,99)	nur eine Kurve	kein klarer Trend
$\Delta trbM$	43.8 ± 1.21	0.99885	>WT	35.3 ± 1.12	0.99849	>WT	ja	>WT

5. Diskussion

5.1 Etablierung Lambda-Red-Mutagenese

Um den Erfolg der Lambda-Red-Mutagenese nachweisen zu können, wurde im Laufe dieser Arbeit zunächst die Mutagenese des *lacZ*-Gens in *E. coli* MG1655 durchgeführt. Die erfolgreiche Deletion des *lacZ*-Gens ließ sich dabei wie in 4.2 beschrieben visuell durch Bestimmung von blauen oder weißen Kolonien auf LB-Agarplatten mit IPTG und X-Gal nachweisen. Zwar sprachen die Ergebnisse für eine erfolgreiche Deletion des *lacZ*-Gens auf der chromosomalen DNA, über die Anwendung der Mutagenese auf Plasmide konnte allerdings noch keine Aussage getroffen werden. Die Veränderung der mobilen DNA mittels Lambda-Red-Mutagenese war anschließend der nächste Schritt und konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt werden. Bei der Erzeugung der verschiedenen Deletionsmutanten ergaben sich deutliche Unterschiede bezüglich der Effizienz der Mutagenese. Konnten nach drei unabhängigen Versuchen immer noch keine Mutanten generiert werden, wurde die Mutagenese als nicht erfolgreich gewertet. Von den insgesamt 36 mittels Lambda-Red-Mutagenese deletierten Genen ließen sich 28 Deletionsmutanten erfolgreich herstellen (Abbildung 26).

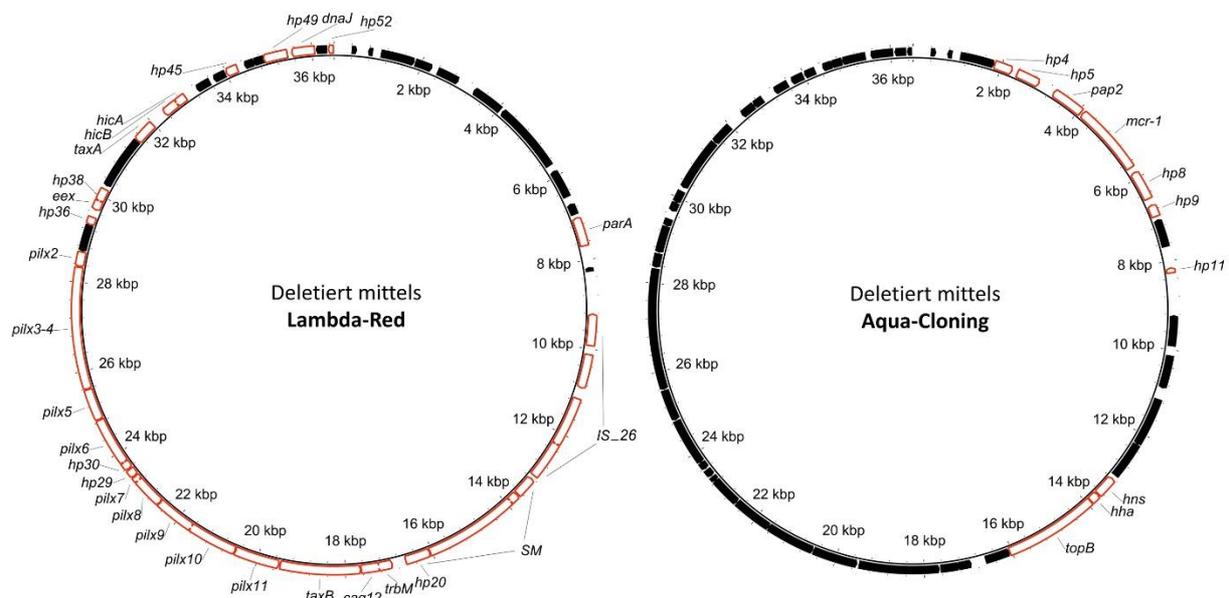


Abbildung 26 Plasmidkarten von pV163M. Links: Die rot umrandeten Gene wurden erfolgreich mit der Lambda-Red-Methode deletiert. Rechts: Im Vergleich dazu die mit der Aqua-Cloning-Methode deletierten Gene (Die Herstellung von Deletionsmutanten mittels Aqua-Cloning war nicht Teil dieser Arbeit⁴⁴)

Bei den 8 fehlgeschlagenen Mutagenesen handelte es sich um die Deletionen der Gene *pilx1*, *taxC*, *hp43*, *hp44*, *hp46*, *hp47*, *hp48* und *hp51*. Die Tatsache einer gescheiterten Mutagenese lässt darauf schließen, dass das deletierte Gen essentiell für die Erhaltung des Plasmides in der Zelle ist. So ist das betreffende Gen möglicherweise Bestandteil des Replikationsursprungs (*hp43*, *hp44*, *hp46*, *hp47*, *hp48*, *hp51*). Bemerkenswert ist, dass ein Entfernen des Plasmid-Partitionssystems (*parA*) nicht zu einem Fehlschlagen der Mutagenese geführt hat. Das Plasmid-Partitionssystem dient dem Bakterium dazu, die Plasmide bei der Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen zu verteilen.⁸⁰

Mutanten zweier Gene (*pilx1*, *taxC*), die zur Konjugationsmaschinerie gehören, konnten nicht generiert werden. Dies entspricht nicht den Erwartungen, da diese Gene nur eine Rolle für die Konjugation, aber nicht für die Erhaltung des Plasmides in der Zelle spielen.

Insgesamt kann die Lambda-Red-Mutagenese hinsichtlich der Deletion einzelner Gene des Plasmids pV163M als erfolgreich gewertet und deshalb etabliert werden.

Die Methode bietet zudem den Vorteil, dass mittels einfacher Kolonie-PCR am Folgetag innerhalb weniger Stunden ein erster Hinweis auf eine erfolgreiche Deletion vorliegt, da lediglich ein Größenvergleich der PCR-Produkte mit dem Wildtyp erfolgen muss. Ein Nachteil kann sich allerdings ergeben, wenn das zu untersuchende Plasmid sehr viele verschiedene Resistenzkassetten trägt, da sich dann Schwierigkeiten bezüglich der Selektion auf einem geeigneten Nährboden ergeben. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass keine natürliche Resistenz gegenüber Chloramphenicol vorliegt, da im Zuge der Lambda-Red-Mutagenese das deletierte Gen durch eine Chloramphenicol-Kassette ausgetauscht wird. Die vorhandenen Resistenzen bei pV163M gegenüber Kanamycin und Colistin stellten in den Versuchen kein Problem dar und wurden den verwendeten Nährmedien zugesetzt, um ein Verbleib des Plasmids im Bakterium zu gewährleisten. Die Tatsache, dass jede Mutante nach der Mutagenese eine Chloramphenicol-Resistenz besitzt, muss bei den weiteren Experimenten zur Charakterisierung berücksichtigt werden. Inwieweit die neu entstandene Resistenz die Eigenschaften des Bakteriums verändert ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt.

Ein Manko der Lambda-Red-Mutagenese ist der hohe Arbeitsaufwand. Dieser kommt zum einen durch die zwei Transformationen zustande, für die jeweils kompetente Zellen hergestellt werden müssen, zum anderen aber auch durch die zur Kontrolle notwendigen PCRs.

5.2 Charakterisierung der Mutanten

5.2.1 Tabellarische Übersicht der Assay-Ergebnisse

Die Resultate der durchgeführten Tests zur Phänotyp-Bestimmung der einzelnen Deletionsmutanten hinsichtlich Wachstumsverhalten, Konjugation, Plasmidkopiezahl und Verdopplungsrate sind in Tabelle 22 zu sehen und werden in Relation zu dem Wildtypplasmid pV163M als unverändert (–), erhöht (▲), stark erhöht (▲▲), verringert (▼) oder stark verringert (▼▼) dargestellt.

Tabelle 22 Zusammenfassung der Ergebnisse zu Wachstum, Konjugation, Plasmidkopiezahl und Verdopplungsrate der Deletionsmutanten von pV163M. unverändert (–), erhöht (▲), stark erhöht (▲▲), verringert (▼) oder stark verringert (▼▼) NB, nicht bestimmt, NI, nicht interpretierbar;

Mutante	Wachstum	Konjugation	Plasmidkopiezahl	Verdopplungsrate
<i>Δhp20</i>	–	▲	▼	NB
<i>Δhp29</i>	▼▼	▲	▲	NI
<i>Δhp30</i>	▼▼	▲	▲▲	▼
<i>Δhp36</i>	–	▲	▲▲	–
<i>Δhp38</i>	–	▼	▼	NI
<i>Δhp45</i>	–	▲	▲▲	▼
<i>Δhp49</i>	▼	▲	▲	▼
<i>Δhp52</i>	–	▲	▲	▼
<i>Δpilx2</i>	–	▼	▼	NI
<i>Δpilx3-4</i>	–	▼	▲	▼
<i>Δpilx5</i>	–	▼	▼	▼
<i>Δpilx6</i>	▼	▼	▼	NB
<i>Δpilx7</i>	–	▼	▼	▼
<i>Δpilx8</i>	–	▼	▼	NI
<i>Δpilx9</i>	▼	▼	▼	NB
<i>Δpilx10</i>	–	▼	▼	NB

Mutante	Wachstum	Konjugation	Plasmidkopiezahl	Verdopplungsrate
<i>Δpilx11</i>	–	▼	▼	NB
<i>ΔhicA</i>	–	▲	▼	▼
<i>ΔhicA/B</i>	–	▲	▲	▼
<i>ΔtaxA</i>	–	▼	▲	NI
<i>ΔtaxB</i>	–	▼	▼	▼
<i>Δcag12</i>	–	▲▲	▼	▼
<i>Δeex</i>	–	▼	▼	▼
<i>ΔSM</i>	–	▲	▲▲	NI
<i>ΔdnaJ</i>	–	▲▲	▲	▼
<i>ΔtrbM</i>	–	▲	▲	▼
<i>Δpara</i>	–	▼	▲	NI
<i>ΔIS_26</i>	–	▲	▼	▼

5.2.2 Wachstumsverhalten

Die meisten Bakterienspezies vermehren sich durch binäre Zellteilung. Als bakterielles Zellwachstum wird die damit verbundene Zunahme der Zellmasse bezeichnet. Die Geschwindigkeit des Wachstums ist abhängig von der Anzahl der Teilungen pro Zeiteinheit, wobei *E. coli* unter idealen Wachstumsbedingungen eine Generationszeit von etwa 20 Minuten besitzt.⁸¹ Die Trübung und damit die bakterielle Zellmasse kann durch photometrische Messung der optischen Dichte (OD) quantifiziert werden. Wird die Zellmasse gegen die Zeit aufgetragen, ergibt sich eine sigmoidale Kurve, die als Wachstumskurve bezeichnet wird. Diese kann in vier Phasen eingeteilt werden: Anlaufphase (lag), exponentielle Phase (log), stationäre Phase und Absterbephase (Abbildung 27).

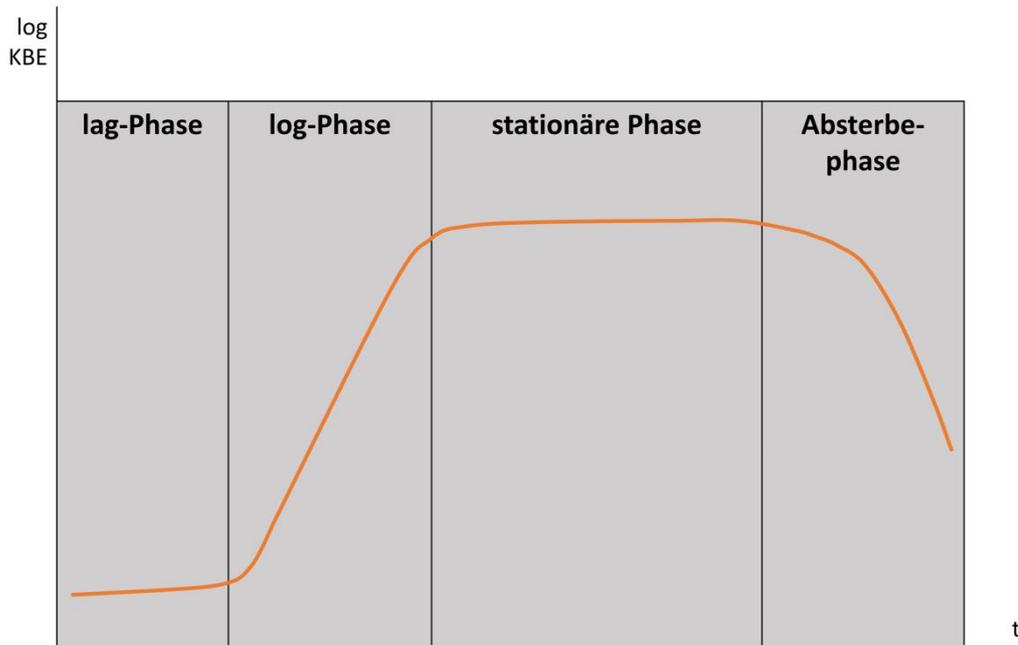


Abbildung 27 Bakterielle Wachstumskurve; KBE=koloniebildende Einheit

Bevor sich die Bakterien exponentiell vermehren, brauchen sie in der Anlaufphase Zeit, um sich an die neue Wachstums Umgebung anzupassen. Sobald die sich teilenden Zellen die Nährstoffe im Wachstumsmedium während der exponentiellen Phase verbraucht haben, gehen sie in die stationäre Phase über. Hier stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht ein, in dem sich die Zahl der absterbenden und hinzukommenden Bakterien die Waage halten. In der Absterbephase sinkt die Zellmasse aufgrund der Anhäufung von (toxischen) Ausscheidungsprodukten des eigenen bakteriellen Stoffwechsels und des endgültigen Verbrauchs der Nährstoffe.⁸²

Aus den Versuchen zum Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp geht hervor, dass sich die Wachstumskurven zweier Mutanten deutlich von den anderen unterscheiden. So erreichen die Stämme $\Delta hp29$ und $\Delta hp30$ deutlich schneller die stationäre Phase und die finale OD_{600} ist ebenso niedriger als die der anderen getesteten Stämme. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Gene $hp29$ und $hp30$ eine regulatorische Funktion für das Bakterienwachstum sowie die Zellteilung besitzen. Ist das Wachstum der Mutante im Vergleich zum Wildtyp verringert, spricht man in Bezug auf das deletierte Gen von einem positiven Regulator, wie es bei $\Delta hp29$ und $\Delta hp30$ der Fall ist. Umgekehrt gilt ein Gen als negativer Regulator, wenn die Deletionsmutante einen positiven Effekt auf das Wachstum

zeigt. Eine Hypothese wäre, dass *hp29* und *hp30* Einfluss auf zellinterne Metabolismus-Prozesse ausüben, beispielsweise durch Regulation der Transkription oder Translation einiger Gene. Die verringerte Wachstumsgeschwindigkeit könnte aber auch dadurch zustande kommen, dass sich durch die Deletion von *hp29* und *hp30* potentiell zytotoxische Metabolite in der Zelle anreichern, die die Zellteilung inhibieren. Die Funktion und der enorme Einfluss von *hp29* und *hp30* auf das Wachstum kann somit erste Hinweise auf die Erfolgsmechanismen von pV163M geben und bietet möglicherweise eine Grundlage für weitere Arbeiten, um den Effekt weiter zu untersuchen. Die Abbildung 28 zeigt eine Übersicht der Gene, die nach erfolgreicher Deletion das Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten in Relation zum Wildtyp von pV163M beeinflussen.

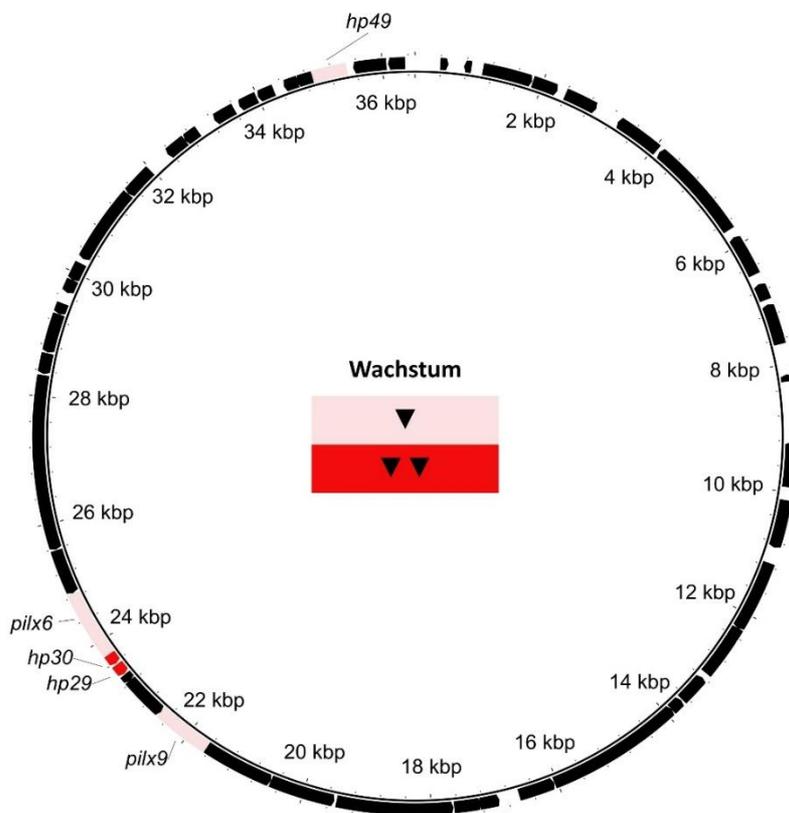


Abbildung 28 Plasmidkarte von pV163M mit farblich hervorgehoben Genen, die nach ihrer Deletion Einfluss auf das Wachstum gezeigt haben (verringertes Wachstum ▼, stark verringertes Wachstum ▼▼)

5.2.3 Konjugationseffizienz

Ein Ziel dieser Arbeit war es, neben der Etablierung eines geeigneten Mutageneseverfahrens, die Erfolgsmechanismen der Verbreitung des Colistin Resistenzgens *mcr-1* bzw. *mcr-1-*

kodierter Plasmide aufzudecken. Dazu war es nötig, das Konjugationsverhalten der einzelnen Deletionsmutanten zu analysieren, um beteiligte Gene zu detektieren.

Die Abbildung 29 zeigt eine Übersicht der Gene, die nach erfolgreicher Deletion die Konjugationseffizienz der Deletionsmutanten in Relation zum Wildtyp von pV163M beeinflussen.

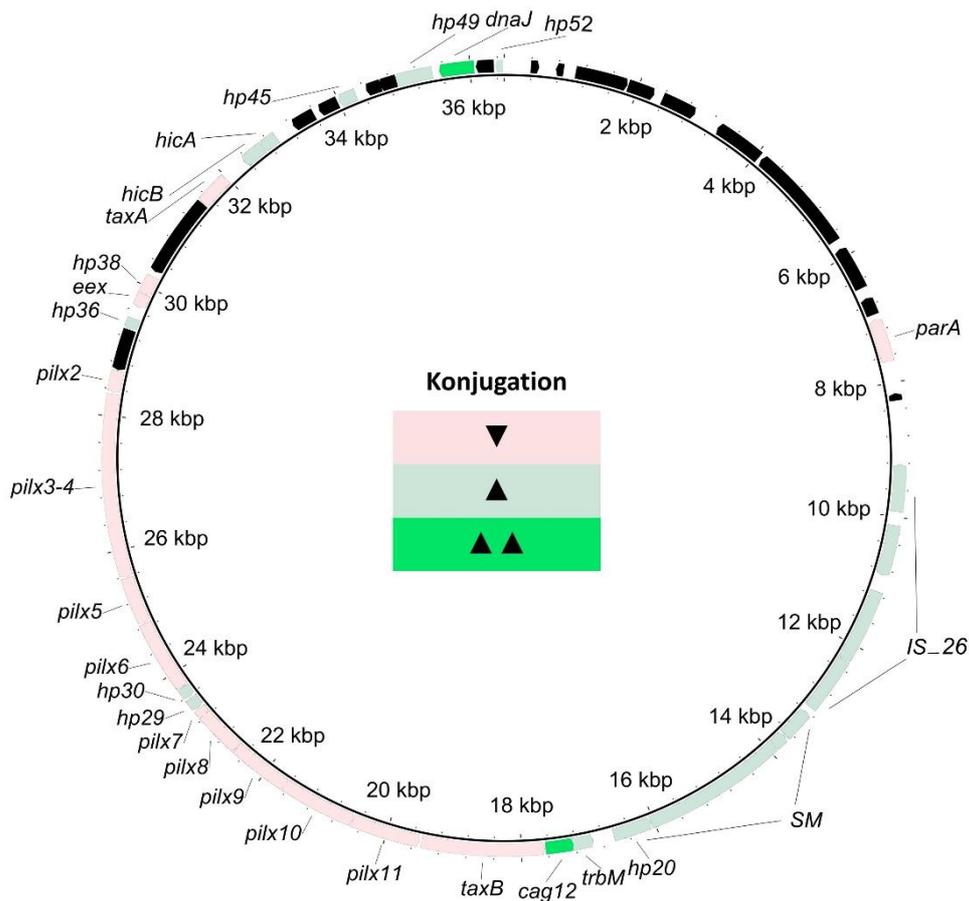


Abbildung 29 Plasmidkarte von pV163M mit farblich hervorgehobenen Genen, die nach ihrer Deletion Einfluss auf die Konjugationseffizienz gezeigt haben (verringerte Konjugationseffizienz ▼, erhöhte Konjugationseffizienz ▲, stark erhöhte Konjugationseffizienz ▲▲)

Den Ergebnissen zur Konjugationseffizienz aus 4.3 ist zu entnehmen, dass die Konjugationseffizienzen der Deletionsmutanten Δeex , $\Delta pilx5$, $\Delta pilx3-4$, $\Delta pilx2$, $\Delta pilx7$, $\Delta taxA$, $\Delta hp38$, $\Delta pilx8$, $\Delta taxB$, $\Delta pilx10$, $\Delta pilx6$, $\Delta pilx9$, $\Delta pilx11$ und $\Delta parA$ verglichen mit dem Wildtyp reduziert sind. Dies liegt an der Tatsache, dass die *pilx*-Gene Teil der Konjugationsmaschinerie sind, ebenso wie *taxA* und *taxB*. Das Gen *eex* (entry exclusion) dient der Verhinderung des Eintritts weiterer Plasmide und kann deshalb indirekt der Kategorie der Konjugation

zugeordnet werden.⁸³ Es ist naheliegend, dass *hp38* ebenfalls an der Konjugation beteiligt ist, da dessen Deletionsmutanten gleichermaßen eine negative Konjugationseffizienz aufweisen. Die mit Abstand höchsten relativen Konjugationseffizienzen im Vergleich zum Wildtyp von pV163M zeigen die Mutanten $\Delta cag12$ und $\Delta dnaJ$. Die Daten deuten darauf hin, dass *cag12* und *dnaJ* einen negativen Einfluss auf die Konjugation und damit auf die Übertragung des Plasmids auf andere Bakterien besitzen. Das Genprodukt von *dnaJ* ist als Chaperon an der Protein-Translation, Faltung, Translokation und Degradation beteiligt.⁸⁴ Es gilt in weiteren Arbeiten zu eruieren, warum die Konjugation ohne das Gen *dnaJ* in einem solchen Ausmaß verbessert ist. Die Mutante mit den höchsten getesteten Konjugationseffizienzen ist $\Delta cag12$. Bisher wurde das Genprodukt von *cag12* (cytotoxin-associated gene) nur als ein Protein der superfamily der *cag*-Pathogenitätsinsel-Proteine von *Helicobacter pylori* beschrieben.⁸⁵ *Helicobacter pylori*-Stämme, die die *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag* PAI) enthalten, sind mit einem höheren Risiko für Magenkarzinome oder die peptische Ulkuskrankheit verbunden als *cag* PAI-negative Stämme. Das Gen *cag* PAI kodiert dabei für ein Typ-IV-Sekretionssystem, das die Freisetzung des CagA-Effektorproteins in Magenepithelzellen vermittelt.⁸⁶ Proteine der *cag*-Pathogenitätsinsel stellen somit einen wichtigen Virulenzfaktor Gram-negativer Bakterien dar. Die Tatsache, dass die Deletionsmutante $\Delta cag12$ sein Plasmid deutlich effektiver auf andere Bakterien überträgt als der Wildtyp, ist eine bemerkenswerte Erkenntnis und bildet eine mögliche Grundlage für weitere Studien.

5.2.4 Plasmidkopiezahl

Die Daten zu den Plasmidkopiezahlen der Deletionsmutanten ergeben teilweise deutliche Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp von pV163M. Die Abbildung 30 zeigt eine Übersicht der Gene, die nach erfolgreicher Deletion die Plasmidkopiezahl der Deletionsmutanten in Relation zum Wildtyp von pV163M beeinflussen.

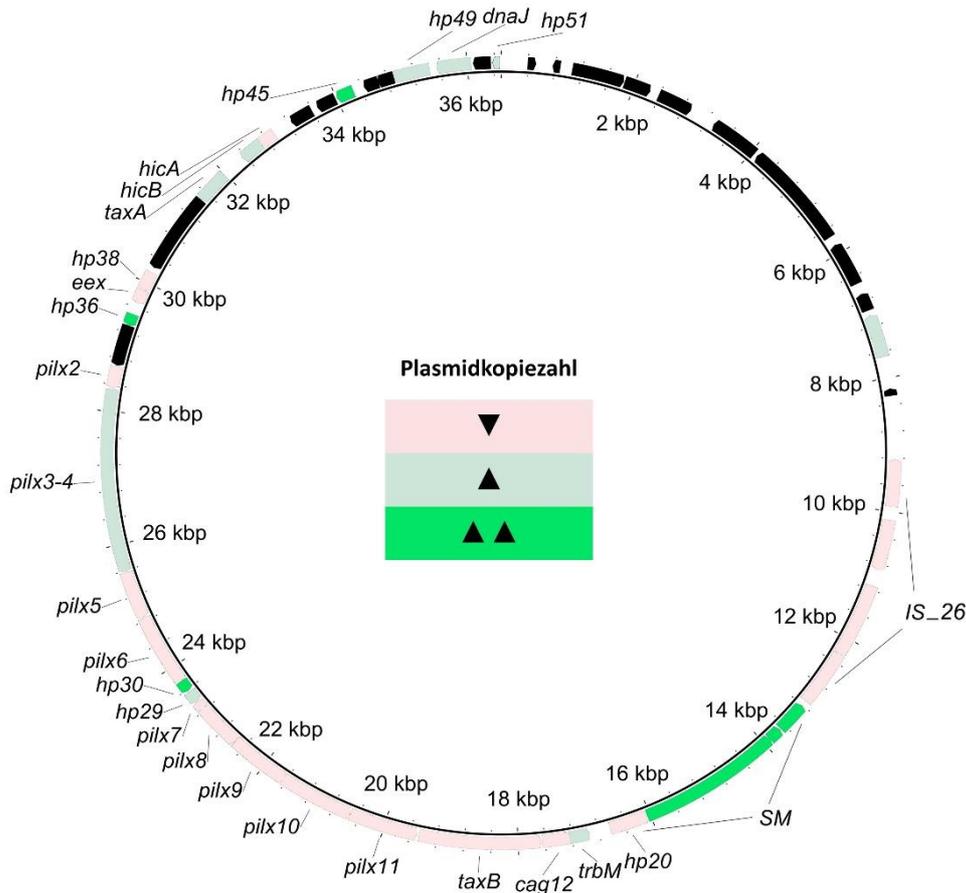


Abbildung 30 Plasmidkarte von pV163M mit farblich hervorgehoben Genen, die nach ihrer Deletion Einfluss auf die Plasmidkopiezahl gezeigt haben (verringerte Plasmidkopiezahl ▼, erhöhte Plasmidkopiezahl ▲, stark erhöhte Plasmidkopiezahl ▲▲)

Die Mutanten $\Delta hp30$, $\Delta hp36$, $\Delta hp45$ und ΔSM weisen dabei die höchsten Plasmidkopiezahlen auf. Die geringsten Kopiezahlen zeigen die Mutanten $\Delta hp20$, $\Delta hp38$, $\Delta pilx2$, $\Delta pilx5$, $\Delta pilx6$, $\Delta pilx7$, $\Delta pilx8$, $\Delta pilx9$, $\Delta pilx10$, $\Delta pilx11$, $\Delta hicA$, $\Delta taxB$, $\Delta cag12$, Δeex und ΔIS_{26} . Auffällig dabei ist, dass die meisten dieser Gene ($\Delta pilx2$, $\Delta pilx5$, $\Delta pilx6$, $\Delta pilx7$, $\Delta pilx8$, $\Delta pilx9$, $\Delta pilx10$, $\Delta pilx11$, $\Delta taxB$) an der Konjugation beteiligt sind. Die Deletion dieser Konjugationsmaschinerie-Gene hat demnach zusätzlich zu dem Verlust der Fähigkeit zur Konjugation auch einen negativen Einfluss auf die Anzahl der Plasmide in der Zelle. Insgesamt ist die Anzahl der Plasmidkopien pro Zelle von verschiedenen Faktoren abhängig. Plasmidkopiezahl und Wachstum der plasmidhaltigen Zellen beeinflussen sich dabei gegenseitig. Hohe Kopiezahlen führen zwar zu hoher Genexpression, bedeuten allerdings auch eine höhere metabolische Belastung.⁸⁷ Die Ergebnisse der Plasmidkopiezahlbestimmung weisen auf mögliche Regulatorfunktionen einiger Gene hin. Gene, die mutiert mit höherer Plasmidkopiezahl einhergehen, könnten

demnach negative Regulatoren darstellen. Zeigen Deletionsmutanten hingegen niedrigere Plasmidkopiezahlen als der Wildtyp, deutet dies auf einen positiven Regulator hin.

5.2.5 Verdopplungsraten

Bei den Verdopplungsraten waren die Ergebnisse bei 16 Mutanten interpretierbar. Von diesen 16 Mutanten wies lediglich die Deletionsmutante $\Delta hp36$ eine identische Verdopplungsrate wie der Wildtyp auf, alle anderen Mutanten hatten eine geringere Verdopplungsrate. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass jeglicher Eingriff in das bereits sehr gut angepasste Plasmid pV163M (z.B. Entfernung eines Gens) das Gleichgewicht zwischen Plasmid und seinem bakteriellen Wirt stört. Die Ergebnisse liefern mögliche Hinweise auf eine Beteiligung der untersuchten Gene an der Zellteilung. Die Mutante $\Delta hp36$ könnte demnach einen geringeren Einfluss auf die Zellteilung besitzen als die anderen getesteten Mutanten.

5.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Lambda-Red-Mutagenese ein geeignetes Verfahren gefunden, um alle Gene von pV163M einzeln zu deletieren. Eine weitere Charakterisierung der Deletionsmutanten kann dabei helfen, die Funktionen der einzelnen Gene weiter zu eruieren und daraus mögliche Erfolgsstrategien des *mcr-1*-kodierenden IncX4-Plasmids abzuleiten. Hilfreich wäre in diesem Zusammenhang beispielsweise die Durchführung von Kompetitions- oder Stabilitätsassays, um eventuelle Selektionsvorteile der Mutanten aufzudecken. Die segregative Plasmidstabilität ist eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Expression eines Proteins und hat somit einen potentiell hohen Stellenwert bezüglich der Verbreitung des Plasmids.⁸⁸ Des Weiteren wäre eine Analyse der Funktion der Deletionsmutanten $\Delta hp29$ und $\Delta hp30$ relevant, da diese einen starken negativen Einfluss auf das Bakterienwachstum zeigen. Auch wäre zu klären, weshalb die Konjugationseffizienz der Mutante $\Delta cag12$ um ein Vielfaches höher ist als die des Wildtyps. Möglicherweise besitzt das Genprodukt von *cag12* neben der Funktion als Pathogenitätsfaktor eine regulatorische Relevanz hinsichtlich der Plasmidübertragung auf andere Bakterien. Somit kann diese Arbeit als Ausgangspunkt für weitere Studien dienen, um die hypothetischen Proteine weiter zu

klassifizieren und deren Funktion zu ermitteln. Um weitere Erkenntnisse in Bezug auf die Interaktion zwischen Plasmid und Chromosom zu erlangen, wäre außerdem eine Transkriptom-Analyse von pV163M hilfreich. Das Transkriptom stellt die Gesamtheit aller zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribierten Gene und somit auch die Summe aller hergestellten RNA-Moleküle in einer Zelle oder einem Gewebe dar. Damit spiegelt es die Aktivität der Genexpression eines Organismus wieder. Die genaue Zusammensetzung des mRNA-Profiles kann Rückschlüsse auf die Funktionen von Genen liefern, da es den physiologischen Zustand einer Zelle repräsentiert. Dazu muss die mRNA isoliert werden, bevor sie für die Reverse Transkription genutzt und in cDNA umgeschrieben werden kann. In Transkriptom-Analysen können mit der gewonnenen cDNA Auswirkungen auf den Phänotyp untersucht werden.⁸⁹ Das Verfahren RNAseq basiert dabei auf Sequenzierungsmethoden der nächsten Generation (NGS) und ermöglicht neben der genauen Bestimmung der Sequenz auch Aussagen über die Menge der RNA.⁹⁰ Damit könnten die einzelnen Deletionsmutanten in Bezug auf die Menge der Transkripte zu einem bestimmten Zeitpunkt charakterisiert und die Basis für mögliche Erfolgsmechanismen von pV163M aufgedeckt werden.

6. Zusammenfassung

Die weltweite Zunahme an Antibiotikaresistenzen stellt ein enormes Problem unserer Zeit dar, sodass ein Verständnis über die Resistenz-Mechanismen und ihre Verbreitungswege einen zunehmend größeren Stellenwert erlangen. Die Gründe für Antibiotikaresistenzen sind vielfältig. Durch den massiven Einsatz von Antibiotika in der Tier- und Humanmedizin werden resistente Bakterien selektioniert und die Resistenzgene unter den Bakterien ausgetauscht. Infiziert sich ein Patient mit dem entstandenen multiresistenten Erreger, bleiben oftmals nur noch sogenannte Reserveantibiotika eine Therapieoption. Eines davon ist Colistin. Dieses Antibiotikum der Gruppe der Polymyxine hat eine gute Wirksamkeit gegenüber Gram-negativen Bakterien. Vor allem bei sehr resistenten Keimen gehört es oftmals zu den einzigen verbliebenen noch wirksamen Antibiotika, da es einen anderen Wirkmechanismus als beispielsweise die Beta-Lactam-Antibiotika besitzt. Colistin interagiert mit dem Lipid A der Lipopolysaccharide der äußeren Zellmembran Gram-negativer Enterobacteriaceae und führt durch dessen Lyse zum Zelltod. Doch in den letzten Jahren wurde immer häufiger von Resistenzen auch gegenüber Colistin berichtet. Das Plasmid-lokalisierte Colistin-Resistenzgen *mcr-1* kodiert für eine Phosphoethanolamin-Transferase, welche die Affinität zwischen Colistin und Lipid A verringert, sodass Colistin seine bakterizide Wirkung verliert. Trotz strenger Reglementierungen in der Nutztierzucht wurde *mcr-1* in verschiedensten Isolaten mittlerweile global nachgewiesen. Dies lässt auf eine schnelle und effiziente Verbreitung der plasmidkodierten Resistenz schließen. Es ist anzunehmen, dass bestimmte genetische Erfolgsmechanismen existieren, die die Verbreitung des *mcr-1*-tragendem Plasmid pV163M fördern. Um die einzelnen Gene von pV163M in Hinblick auf ihre Funktion zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit einzelne Gene von pV163M unabhängig voneinander deletiert. Als Verfahren wurde dazu die Lambda-Red-Rekombinase-Mutagenese angewandt, welche sich als sehr erfolgreich erwies. Es konnten im Rahmen dieser Arbeit 28 Plasmid-Deletionsmutanten hergestellt werden. Die entstandenen Mutanten wurden anschließend in Versuchen zum Wachstumsverhalten und zur Konjugationseffizienz untersucht, wobei die Mutanten $\Delta cag12$ und $\Delta dnaJ$ besonders hohe Konjugationseffizienzen, die Mutanten $\Delta hp29$ und $\Delta hp30$ auffallend niedrige Wachstumskurven aufwiesen. Diese Gene könnten demnach besondere Rollen bezüglich der Übertragung des Plasmids auf andere Bakterien beziehungsweise der regulatorischen Funktionen für das Bakterienwachstum besitzen.

7. Summary

The global increase of antibiotic resistance is an enormous problem of our time, therefore an understanding of the resistance mechanisms and their way of spreading is becoming increasingly important. The reasons for antibiotic resistance are manifold. Due to the massive use of antibiotics in veterinary and human medicine, resistant bacteria are selected and the resistance genes are exchanged among the bacteria. If a patient becomes infected with the resulting multi-resistant pathogen, often only so-called reserve antibiotics remain as a therapeutic option. One of these is colistin. This antibiotic of the polymyxin group has good efficacy against Gram-negative bacteria. Especially in the case of very resistant germs, it is often one of the only remaining effective antibiotics, as it has a different mechanism of action than, for example, the beta-lactam antibiotics. Colistin interacts with lipid A of the lipopolysaccharides of the outer cell membrane of Gram-negative Enterobacteriaceae and leads to cell death through its lysis. However, in recent years, resistance to colistin has been increasingly reported. The plasmid-localised colistin resistance gene *mcr-1* codes for a phosphoethanolamine transferase that reduces the affinity between colistin and lipid A, in the course of this colistin loses its bactericidal effect. Despite strict regulations in farm animal husbandry, *mcr-1* has now been detected globally in a wide variety of isolates. This suggests a rapid and efficient spread of plasmid-encoded resistance. It can be assumed that certain genetic success mechanisms exist that promote the spread of the *mcr-1*-carrying plasmid pV163M. In order to examine the individual genes of pV163M with regard to their function, the genes of pV163M were deleted one after the other in the course of this work. The method used was Lambda-red recombinase mutagenesis, which proved to be very successful. In the course of this work, 28 plasmid deletion mutants were produced. The resulting mutants were then examined in experiments on growth behaviour and conjugation efficiency, whereby the $\Delta cag12$ and $\Delta dnaJ$ mutants exhibited particularly high conjugation efficiencies, while the $\Delta hp29$ and $\Delta hp30$ mutants showed strikingly low growth curves. These genes could therefore have special roles with regard to the transfer of the plasmid to other bacteria or the regulatory functions for bacterial growth.

8. Literaturverzeichnis

1. Fleming, S. A. Nobel Lecture, December 11, 1945. *Nobel Lect. Physiol. or Med. 1942-1962* 83–93 (1945).
2. World Health Organization. WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. *Antimicrob. Resist. Glob. Rep. Surveill. 2014* XI, 21 (2016).
3. Wieler, L. H. & Broich, K. Antibiotikaresistenzen: Große Herausforderungen erfordern komplexe Lösungen. *Bundesgesundheitsbl* **61**, 495–498 (2018).
4. Cassini, A. *et al.* Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* **19**, 56–66 (2019).
5. Leimbach, A., Hacker, J. & Dobrindt, U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **358**, 3–32 (2013).
6. Russo, T. A. & Johnson, J. R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: Focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* **5**, 449–456 (2003).
7. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M. & Hultgren, S. J. Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 269–284 (2015).
8. Sewnath, M. E. *et al.* IL-10-Deficient Mice Demonstrate Multiple Organ Failure and Increased Mortality During *Escherichia coli* Peritonitis Despite an Accelerated Bacterial Clearance. *J. Immunol.* **166**, 6323–6331 (2001).
9. Croxen, M. A. & Finlay, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 26–38 (2010).
10. Chellat, M. F., Raguž, L. & Riedl, R. Antibiotikaresistenzen gezielt überwinden. *Angew. Chem. Int. Ed.* **55**, 6615 (2016).
11. Magiorakos, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, 268–281 (2012).
12. Pfeifer, Y. ESBL, AmpC und Carbapenemasen: Vorkommen, Verbreitung und Diagnostik β -Lactamase-bildender Gram-negativer Krankheitserreger.

- LaboratoriumsMedizin* **34**, 205–215 (2010).
13. Falagas, M. E. & Kasiakou, S. K. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1333–1341 (2005).
 14. Gurjar, M. Colistin for lung infection: An update. *J. Intensive Care* **3**, 2 (2015).
 15. Zamyatina, A. Aminosugar-based immunomodulator lipid A: synthetic approaches. *Beilstein J. Org. Chem.* **143** **14**, 25–53 (2018).
 16. Clifton, L. A. *et al.* Effect of divalent cation removal on the structure of gram-negative bacterial outer membrane models. *Langmuir* **31**, 404–412 (2015).
 17. Rhouma, M., Beaudry, F., Thériault, W. & Letellier, A. Colistin in pig production: Chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives. *Front. Microbiol.* **7**, 1–22 (2016).
 18. Martis, N., Leroy, S. & Blanc, V. Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections: A narrative review for the clinician. *J. Infect.* **69**, 4 (2014).
 19. El-Sayed Ahmed, M. A. E. G. *et al.* Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 868–885 (2020).
 20. Enne, V. I., Cassar, C., Sprigings, K., Woodward, M. J. & Bennett, P. M. A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**, 193–199 (2008).
 21. Olaitan, A. O., Morand, S. & Rolain, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol.* **5**, 1–18 (2014).
 22. Liu, Y. Y. *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 161–168 (2016).
 23. Irrgang, A. *et al.* Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from Livestock and Food in Germany, 2010–2015. *PLoS One* **11**, (2016).
 24. Schwarz, S. & Johnson, A. P. Transferable resistance to colistin: A new but old threat. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 2066–2070 (2016).
 25. Reardon, S. Spread of antibiotic-resistance gene does not spell bacterial apocalypse —

- yet. *Nature* (2015) doi:10.1038/nature.2015.19037.
26. Walsh, T. R. & Wu, Y. China bans colistin as a feed additive for animals. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 1102–1103 (2016).
 27. Perez, F. & Bonomo, R. A. Colistin resistance in China: from outer membrane to One Health. *Lancet Infect. Dis.* **20**, 1106–1108 (2020).
 28. Heuer, H. & Smalla, K. Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 1083–1104 (2012).
 29. Münch, K., Münch, R., Biedendieck, R., Jahn, D. & Müller, J. Evolutionary model for the unequal segregation of high copy plasmids. *PLoS Comput. Biol.* **15**, 1–2 (2019).
 30. Harrison, P. W., Lower, R. P. J., Kim, N. K. D. & Young, J. P. W. Introducing the bacterial ‘chromid’: Not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol.* **18**, 141–148 (2010).
 31. Silva, F., Queiroz, J. A. & Domingues, F. C. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnol. Adv.* **30**, 691–708 (2012).
 32. Vogwill, T. & Maclean, R. C. The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: A meta-analysis approach. *Evol. Appl.* **8**, 284–295 (2015).
 33. Grabherr, R., Nilsson, E., Striedner, G. & Bayer, K. Stabilizing plasmid copy number to improve recombinant protein production. *Biotechnol. Bioeng.* **77**, 142–147 (2002).
 34. San Millan, A. Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. *Trends Microbiol.* **26**, 978–985 (2018).
 35. Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 711–721 (2005).
 36. Carattoli, A. Plasmids and the spread of resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* **303**, 298–304 (2013).
 37. Nordmann, P., Naas, T. & Poirel, L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1791–1798 (2011).
 38. Falgenhauer, L. *et al.* Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 282–283 (2016).
 39. Novick, R. P. *et al.* Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol. Rev.* **40**, 525 (1976).
 40. Novick, R. P. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**, 381–395 (1987).

41. Oper. The Culture Collections – a Public Health England biological resource centre. *Public Heal. Engl.* (2015).
42. Carattoli, A. *et al.* Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer β -lactams. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1145–1148 (2006).
43. Ni, S. *et al.* Conjugative plasmid-encoded toxin–antitoxin system PrpT/PrpA directly controls plasmid copy number. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118**, (2021).
44. Azarderakhsh, S. Analyse der Erfolgsmechanismen von *mcr-1*-kodierenden IncX4-Plasmiden. (2017).
45. Kunnimalaiyaan, S., Rakowski, S. A. & Filutowicz, M. Structure-based functional analysis of the replication protein of plasmid R6K: Key amino acids at the π /DNA interface. *J. Bacteriol.* **189**, 4953–4956 (2007).
46. Makarova, K. S., Grishin, N. V. & Koonin, E. V. The HicAB cassette, a putative novel, RNA-targeting toxin-antitoxin system in archaea and bacteria. *Bioinformatics* **22**, 2581–2584 (2006).
47. Cooper, T. F. & Heinemann, J. A. Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12643–12648 (2000).
48. Griffiths, A. Introduction to Genetic Analysis, 9th Edition. *book* (2020).
49. Beale, G. The discovery of mustard gas mutagenesis by Auerbach and Robson in 1941. *Genetics* **134**, 393–399 (1993).
50. Durland, J. & Ahmadian-Moghadam, H. *Genetics, Mutagenesis. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
51. Trovão, M. *et al.* Random Mutagenesis as a Promising Tool for Microalgal Strain Improvement towards Industrial Production. *Mar. Drugs* **20**, (2022).
52. Arkin, M. In Vitro Mutagenesis. **2**, 1010–1014 (2001).
53. Jajesniak, P. & Wong, T. S. QuickStep-Cloning: a sequence-independent, ligation-free method for rapid construction of recombinant plasmids. *J. Biol. Eng.* **9**, 15 (2015).
54. Reinard, T. Molekularbiologische Methoden 2.0. in 183–187 (2018).
55. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, (2000).
56. Mitsis, P. G. & Kwagh, J. G. Characterization of the interaction of lambda exonuclease with the ends of DNA. *Nucleic Acids Res.* **27**, 3057–3063 (1999).

57. Kmiec, E. & Holloman, W. K. Beta protein of bacteriophage lambda promotes renaturation of DNA. *JOURNAL. BIOLOGICAL Chem.* **256**, 12636–12639 (1981).
58. Poteete, A. R. What makes the bacteriophage λ Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol. Lett.* **201**, 9–14 (2001).
59. Court, D. L., Sawitzke, J. A. & Thomason, L. C. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu. Rev. Genet.* **36**, 361–388 (2002).
60. Abdoli, R., Amirthalingam, S., Lillquist, A. & Nutt, J. Effect of L-arabinose on the specific homologous recombination efficiency using the Lambda Red Recombinase system for gene disruption of *lacI* in *Escherichia coli* C29 cells. *J. Exp. Microbiol. Immunol.* **11**, 120–124 (2007).
61. Yu, D. *et al.* An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2000) doi:10.1073/pnas.100127597.
62. Lazarus, J. E. *et al.* A new suite of allelic-exchange vectors for the scarless modification of proteobacterial genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* (2019) doi:10.1128/AEM.00990-19.
63. Pelicic, V., Reyrat, J. M. & Gicquel, B. Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J. Bacteriol.* **178**, 1197 (1996).
64. Khetrapal, V. *et al.* A set of powerful negative selection systems for unmodified Enterobacteriaceae. *Nucleic Acids Res.* **43**, e83–e83 (2015).
65. Beyer, H. M. *et al.* AQUA cloning: A versatile and simple enzyme-free cloning approach. *PLoS One* (2015) doi:10.1371/journal.pone.0137652.
66. Reinard, T. Molekularbiologische Methoden 2.0. in 91–93 (2018).
67. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (80-.).* **337**, 816–821 (2012).
68. Pennisi, E. The CRISPR craze. *Science* vol. 341 833–836 (2013).
69. Sorek, R., Kunin, V. & Hugenholtz, P. CRISPR - A widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 181–186 (2008).
70. Deltcheva, E. *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **471**, 602–607 (2011).
71. Reinard, T. Molekularbiologische Methoden 2.0. in 289–293 (2018).

72. Westra, E. R. *et al.* Type I-E CRISPR-Cas Systems Discriminate Target from Non-Target DNA through Base Pairing-Independent PAM Recognition. *PLoS Genet.* **9**, (2013).
73. Jacoby, G. A. & Han, P. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 908–911 (1996).
74. Bankevich, A. *et al.* SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **19**, 455–477 (2012).
75. Schwengers, O. *et al.* ASA3P: An automatic and scalable pipeline for the assembly, annotation and higher-level analysis of closely related bacterial isolates. *PLOS Comput. Biol.* **16**, e1007134 (2020).
76. Baba, T. *et al.* Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* (2006) doi:10.1038/msb4100050.
77. Juers, D. H., Matthews, B. W. & Huber, R. E. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Sci.* **21**, 1792 (2012).
78. JP, H. *et al.* SUBSTRATES FOR CYTOCHEMICAL DEMONSTRATION OF ENZYME ACTIVITY. I. SOME SUBSTITUTED 3-INDOLYL-BETA-D-GLYCOPYRANOSIDES. *J. Med. Chem.* **7**, 574–575 (1964).
79. Barkley, M. D. & Bourgeois, S. Repressor Recognition of Operator and Effectors. in *The Operon* (eds. Miller, J. H. & Reznikoff, W. S.) 177–220 (Cold Spring Harbor Laboratory, 1980).
80. Dmowski, M. & Jagura-Burdzy, G. Active stable maintenance functions in low copy-number plasmids of Gram-positive bacteria II. Post-segregational Killing Systems. *Polish Journal of Microbiology* vol. 62 17–22 (2013).
81. Clark, D. J. & Maaløe, O. DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **23**, 99–112 (1967).
82. Jun, S., Si, F., Pugatch, R. & Scott, M. Fundamental Principles in Bacterial Physiology - History, Recent progress, and the Future with Focus on Cell Size Control: A Review. *Rep. Prog. Phys.* **81**, 056601 (2018).
83. Humbert, M., Huguët, K. T., Coulombe, F. & Burrus, V. Entry exclusion of conjugative plasmids of the IncA, IncC, and related untyped incompatibility groups. *J. Bacteriol.* **209**, (2019).

84. Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S. & Wang, L. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2006) doi:10.1007/s00018-006-6192-6.
85. Kim, S. J., Jun, D. Y., Yang, C. H. & Kim, Y. H. Expression of *Helicobacter pylori* *cag12* gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its oral administration to induce systemic anti-Cag12 immune response in mice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 462–470 (2006).
86. Lin, A. S. *et al.* Bacterial energetic requirements for *helicobacter pylori* *cag* type IV secretion system-dependent alterations in gastric epithelial cells. *Infect. Immun.* **88**, (2020).
87. Anthony Mason, C. & Bailey, J. E. Effects of plasmid presence on growth and enzyme activity of *Escherichia coli* DH5 α . *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1989 321 32**, 54–60 (1989).
88. Lee, J. H. & Lee, K. J. Effect of growth rate and cultivation environments on cloned gene stability and the cloned gene product formation in *Streptomyces lividans*. *J. Biotechnol.* **33**, 195–204 (1994).
89. Reinard, T. Molekularbiologische Methoden 2.0. in 76–78, 285–286 (2018).
90. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **2008 101 10**, 57–63 (2009).

9. Anhang

9.1 Daten der Konjugation

Tabelle 23 Originaldaten Konjugation

Mutante	Versuch No.	Zellzahl Mutante	Zellzahl Transkonjugant	Konjugationseffizienz	Relative Konjugationseffizienz
<i>Δeex</i>	1	1,69E+11	1,29E+08	1,03E-03	1,57E-03
	2	4,18E+11	6,00E+08	1,34E-02	7,29E-02
<i>Δcag12</i>	1	6,21E+10	4,04E+10	3,23E-01	4,90E-01
	2	4,11E+11	1,06E+11	2,35E+00	1,28E+01
	3	1,55E+10	1,09E+11	5,82E+00	2,16E+01
<i>Δpilx5</i>	1	5,86E+10	6,00E+02	4,80E-09	7,29E-09
	2	3,36E+11	0	0	0
<i>ΔhicA/B</i>	1	8,71E+10	3,93E+10	3,14E-01	4,77E-01
	2	4,78E+11	1,61E+10	3,57E-01	1,95E+00
	3	1,85E+10	2,91E+09	1,55E-01	5,78E-01
<i>Δpilx3-4</i>	1	9,52E+10	0	0	0
	2	4,34E+10	0	0	0
<i>Δpilx2</i>	1	5,07E+10	0	0	0
	2	1,77E+11	0	0	0
<i>ΔhicA</i>	1	9,45E+09	1,17E+10	7,50E-02	2,12E+00
	2	4,14E+10	1,36E+10	8,21E-02	1,39E+00
<i>Δpilx7</i>	1	2,00E+10	8,45E+03	1,03E-07	7,10E-06
	2	3,56E+11	0	0	0
<i>ΔdnaJ</i>	1	4,36E+10	6,41E+10	4,10E-01	1,16E+01
	2	2,40E+11	2,24E+11	8,89E-01	1,47E+01
<i>Δhp30</i>	1	8,70E+09	1,65E+09	2,01E-02	1,39E+00
	2	1,60E+11	4,63E+09	1,84E-02	3,05E-01
	3	2,54E+10	2,84E+09	1,52E-01	5,64E-01
<i>Δhp45</i>	1	1,42E+10	1,73E+10	1,11E-01	3,14E+00
	2	2,39E+11	6,95E+10	2,76E-01	4,57E+00
<i>Δhp29</i>	1	5,80E+09	1,84E+09	2,24E-02	1,55E+00

Mutante	Versuch No.	Zellzahl Mutante	Zellzahl Transkonjugant	Konjugationseffizienz	Relative Konjugationseffizienz
	2	3,89E+11	1,90E+10	7,54E-02	1,25E+00
<i>ΔtaxA</i>	1	1,00E+10	5,78E+05	3,70E-06	1,05E-04
	2	4,73E+11	1,12E+05	4,43E-07	7,35E-06
<i>ΔSM</i>	1	1,58E+10	1,38E+10	8,85E-02	2,50E+00
	2	4,36E+11	1,79E+10	7,12E-02	1,18E+00
<i>Δhp36</i>	1	1,28E+11	8,65E+09	1,04E-01	1,09E+00
	2	1,31E+11	1,21E+10	1,50E-01	4,45E+00
	3	9,93E+10	5,76E+09	3,08E-01	1,15E+00
<i>Δhp38</i>	1	8,12E+10	8,20E+04	9,82E-07	1,03E-05
	2	1,00E+11	6,90E+04	8,59E-07	2,55E-05
<i>Δhp49</i>	1	4,26E+10	1,05E+10	1,26E-01	1,33E+00
	2	1,25E+11	4,77E+09	5,94E-02	1,76E+00
<i>Δhp52</i>	1	7,05E+09	1,08E+10	6,89E-02	1,95E+00
	2	3,23E+11	4,55E+09	5,66E-02	1,68E+00
<i>Δpilx8</i>	1	2,15E+10	2,42E+04	2,95E-07	2,03E-05
	2	6,01E+10	4,00E+03	4,98E-08	1,48E-06
<i>ΔtaxB</i>	1	1,20E+11	3,00E+02	3,59E-09	3,77E-08
	2	1,09E+11	6,00E+02	7,48E-09	2,22E-07
<i>Δpilx10</i>	1	4,31E+10	1,50E+03	1,80E-08	1,89E-07
	2	1,29E+11	8,00E+02	9,97E-09	5,33E-07
<i>Δpilx6</i>	1	5,30E+10	0	0	0
	2	1,77E+11	2,40E+03	2,99E-08	1,60E-06
<i>Δhp20</i>	1	2,64E+10	4,01E+09	4,80E-02	5,04E-01
	2	1,19E+11	2,22E+09	2,77E-02	1,48E+00
	3	2,86E+10	9,53E+09	5,10E-01	1,90E+00
<i>Δpilx9</i>	1	2,20E+10	0	0	0
	2	3,62E+11	0	0	0
<i>Δpilx11</i>	1	1,72E+10	2,00E+02	2,40E-09	2,52E-08
	2	2,14E+11	2,00E+02	2,49E-09	1,33E-07
<i>ΔparA</i>	1	4,08E+10	9,00E+07	7,73E-03	1,18E-01
	2	2,96E+10	7,00E+07	3,17E-03	3,14E-02
<i>ΔtrbM</i>	1	4,57E+10	2,10E+08	1,80E-02	2,76E-01

Mutante	Versuch No.	Zellzahl Mutante	Zellzahl Transkonjugant	Konjugationseffizienz	Relative Konjugationseffizienz
	2	4,06E+10	5,65E+08	2,56E-02	2,53E-01
ΔIS_{26}	1	8,10E+09	3,40E+08	2,92E-02	4,47E-01
	2	7,30E+09	6,30E+08	2,85E-02	2,83E-01

9.2 Wachstumskurven der restlichen Deletionsmutanten

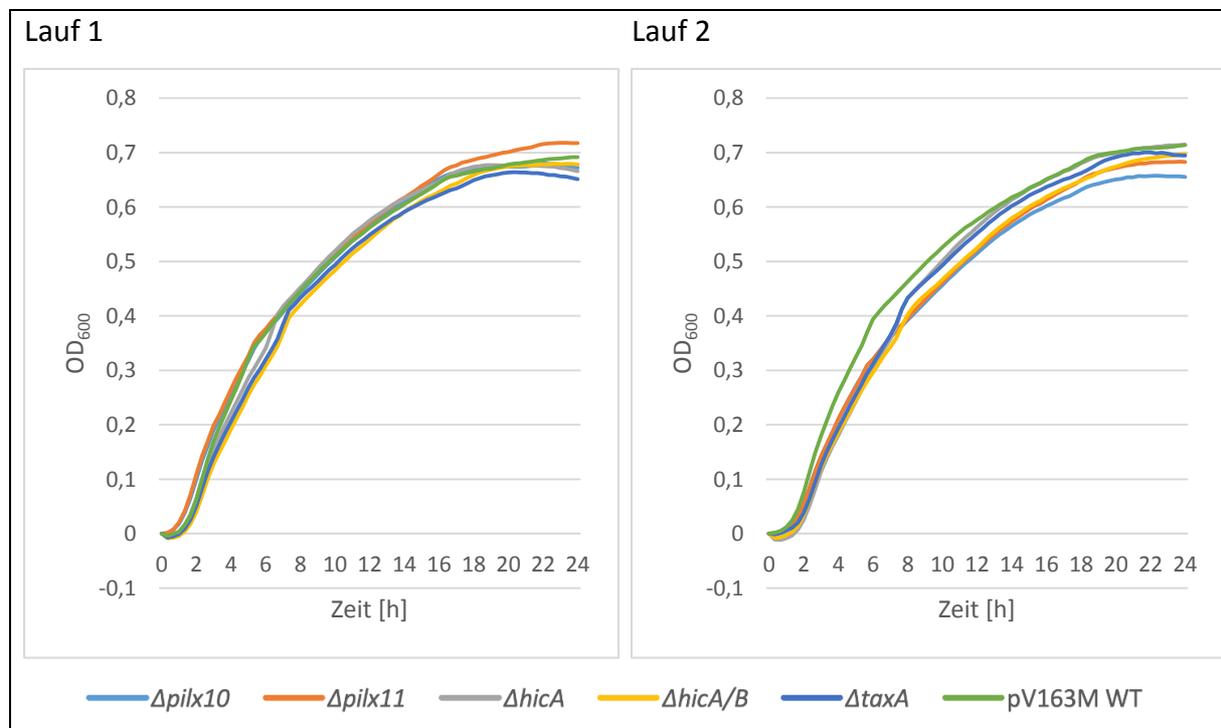


Abbildung 31 Wachstumskurven von *E. coli* DH10 β pV163M Wildtyp (WT) sowie der Deletionsmutanten $\Delta pilx10$, $\Delta pilx11$, $\Delta hica$, $\Delta hica/B$ und $\Delta taxA$

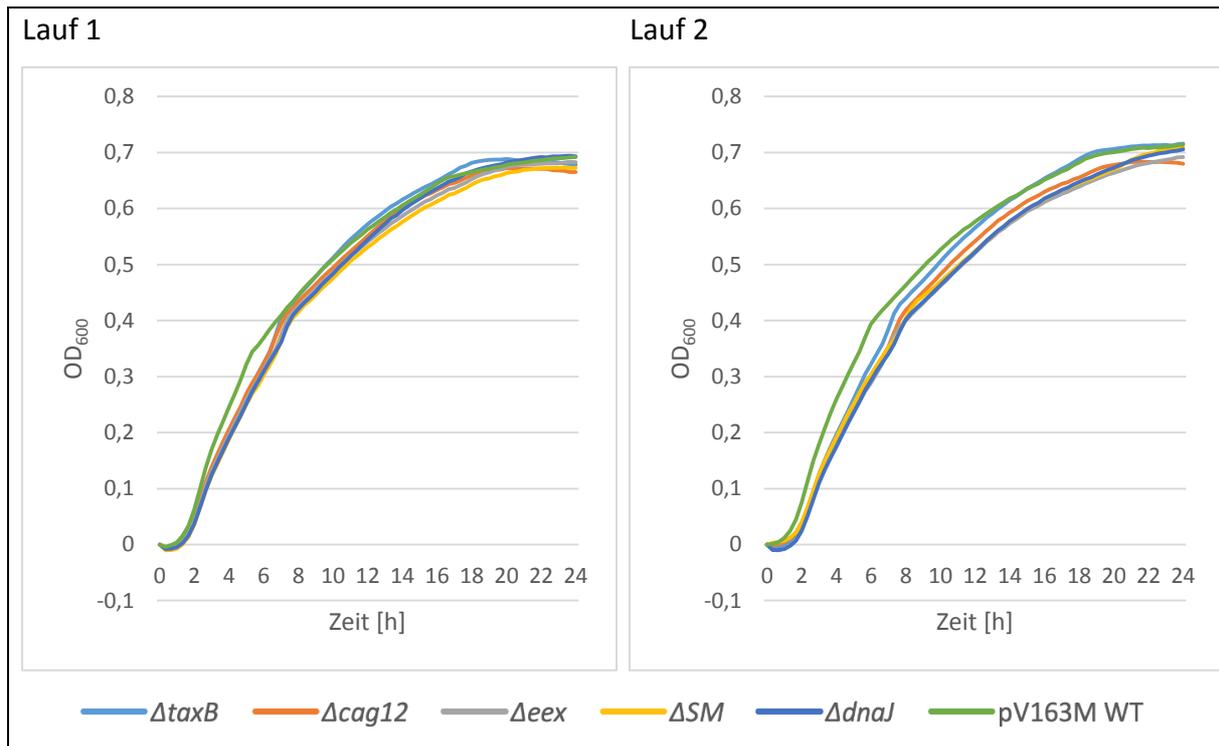


Abbildung 32 Wachstumskurven von *E. coli* DH10β pV163M Wildtyp (WT) sowie der Deletionsmutanten $\Delta taxB$, $\Delta cag12$, Δeex , ΔSM und $\Delta dnaJ$

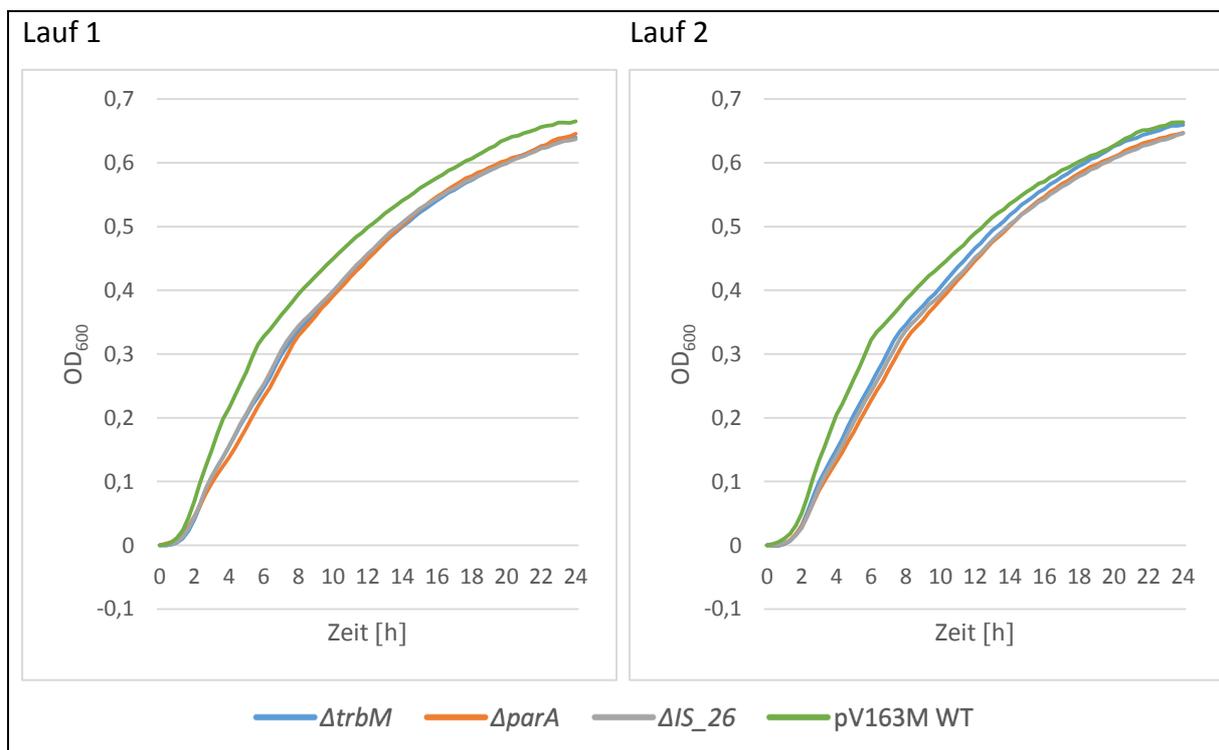


Abbildung 33 Wachstumskurven von *E. coli* DH10β pV163M Wildtyp (WT) sowie der Deletionsmutanten $\Delta trbM$, $\Delta para$ und ΔIS_26

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Wirkmechanismus von Transpeptidasen und β -Lactamasen.	3
Abbildung 2 (A) Primärstruktur von Colistin (B) Strukturformel von Colistin.	4
Abbildung 3 (A) Gram-negative Bakterienmembran mit LPS als Hauptbestandteil der äußeren Membran (B) strukturelle Bestandteile von LPS	5
Abbildung 4 Wirkung von Colistin auf die Bakterienmembran	6
Abbildung 5 Die evolutionäre Dynamik einer Plasmid-Bakterium-Assoziation	8
Abbildung 6 Plasmidkarte von pV163M	10
Abbildung 7 Plasmidkarte von pKD46	13
Abbildung 8 Die drei Komponenten des Lambda-Red-Systems: Exo, Beta, Gam	14
Abbildung 9 Plasmidkarte von pKD3	15
Abbildung 10 Mutagenese mit der Lambda-Red-Methode	16
Abbildung 11 Darstellung des pTOX1-Plasmides.....	17
Abbildung 12 Darstellung der Strategie zur Deletion von Genen über die pTOX-Mutagenese.	18
Abbildung 13 Darstellung der Funktionsweise des Aqua Clonings.	20
Abbildung 14 Chloramphenicol-Kassette cat aus pKD3	45
Abbildung 15 Gen-Austausch durch homologe Rekombination	46
Abbildung 16 Ausschnitt der verwendeten Standardtabelle	52
Abbildung 17 Ausschnitt aus einer results-Datei.....	52
Abbildung 18 Ausschnitt aus einer summary-Datei	52
Abbildung 19 Blau-Weiß-Selektion nach Deletion des <i>lacZ</i> -Gens.....	56
Abbildung 20 Relative Konjugationseffizienzen verschiedener Mutanten im Vergleich zu pV163M.....	58
Abbildung 21 Relative Konjugationseffizienzen der Mutanten der deletierten Konjugationsmaschinerie-Gene im Vergleich zu pV163M.....	59
Abbildung 22 Wachstumskurven von <i>E. coli</i> DH10 β pV163M Wildtyp (WT) sowie der Deletionsmutanten $\Delta hp20$, $\Delta hp29$, $\Delta hp30$, $\Delta hp36$ und $\Delta hp38$	60
Abbildung 23 Wachstumskurven von <i>E. coli</i> DH10 β pV163M Wildtyp (WT) sowie der Deletionsmutanten $\Delta hp45$, $\Delta hp49$, $\Delta hp52$, $\Delta pilx2$ und $\Delta pilx3-4$	61

Abbildung 24 Wachstumskurven von <i>E. coli</i> DH10 β pV163M Wildtyp (WT) sowie der Deletionsmutanten $\Delta pilx5$, $\Delta pilx6$, $\Delta pilx7$, $\Delta pilx8$ und $\Delta pilx9$	62
Abbildung 25 Plasmidkopiezahlen verschiedener Mutanten im Vergleich zu pV163M	63
Abbildung 26 Plasmidkarten von pV163M.	66
Abbildung 27 Bakterielle Wachstumskurve.....	70
Abbildung 28 Plasmidkarte von pV163M mit farblich hervorgehoben Genen, die nach ihrer Deletion Einfluss auf das Wachstum gezeigt haben	71
Abbildung 29 Plasmidkarte von pV163M mit farblich hervorgehoben Genen, die nach ihrer Deletion Einfluss auf die Konjugationseffizienz gezeigt haben.....	72
Abbildung 30 Plasmidkarte von pV163M mit farblich hervorgehoben Genen, die nach ihrer Deletion Einfluss auf die Plasmidkopiezahl gezeigt haben	74
Abbildung 31 Wachstumskurven von <i>E. coli</i> DH10 β pV163M Wildtyp (WT) sowie der Deletionsmutanten $\Delta pilx10$, $\Delta pilx11$, $\Delta hicA$, $\Delta hicA/B$ und $\Delta taxA$	88
Abbildung 32 Wachstumskurven von <i>E. coli</i> DH10 β pV163M Wildtyp (WT) sowie der Deletionsmutanten $\Delta taxB$, $\Delta cag12$, Δeex , ΔSM und $\Delta dnaJ$	89
Abbildung 33 Wachstumskurven von <i>E. coli</i> DH10 β pV163M Wildtyp (WT) sowie der Deletionsmutanten $\Delta trbM$, $\Delta parA$ und ΔIS_{26}	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Chemikalien und ihre Abkürzungen	24
Tabelle 2 Verwendete <i>E. coli</i> -Bakterienstämme sowie der jeweilige Genotyp.....	28
Tabelle 3 Informationen zu Antibiotikaresistenzen der verwendete <i>E. coli</i> -Bakterienstämme	28
Tabelle 4 Verwendete Plasmide	29
Tabelle 5 Plasmid-Mutanten von pV163M	29
Tabelle 6 Die für die Lambda-Red-Mutagenese von MG1655 verwendeten Primer	31
Tabelle 7 Die für die Lambda-Red-Mutagenese von pV163M verwendeten Oligonukleotide	32
Tabelle 8 Die zum Deletionsnachweis verwendeten Oligonukleotide	36
Tabelle 9 Die restlichen zum Deletionsnachweis verwendeten Oligonukleotide	37
Tabelle 10 Verwendete Kits	38
Tabelle 11 Verwendete Enzyme	38
Tabelle 12 Verwendete Arbeitsmaterialien.....	38
Tabelle 13 Verwendete Geräte.....	39
Tabelle 14 PCR-Ansatz (50µl) Q5® High-Fidelity-DNA-Polymerase	43
Tabelle 15 Temperaturprofil Q5® High-Fidelity-DNA-Polymerase	43
Tabelle 16 PCR-Ansatz (50µl) Taq-DNA-Polymerase	44
Tabelle 17 Temperaturprofil Taq-DNA-Polymerase	44
Tabelle 18 Vereinfachte Darstellung eines blast-Ergebnisses einer erfolgreichen Deletion ..	49
Tabelle 19 Ergebnisse der Lambda-Red-basierten Mutagenese von pV163M	57
Tabelle 20 Verdopplungsraten Versuch A	64
Tabelle 21 Verdopplungsraten Versuch B	65
Tabelle 22 Zusammenfassung der Ergebnisse zu Wachstum, Konjugation, Plasmidkopiezahl und Verdopplungsrate der Deletionsmutanten von pV163M	68
Tabelle 23 Originaldaten Konjugation	86

Abkürzungsverzeichnis

Aqua a.i.	Aqua ad iniectabilia
<i>cfu</i>	colony forming units
CGH	Comparative Genomic Hybridization
Cm	Chloramphenicol
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
ddH ₂ O	Reinstwasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	PCR Nukleotide Mix [10 mM]
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended-Spectrum Beta-Lactamasen
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
HDR	Homology-Directed Repair
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Km	Kanamycinsulfat
KV	Kristallviolett
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LPS	Lipopolysaccharid
MCS	multiple cloning site
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCTC	National Collection of Type Cultures
NGS	Next Generation Sequencing
NHEJ	Non Homologous End Joining
OD	optische Dichte
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction

PS	Polystyrol
PSK	Postsegregational Killing
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur (~ 20 °C)
TAS	Toxin/ Antitoxin-System
TRIS	TRIS Pufferan ≥99,9%
ÜNK	Übernachtskultur
WHO	World Health Organization
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

Lizenzvereinbarungen

Folgende Abbildungen dürfen entsprechend der Creative Commons Attribution License verwendet werden:

Abbildung	Lizenz
Abbildung 1: Wirkmechanismus von Transpeptidasen und Beta-Lactamasen	CC BY-NC-ND 4.0
Abbildung 2: (A) Primärstruktur von Colistin (B) Strukturformel von Colistin	CC BY 4.0
Abbildung 3: (A) Gram-negative Bakterienmembran mit LPS als Hauptbestandteil der äußeren Membran (B) strukturelle Bestandteile von LPS	CC BY 4.0
Abbildung 5: Die evolutionäre Dynamik einer Plasmid-Bakterium-Assoziation	CC-BY-NC-ND

Für die Verwendung folgender Abbildungen wurde eine Lizenz beim jeweiligen Verlag eingeholt:

Abbildung	Verlag	Lizenznummer
Abbildung 4: Wirkung von Colistin auf die Bakterienmembran	Elsevier	5443810660464
Abbildung 11: Darstellung des pTOX1-Plasmides	AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY	1314274-1
Abbildung 12: Darstellung der Strategie zur Deletion von Genen über die pTOX-Mutagenese	AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY	1314274-1

Publikationsverzeichnis

Posterbeitrag:

Comprehensive mutagenesis of a widely-occurring antibiotic resistance plasmid harbouring the mobile colistin resistance (*mcr-1*) gene. N Keitmann, **M Wille**, S Azarderakhsh, T Chakraborty, L Falgenhauer. 2022. ECCMID 2022

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Danken möchte ich in erster Linie meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Chakraborty, für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Hilfe und die vielfältige Ideengebung, die mir einen kritischen Zugang zu der Thematik der synthetischen Mikrobiologie eröffnete. Insbesondere der konstruktive Austausch und die regelmäßigen Gespräche waren eine große Hilfe für mich und haben mich stets positiv beeinflusst.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Falgenhauer für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und enorme Hilfsbereitschaft. Ihre Bemühungen, für alle Hindernisse eine Lösung zu finden, waren stets eine große Unterstützung. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Frau Gerstmann und Frau Amend danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und praktischen Ratschläge, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Auch allen nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Medizinischen Mikrobiologie Gießen danke ich für ein kollegiales und angenehmes Arbeitsumfeld.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich ganz besonders herzlich für die Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meiner Freundin Antonia für die liebevolle Ermutigung und stets tatkräftige Unterstützung.