

# Site-directed Mutagenese von epidemischen Antibiotikaresistenz-Plasmiden zum Verständnis ihrer Erfolgsstrategien

(Site-directed mutagenesis of epidemic antibiotic-resistance plasmids to understand their success strategies)

Inauguraldissertation  
eingereicht im Fachbereich Medizin  
in Erfüllung der Anforderungen  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Ph.D.  
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Maria Wille  
aus Berlin

Gießen, 2024

Aus dem Institut für Hygiene und Umweltmedizin des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. Eugen Domann

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Eugen Domann  
2. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Gabriele Bierbaum  
Weitere Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Dr. Till Schäberle  
Prof. Dr. Norbert Weißmann

Tag der Disputation: 10.06.2025

# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 Antibiotika und Resistenzen .....	2
1.2 Molekulare Resistenzmechanismen .....	3
1.3 Plasmide .....	5
1.3.1 Grundlagen .....	5
1.3.2 Replikationsmechanismen .....	6
1.3.3 Inkompatibilitätsgruppen .....	7
1.4 IncN Plasmide .....	8
1.5 IncX4 Plasmide .....	9
1.5.1 pV163M .....	10
1.6 Zielsetzung .....	11
<b>2. Material</b> .....	14
2.1 Geräteliste .....	14
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	15
2.3 Chemikalien .....	16
2.4 Nährmedien .....	17
2.5 Antibiotika .....	18
2.6 Puffer und Lösungen .....	18
2.7 Verwendete Enzyme .....	20
2.8 Bakterienstämme und Plasmide .....	20
2.9 Primer .....	22
2.9.1 IncN Plasmid .....	22
2.9.1.1 Klonierungsprimer .....	22
2.9.1.2 Kontrollprimer .....	23
2.9.1.3 Lambda-Red-Rekombinase-Primer .....	23
2.9.2 IncX4 Plasmid .....	24
2.9.2.1 Klonierungsprimer der $\Delta p9$ Mutante .....	24
2.9.2.2 Lambda-Red-Rekombinations-Primer .....	24
2.9.2.3 Site-directed Mutagenese Primer für Mutagenese von $p9$ in pUC19 .....	24
2.9.2.4 Site-directed Mutagenese Primer für Mutagenese von $p9$ in pV163M .....	25
2.9.2.5 Kontrollprimer .....	26
2.10 Verwendete Kits .....	26
<b>3. Methoden</b> .....	27
3.1 Mikrobiologische Methoden .....	27

## Inhaltsverzeichnis

3.1.1	Kultivierung der Bakterien .....	27
3.1.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien .....	27
3.1.3	Herstellung elektrokompeter Bakterien .....	27
3.1.4	Chemische Transformation.....	28
3.1.5	Elektroporation .....	28
3.2	Molekularbiologische Methoden .....	29
3.2.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	29
3.2.2	Restriktionsanalyse.....	30
3.2.3	Agarose Gelelektrophorese.....	31
3.2.3.1	Analytische Gelelektrophorese .....	31
3.2.3.2	Präparative Gelelektrophorese .....	32
3.2.4	Dephosphorylierung .....	32
3.2.5	Ligation.....	32
3.2.6	AQUA Klonierung in <i>E. coli</i> .....	33
3.2.6.1	2-Fragment Methode.....	34
3.2.7	Lambda-Red-Mutagenese.....	35
3.2.8	Site-directed Mutagenese.....	37
3.2.9	Validierung der Mutanten mittels Sanger Sequenzierung.....	38
3.2.10	Validierung der Mutanten mittels Next Generation Sequenzierung (NGS) .....	38
3.2.11	His-Tag-Protein-Aufreinigung .....	38
3.2.12	SDS-PAGE .....	39
3.2.12.1	Bradford-Assay .....	39
3.2.12.2	SDS-PAGE.....	40
3.2.12.3	Färben der Gele.....	41
3.2.12.4	Matrix unterstützte Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeit- .....	41
	Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) .....	41
3.3	Charakterisierungs-Methoden.....	42
3.3.1	Wachstumsanalyse.....	42
3.3.2	Bestimmung der Verdopplungsraten.....	42
3.3.3	Konjugationsversuche .....	44
3.3.4	Bestimmung der Plasmidkopienzahl durch Nanopore-Sequenzierung.....	45
3.4	Bioinformatische Methode.....	46
3.5	Datenauswertung.....	46
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
4.1	IncN.....	48
4.1.1	Klonierung der Hygromycin-Resistenzkassette in pKD3/pKD4 .....	50
4.1.2	Etablierung der Lambda-Red-Mutagenese .....	53
4.1.3	Lambda-Red-Mutagenese in pCF13069 .....	55

# Inhaltsverzeichnis

4.2	IncX4.....	57
4.2.1	Komplementation der pV163M $\Delta$ p9 Mutante über Klonierung von p9 in pUC19 und pACYC184.....	57
4.2.1.1	Wachstumsanalyse von pUC19::p9.....	60
4.2.1.2	Bestimmung der Verdopplungsraten.....	63
4.2.1.3	Bestimmung der Konjugationseffizienz.....	66
4.2.1.4	Untersuchung der zeitlichen Effekte von pUC19::p9 auf das Wachstum.....	67
4.2.1.5	Untersuchung der zeitlichen Effekte von pUC19::p9 auf die Konjugation.....	69
4.2.2	Klonierung eines His-tag-markierten p9 in pUC19.....	75
4.2.2.1	His-Tag-Proteinexpression von P9.....	76
4.2.3	Site-directed Mutagenese von p9 in pUC19.....	78
4.2.3.1	Wachstumsanalyse der p9 Mutanten in pUC19.....	80
4.2.3.2	Bestimmung der Verdopplungsraten.....	81
4.2.4	Site directed Mutagenese von p9 in pV163M.....	83
4.2.4.1	Wachstumsanalyse der p9 Mutanten in pV163M.....	84
4.2.4.2	Bestimmung der Verdopplungsraten.....	85
4.2.4.3	Konjugationseffizienzen der Mutanten von p9 in pV163M.....	86
4.2.4.4	Bestimmung der PlasmidKopienzahl.....	88
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>89</b>
5.1	IncN.....	89
5.1.1	Einbringen des Hygromycin-Gens in pKD3/4.....	90
5.1.2	Etablierung der Lambda-Red-Mutagenese.....	90
5.2	IncX4.....	91
5.2.1	Komplementation von p9 in pUC19 und pACYC184.....	91
5.2.1.1	Wachstumseffekt von pUC19::p9.....	92
5.2.1.2	Proteinnachweis von P9.....	92
5.2.2	Site-directed Mutagenese von p9.....	93
5.2.2.1	Wachstumsanalyse der Site-directed Mutanten.....	94
5.2.2.2	Konjugationseffizienz der Site-directed Mutanten in pV163M.....	95
5.2.3	Bestimmung der Plasmidkopienzahl.....	95
5.3	Zukunftsaussichten.....	96
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>99</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>v</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>xi</b>
<b>10.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>xvi</b>
<b>11.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>xviii</b>
<b>12.</b>	<b>Lizenzvereinbarungen.....</b>	<b>xix</b>

## Inhaltsverzeichnis

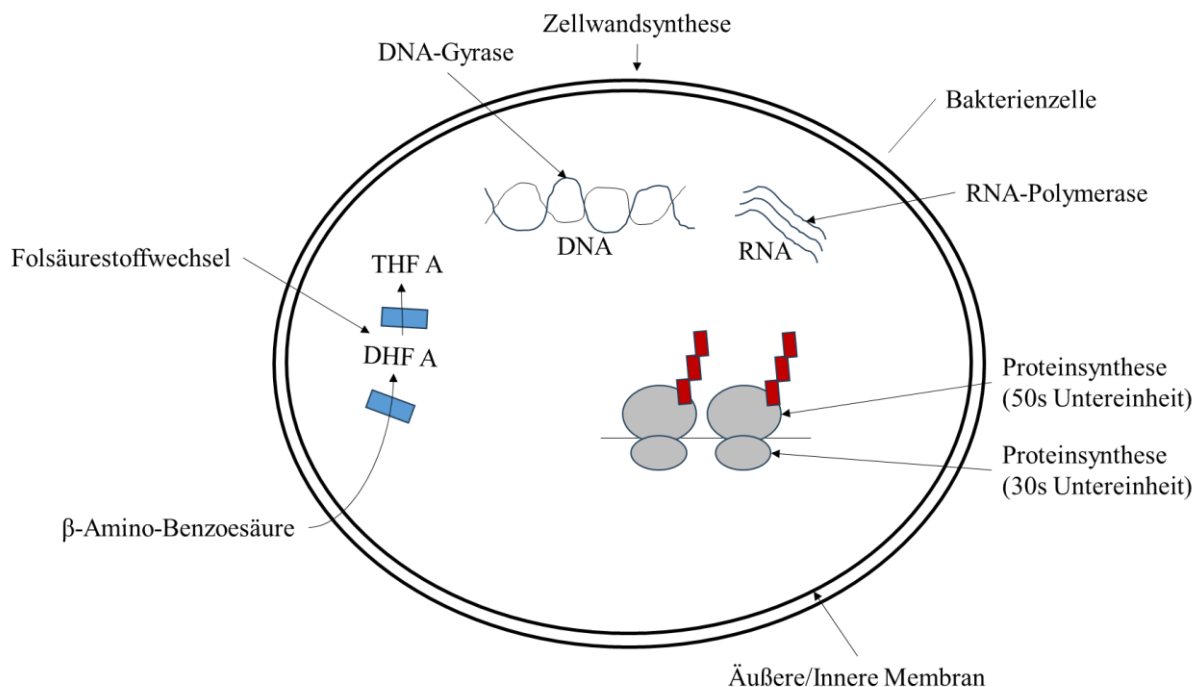
<b>13.</b>	<b>Poster und Tagungsbeiträge .....</b>	<b>xx</b>
<b>14.</b>	<b>Erklärung zur Dissertation.....</b>	<b>xxi</b>
<b>15.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>xxii</b>
<b>16.</b>	<b>tabellarischer Lebenslauf.....</b>	<b>xxiii</b>

# Einleitung

## 1. Einleitung

Als Antibiotika wird eine Untergruppe antimikrobieller Wirkstoffe bezeichnet, die das Wachstum von Bakterien hemmen, indem sie lebensnotwendige Stoffwechselwege und die Synthese von Makromolekülen blockieren (Livermore, 2003; Westphal-Settele et al., 2018). Die Bezeichnung Antibiotikum wird abgeleitet von dem Begriff Antibiose. Diese wurde von Paul Vuillemin 1899 eingeführt und bezeichnet die Beziehung von Lebewesen, die für einen der Beteiligten nachteilig ist (Köhler et al., 2001).

Die meisten Antibiotika greifen in nur wenige zelluläre Funktionen ein. Dazu gehören die Zellwandsynthese, die Proteinbiosynthese, die RNA-Replikation und -Synthese oder die Membranintegrität (Berger-Bächi, 2001) (Abb. 1).



**Abb. 1: Angriffspunkte für Antibiotika in der Bakterienzelle.**

Antibiotika sind keine neuen Substanzen, sondern gehören zur natürlichen Ökologie und dienen den Mikroorganismen dazu, sich gegen Konkurrenten durchzusetzen. Gebildet werden sie von Bodenmikroorganismen, insbesondere Bakterien und Pilzen, als natürliche Stoffwechselprodukte. Ein Beispiel dafür ist das von Pilzen hergestellte und gegen Bakterien wirksame Penicillin, das 1928 von Alexander Fleming entdeckt wurde (D'Costa et al., 2011). Seit der Einführung des Penicillins in den 1940er Jahren haben sich Antibiotika zu einem Grundpfeiler in der modernen Medizin entwickelt. Seit dieser Entdeckung werden für die industrielle Produktion von Antibiotika drei Ansätze verwendet. Natürliche Produkte werden über Gärung durch zur

## Einleitung

Produktion optimierte Mikroorganismen hergestellt. Diese natürlichen Produkte können anschließend durch chemische Modifikation zur Herstellung von semisynthetischen Antibiotika verwendet werden. Die chemische Synthese wird zur Herstellung vollsynthetischer Antibiotika verwendet (z. B. Chloramphenicol) statt (Zhgun, 2024). Antibiotika dienen als Grundlage zur Behandlung von bakteriellen Infektionen bei Menschen und Tieren (Blair et al., 2015; White, 2011). Die Behandlung dieser Infektionen wird allerdings immer schwieriger. Ein Grund dafür ist das, in den letzten Jahren vermehrte Auftreten gegen Antibiotika resistenter Erreger (Hinchliffe et al., 2017).

### 1.1 Antibiotika und Resistenzen

Unter dem Begriff Antibiotikaresistenzen werden Eigenschaften von Mikroorganismen zusammengefasst, die es ihnen ermöglichen die Wirkung von antibiotisch aktiven Substanzen abzuschwächen oder ganz zu neutralisieren. Im englischen Sprachgebrauch wird häufig der Oberbegriff Antimicrobial Resistance (AMR) verwendet (Westphal-Settele et al., 2018). Dieser umfasst neben den Antibiotikaresistenzen auch andere antimikrobielle Wirkstoffe wie Fungizide und Desinfektionsmittel (D'Costa et al., 2006). Der Gesamtverbrauch von Antibiotika lag für das Jahr 2015 bei 700 bis 800 Tonnen im Bereich der Humanmedizin. Im Vergleich dazu lagen die Abgabemengen in der Tiermedizin 2011 bei noch 1706 Tonnen und haben sich bis 2016 mehr als halbiert (742 Tonnen) (Wallmann, 2015).

Multiresistenzen bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien haben zu schwer oder gar nicht mit herkömmlichen Antibiotika behandelbaren Infektionen geführt. Da die Identifizierung der verursachenden Mikroorganismen aus Kosten- und Zeitgründen oft nicht vorgenommen wird, werden Breitbandantibiotika großzügig und meist unnötig eingesetzt. Ein weiteres Problem ist der Einsatz des Reserveantibiotikums Colistin in der Massentierhaltung. Dieses wird großzügig eingesetzt, um beispielsweise Infektionen des Magen-Darm-Traktes zu behandeln (Emmerich & Drees, 2016). Dadurch kommt es zu einem dramatischen Anstieg der Resistenzentwicklung (Frieri et al., 2017). Die Folgen dieser Entwicklung sind ein erheblicher Anstieg der Morbidität und Mortalität, aufgrund von Behandlungsfehlern, steigende Gesundheitskosten und ein überlastetes Gesundheitssystem (Aparicio-Blanco et al., 2024). In Deutschland erleiden schätzungsweise 400.000 bis 600.000 Menschen eine nosokomiale Infektion, von denen 10.000 bis 20.000 sterben. Typische Probleme sind dabei Infektionen an Operationsstellen, Harnwegsinfektionen und Lungenentzündungen (Gastmeier & Geffers, 2008). Da sich diese Zahl in den

## Einleitung

nächsten Jahren deutlich erhöhen wird, gibt es zur Bewältigung dieser globalen Herausforderung seit 2015 das „Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System“ (GLASS) (Aparicio-Blanco et al., 2024).

### 1.2 Molekulare Resistenzmechanismen

Bakterien können von sich aus gegen bestimmte Antibiotika resistent sein (=intrinsische Resistenz), aber auch durch Mutationen in den chromosomalen Genen oder durch horizontalen Gentransfer von Resistenzgenen (Blair et al., 2015). Dies sind klinisch wichtige Mechanismen und die meisten Antibiotika unterliegen mehreren von ihnen (Wright, 2011). Allgemein können vier Formen an Resistenzmechanismen unterschieden werden. Dazu gehören die Penetrationsresistenz (Veränderung der Struktur in der bakteriellen Außenmembran), die bakteriellen Efflux-Pumpen, die Veränderung der bakteriellen Zielstruktur (z. B. Modifikation der Penicillin-Binde-Proteine) und die Inaktivierung des Antibiotikums durch chemische Veränderung (Tenover, 2006; Wright, 2011) (Abb. 2).



## Einleitung

Ein Resistenz-Mechanismus von Gram-negativen Bakterien sind die Efflux-Pumpen, die die Antibiotika aktiv aus den Zellen der Bakterien heraustransportieren. Einige von ihnen besitzen eine enge Substratspezifität, andere transportieren eine große Auswahl von strukturell verschiedenen Substraten und werden auch als „multidrug resistant“ (MDR) Efflux-Pumpen bezeichnet (Blair et al., 2015; Wright, 2011). Ein weiterer Mechanismus ist der molekulare Bypassmechanismus, bei dem das Antibiotikum durch alternative Stoffwechselwege oder inhibierte Enzyme durch neue, aber wirkungsgleiche mit fehlender Affinität zum Antibiotikum ersetzt werden (Krey, 2004). Die Veränderung des molekularen Ziels entsteht häufig durch Punktmutationen in einzelnen Genen. Ein Beispiel dafür ist die Mutation an *gyrA*, welches ein Mitglied der Typ II Topoisomerasen ist, die für die DNA-Superwindung an Replikationsgabeln verantwortlich ist (Wright, 2011).

Ein weiterer Mechanismus ist die chemische Modifikation. Diese wird von Bakterien genutzt, um vor allem Beta-Laktam Antibiotika unschädlich zu machen. Dabei wird von Beta-Laktamasen der Beta-Laktam-Ring hydrolysiert (Bush & Jacoby, 2010). Beispiele dafür sind Extended Spectrum Beta-Laktamasen (ESBL) und Carbapenemasen (Wright, 2011). Eine besondere klinische Bedeutung hat dabei vor allem die horizontale Übertragung dieser Resistenzgene, die auf Plasmiden lokalisiert sind.

### 1.3 Plasmide

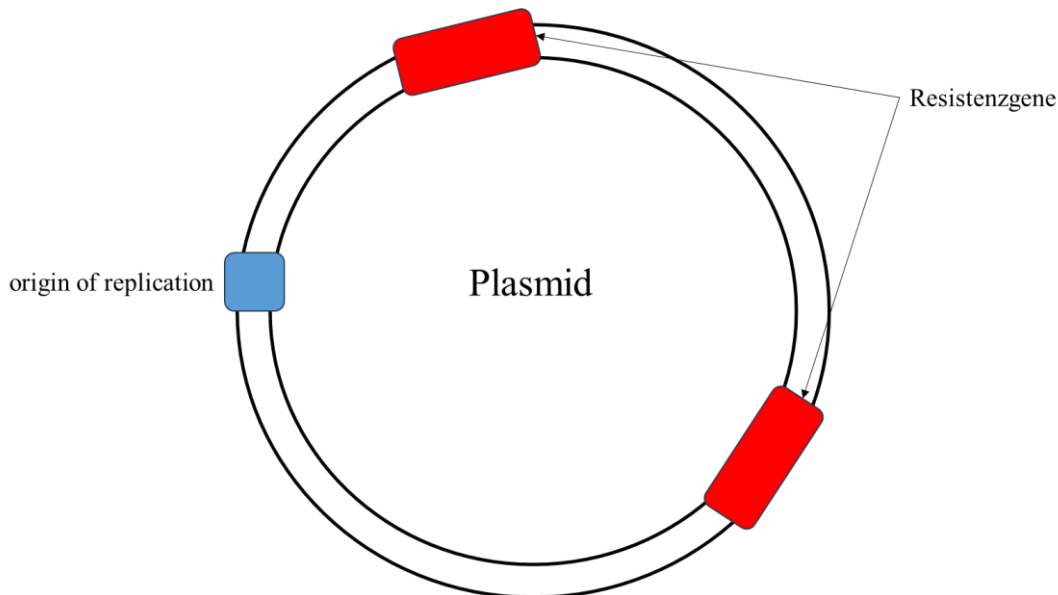
Joshua Lederberg schlug den Begriff „Plasmid“ 1952 für außerkernige Strukturen vor, die in der Lage sind, sich in einem autonomen Zustand zu reproduzieren (Helinski, 2004). Bereits in den 1940er und 1950er Jahren entdeckte er in Studien zur Rekombination in *Escherichia coli* (*E. coli*) K12, dass die Übertragung von genetischen Informationen durch Konjugation unidirektional erfolgt. Eine Bedeutung fanden Plasmide erst in den 1950er und 1960er Jahren, als herausgefunden wurde, dass diese für die Verbreitung von Mehrfachresistenzen gegen Antibiotika verantwortlich sind (Summers, 1997).

#### 1.3.1 Grundlagen

Plasmide sind extrachromosomale, meist zirkuläre und doppelsträngige genetische Elemente, die sich unabhängig vom bakteriellen Chromosom replizieren können. Die Größe reicht von 800 bp bis 300 Kilobasen (kb) (Schaufler, 2017). Sie kommen hauptsächlich in Bakterien vor, können aber auch in Archaeen und Eukaryonten, wie Hefe und Pflanzen natürlich vorkommen.

## Einleitung

Plasmide tragen meist für den Wirt keine lebensnotwendigen Gene (*Housekeeping-Gene*), sondern kodieren eher solche, die an der Entgiftung, ökologischen Interaktion, Virulenz und Resistenz gegen Antibiotika beteiligt sind (Smillie et al., 2010; Summers, 1997). Sie enthalten außerdem einen Abschnitt, der als Replikationsursprung dient und als origin of replication (ORI) bezeichnet wird (Summers, 1997) (Abb. 3).



**Abb. 3: Allgemeiner Aufbau eines Plasmids.** Plasmide tragen meist Gene, die für ihren Wirt nicht lebensnotwendig sind und beginnen ihre Replikation am origin of replication (ORI).

Viele natürliche Plasmide werden innerhalb der wachsenden Bakterienpopulation stabil in ihrer charakteristischen Kopienzahl gehalten, wodurch ihre Konzentration kontrolliert, und die Replikationsrate reguliert wird. Plasmide können über einen Prozess der horizontalen Übertragung, der Konjugation, zwischen Bakterien identischer oder verschiedener Gattungen weitergegeben werden. Bei diesem Prozess wird eine Kopie der DNA von einer Spenderzelle auf eine Empfängerzelle übertragen (Carattoli, 2011).

### 1.3.2 Replikationsmechanismen

Es gibt drei allgemeine Replikationsmechanismen für zirkuläre Plasmide. Dazu gehören die Theta-Replikation, die Strangverschiebung und der Rolling Circle (RC) (Del Solar et al., 1998). Die Theta-Replikation kann von mehreren Ursprüngen ausgehen und in vier Klassen eingeteilt werden. Während Klasse A zur Einleitung der Replikation auf Rep-Proteine angewiesen ist, ist Klasse B für das Trennen der Doppelstränge und der Primersynthese auf Wirtsfaktoren angewiesen. Die Klassen C und D besitzen hybride Merkmale der Klassen A und B (Lilly & Camps, 2015). Die Replikation kann allgemein uni- oder bidirektional erfolgen und umfasst das

## Einleitung

Schmelzen der Elternstränge sowie der Synthese einer Primer-RNA (pRNA). Die DNA-Synthese erfolgt anschließend kontinuierlich auf einem der Stränge (führender Strang) und diskontinuierlich auf dem anderen Strang (nachlaufender Strang).

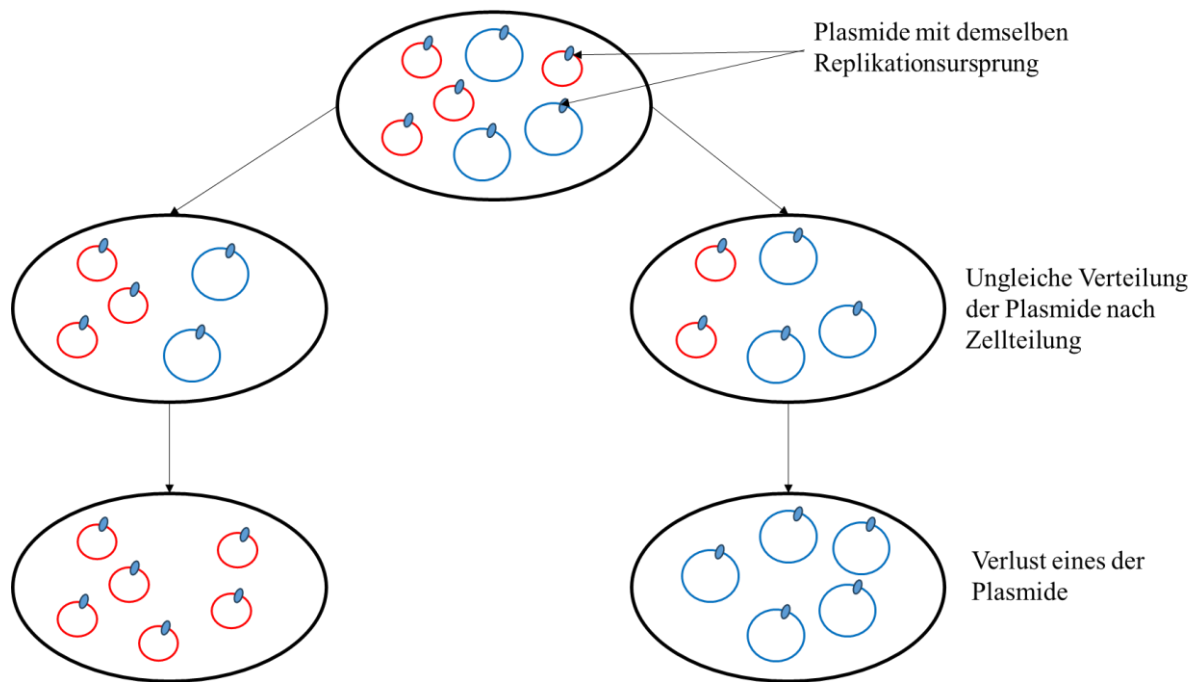
Bei der Strangverschiebung wird der DNA-Duplex durch die Bindung eines Rep-Proteins geschmolzen, wodurch Haarnadeln entstehen. Die Basis dieser Haarnadel wird von RepB erkannt, welches die Synthese eines RNA-Primers einleitet. Es erfolgt anschließend die Verlängerung des 3'OH-Endes. Für jede Syntheserichtung bilden sich jeweils eine D-Schleife, da die elterlichen Stränge verdrängt werden und sich voneinander lösen. Zurück bleiben zwei doppelsträngige DNA-Stränge (Lilly & Camps, 2015).

Die RC Replikation muss unidirektional erfolgen, weil die Synthese des führenden und des nachlaufenden Strangs entkoppelt stattfindet (Del Solar et al., 1998). Die RC-Initiierung umgeht die Synthese einer Primer-RNA, da diese durch einen DNA-Bruch in einem der elterlichen Stränge ein 3'OH-Ende erzeugt, dem die Wirts-DNA-Polymerase als Startstelle dient. Die Verlängerung dieses führenden Strangs erfolgt, wenn die elterliche Doppelhelix von einer Wirts-DNA-Helikase abgewickelt wird (Ruiz-Masó et al., 2015).

### 1.3.3 Inkompatibilitätsgruppen

Damit Plasmide auf der Grundlage ihrer phylogenetischen Verwandtschaft in homogenen Gruppen erkannt und kategorisiert werden können, wurde 1971 von Datta und Hedges ein Klassifizierungsschema vorgeschlagen, das als Plasmid-Inkompatibilität bezeichnet wird und definiert ist als die Unfähigkeit zweier Plasmide derselben Inkompatibilitätsgruppe (Inc-Gruppen) in derselben Bakterienzelle ohne selektiven Druck zu existieren (Carattoli, 2011; Datta & Hedges, 1971). So sind Plasmide mit demselben Replikon inkompatibel, da sie um dieselbe Replikationsmaschinerie in der Zelle konkurrieren (Novick, 1987) (Abb. 4).

## Einleitung



**Abb. 4: Inkompatibilität zweier Plasmide mit demselben Replikon.** Die Kopienzahl wird vom Plasmid selbst nach der Zellteilung reguliert. Im Verlauf mehrerer Teilungen kommt es zu einer ungleichen Verteilung der Plasmide und anschließend zum Verlust. Abbildung übernommen und geändert aus *Molecular Genetics of Bacteria* (Snyder & Champness, 1997).

Im Jahr 2009 waren 27 Inc-Gruppen in *Enterobacteriaceae* von der Plasmid Abteilung der National Collection of Type Cultures (London) anerkannt. Die wichtigsten von ihnen sind die Plasmid-Familien HI2, HI1, I1-y, X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A/C, T, K, B/O (Carattoli, 2009). Die Modell-Plasmide, die für diese Arbeit verwendet wurden, gehören zu den Inc-Gruppen N und X.

### 1.4 IncN Plasmide

Plasmide, die zur Inkompatibilitätsgruppe N gehören haben ein breites Wirtsspektrum, sie konjugieren mit hoher Frequenz und werden stabil in der bakteriellen Wirtszelle gehalten (Dolejska et al., 2013). Sie gehören außerdem zu den am häufigsten vorkommenden Resistenz-Plasmiden in *Enterobacteriaceae*, zu denen beispielsweise *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* oder *Escherichia coli* (*E. coli*) zählen (Eikmeyer et al., 2012; García-Fernández et al., 2011). Nachweise wurden sowohl in klinischen Isolaten als auch in tierassoziierten Umgebungen wie Ställen oder Schlachthöfen weltweit (z. B. USA, China, Deutschland, Brasilien) erbracht (Eikmeyer et al., 2012). Damit ist eine potenzielle Verbreitung über die Nahrungskette möglich. Ein großes Problem ist, dass IncN Plasmide eine Vielzahl von Antibiotikaresistenzgenen kodieren, zu denen Extended-Spektrum-Beta-Laktamasen (ESBL), AmpC-Beta-Laktamasen oder Carbapenemasen gehören (García-Fernández et al., 2011). Beta-Laktamasen sind Enzyme, die

## Einleitung

Beta-Laktam-Antibiotika, wie Penicilline, Cephalosporine, Monobactame und Carbapeneme hydrolytisch inaktivieren (Jeon et al., 2015). Carbapeneme gehören zu den Reserveantibiotika und werden zur Behandlung nosokomialer Infektionen eingesetzt (Nordmann et al., 2012).

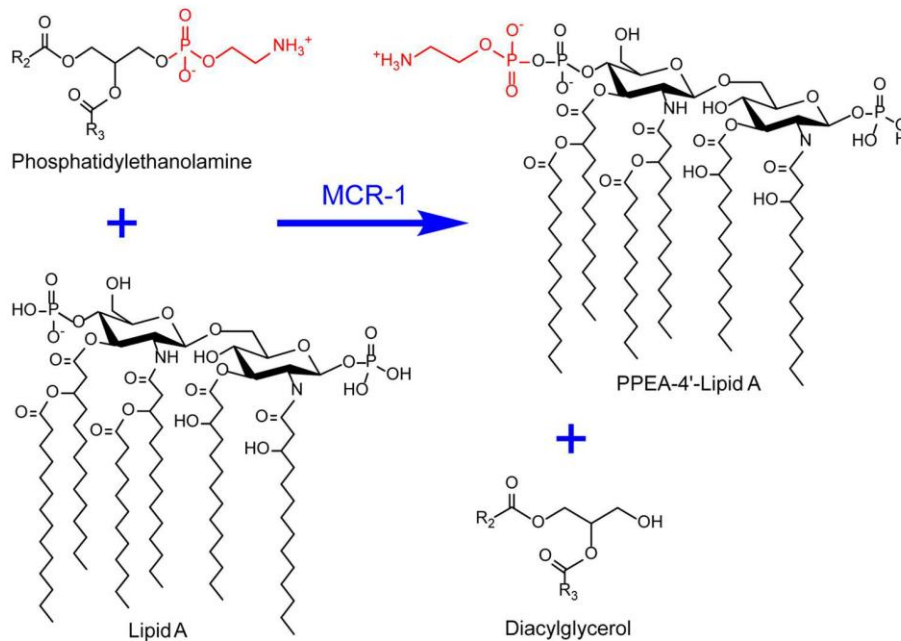
Beta-Laktamasen werden nach Ambler in verschiedenen Schemata klassifiziert. Bei den Klassen A, C und D handelt es sich um ein Serin basiertes Enzym, bei dem ein konserviertes Serin im aktiven Zentrum als Nukleophil für den Angriff auf die C-N Bindung des Beta-Laktams agiert. Die Klasse B ist eine Metallo-Beta-Laktamase, die auf ein Wassermolekül angewiesen ist, das über ein zweiwertiges Kation koordiniert ist, um den Beta-Laktam Ring zu aktivieren und daraufhin zu spalten (Jeon et al., 2015; Lutgring & Limbago, 2016).

### 1.5 IncX4 Plasmide

Die ersten IncX-Plasmide wurden aus *Enterobacteriaceae* isoliert, die aus der Zeit vor der Antibiotikagabe stammen. Es sind Iteron-haltige Plasmide, die den Theta-Replikationsmechanismus verwenden und zwischen verschiedenen Arten von *Enterobacteriaceae* übertragen werden können (Bielak, 2012; Sun et al., 2017). Sie besitzen Gene für die Replikation (*pir*), der Pilus-synthese- und -montage (*mpf*) und für die konjugative Funktion (*taxAB*) (Bielak, 2012). Die Plasmide der IncX- Gruppe lassen sich in sechs Untergruppen (IncX1-Inx6) einteilen. Davon ist IncX4 einer der am weitesten verbreiteten Plasmidtypen in *E. coli* (7,6% bis 34%) (Sun et al., 2017). Einer der Hauptunterschiede von IncX4 zu den anderen IncX-Plasmiden besteht in der Orientierung der Resolvase. Diese ist in IncX4 in entgegengesetzter Richtung orientiert wie das *pir*-Gen, in anderen IncX-Plasmiden ist sie in gleicher Richtung orientiert (Johnson et al., 2012).

Frühere Studien haben gezeigt, dass Plasmide der IncX4-Gruppe für die Verbreitung des *mcr-1* (*mobile colistin resistance 1*) Gens verantwortlich sind. Dieses wurde im November 2015 von Liu et al. in einem *E. coli* Isolat vom Schwein aus einem kommerziellen Betrieb entdeckt, in dem die Prävalenz der Colistin-Resistenz unter den von Schweinen stammenden *E. coli* Isolaten über 50% betrug (Liu et al., 2016; Wu et al., 2018). MCR-1 ist ein Lipid A modifizierendes Enzym, das eine Resistenz gegen Colistin verleiht (Liu et al., 2016). Dieses gehört ebenfalls zu den Reserveantibiotika (Wu et al., 2018). MCR-1 gehört zur Familie der Phosphoethanolamin-Lipid A (PEA)-Transferasen und besitzt putative konservierte Teile, die erforderlich sind für seine katalytische Aktivität. Es katalysiert den Transfer von Phosphoethanolamin auf ein Phosphat der N-Acetylglucosamin-Kopfgruppe von Lipid A in der bakteriellen Außenmembran (Gao et al., 2016) (Abb. 5).

## Einleitung



**Abb. 5: Chemischer Mechanismus für die MCR-1 katalysierende Reaktion in *E. coli*.** MCR-1 katalysiert die Reaktion zur Erzeugung von PPEA-4'-Lipid A aus Lipid A plus Phosphatidylethanolamin, bei dem auch Diacylglycerol ein Endprodukt ist. Die Abbildung wurde mit Erlaubnis aus „Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance“ entnommen (Gao et al., 2016).

Weitere Plasmide, die das *mcr-1* Gen tragen gehören den Inkompatibilitätsgruppen IncI2 und IncIH2 an (Wu et al., 2018). In der Datenbank des Instituts für Medizinische Mikrobiologie in Gießen wurde in mehreren *E. coli*-Stämmen ebenfalls *mcr-1* kodierende Plasmide nachgewiesen (Falgenhauer et al., 2016). Dazu gehört auch das in dieser Arbeit untersuchte Modell-Plasmid pV163M (MF381176, Genbank) (Keitmann, 2023).

### 1.5.1 pV163M

Das Plasmid pV163M wurde 2016 entdeckt und aus dem *E. coli*-Isolat V163 vom Schwein isoliert (Falgenhauer et al., 2016). Es gehört zur Gruppe der IncX4 Plasmide und ist ein 36,5 Kilobasen (kb) großes konjugatives Plasmid (Keitmann, 2023). Konjugative Plasmide sind in der Lage, sich von einer bakteriellen Zelle auf eine andere zu übertragen. Diese Übertragung ist auch Spezies-übergreifend möglich (Schumann, 1990). Sie kommen außerdem in niedriger Kopienzahl in der Bakterienzelle vor.

Auf dem Plasmid pV163M sind insgesamt 52 Gene lokalisiert, von denen 22 zwar annotierte Gene sind, jedoch eine noch unbekannte bzw. potentielle Funktion haben (Keitmann, 2023) (Abb. 6).



## Einleitung

auf Plasmiden lokalisiert, die von einem Bakterium auf ein anderes übertragen werden können. Besondere Beispiele sind Plasmide der IncX4- und IncN-Gruppe. Während Plasmide der IncN-Gruppe häufig an der Verbreitung von Carbapenemasen beteiligt sind, ist auf dem Plasmid der IncX4-Gruppe das mobile Colistin-Resistenzgen *mcr-1* lokalisiert. Da beide Plasmide sehr erfolgreich und weit verbreitet sind, sollen in dieser Arbeit Gene identifiziert und untersucht werden, die den Plasmiden diese Ausbreitung ermöglichen und den Bakterien somit einen Vorteil verschaffen können. Um diese Hypothese beweisen oder widerlegen zu können, werden Deletions-Mutanten von Modell Plasmiden beider Inkompatibilitätsgruppen (IncN=pCF13069; IncX4=pV163M) erstellt. Beide Plasmide wurden zuvor vollständig sequenziert.

Die Herstellung der Deletions-Mutanten erfolgt mittels des Lambda-Red-Mutagenese Systems. Das Mutageneseprotokoll wurde für pV163M erstellt und etabliert, jedoch nicht für pCF13069. Um das System auch an dem Modell-Plasmid pCF13069 anwenden zu können, muss, aufgrund seiner vielen Resistenzen, zunächst ein geeignetes Selektionsantibiotikum bestimmt werden. Anschließend können Resistenzen gegen die gewählten Selektionsantibiotika auf die Plasmide pKD3/4, welche dazu dienen die Mutation ins Genom einzuführen, umklontiert werden. Im Anschluss werden Bereiche auf pCF13069 ausgewählt, die deletiert werden sollen. Die Mutanten werden anschließend mit verschiedenen Charakterisierungsmethoden analysiert. Zu diesen Methoden gehören eine Analyse des Wachstumsverhalten, die Bestimmung der Konjugationseffizienz und Antibiotikaresistenztestungen. Die Deletions-Mutanten werden dabei mit dem Wildtyp (WT) auf signifikante Unterschiede verglichen.

Bei dem Modell-Plasmid pV163M wurden Deletions-Mutanten in früheren Arbeiten bereits erzeugt und die Fähigkeit der einzelnen Mutanten zur Konjugation untersucht (Azarderakhsh, 2017 (unv. Masterarbeit); Keitmann, 2023). Auch die bakterielle Fitness wurde untersucht.

In dieser Arbeit werden weitere Untersuchungen an einer ausgewählten Mutante, die Unterschiede zum WT zeigte, durchgeführt. Dafür wird zunächst die Mutante komplementiert. Die Untersuchung der erfolgreichen Komplementation erfolgt mittels Wachstumsanalysen und auf Proteinebene. Weiterhin wird durch eine *In silico* Analyse die Proteinsequenz des mutierten Gens in verschiedenen Datenbanken analysiert, um Bereiche für eine Site-directed Mutagenese finden zu können. Diese soll zunächst in der Komplementante und anschließend im Modell-Plasmid pV163M selbst durchgeführt werden. Die Site-directed Mutanten werden danach ebenfalls mit verschiedenen Methoden untersucht. Dazu gehören die Überprüfung der bakteriellen Fitness im Vergleich aller Mutanten und des WT. Weiterhin soll die Konjugationseffizienz überprüft und die Bestimmung der Kopienzahl durchgeführt werden.

## Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit ist es sagen zu können, ob die deletierten Bereiche bzw. das untersuchte Protein einen Einfluss auf die bakterielle Fitness nehmen und diese in weiteren Untersuchungen als neue drug targets verwendet werden können, zur Entwicklung neuer Antibiotika auf Plasmid-Ebene.

## 2. Material

### 2.1 Geräteliste

Tab. 1: Auflistung aller verwendeten Geräte mit Herstellerangaben.

Gerät	Hersteller
8- Kanalpipette (Research Plus, 300 µL, 1000 µL)	Eppendorf SE
Agarose-Gelkammern für große (Sub-Cell GT Cell) und kleine Gele (Mini-Sub Cell GT Cell)	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Autoklaviergerät (Systec 2540 EL)	TuttnauerSystec GmbH & Co. KG
Bunsenbrenner (schuett phoenix II eco)	schuett-biotec GmbH
Einkanalpipette (Research plus, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Eppendorf SE
Elektrophoresekammer für SDS-Page (Mini-PROTEAN® Tetra Cell)	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Elektroporator (MicroPulser)	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Feinwaage 770	Kern & Sohn
Gefrierschrank -80°C (Ultra Freezer TSX60086V)	Thermo Fisher Scientific
Geldokumentations-Gerät (ChemiDoc XRS+)	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Heizblock (Digital D1302 - 2 Blöcke)	Labnet
HulaMixer (Thermo Fischer Rührchenrotator)	Thermo Fisher Scientific
Inkubator groß (Heratherm General Protocol Mod. 100)	Thermo Fisher Scientific
Klein-Sequenziergerät (MinION MK1B)	Oxford Nanopore Technologies
LED Transilluminator (FastGene Blue/Green LED Transilluminator DE)	NIPPON Genetics EUROPE GmbH
Magnetrührer (AREX)	VELP Scientifica Srl
Magnetständer (Invitrogen™ DynaMag™-2)	Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplatten-Lesegerät (CM Infinite Mono 200)	Tecan Group AG
Mini-Inkubator (LLG-uniINCU 20)	Lab Logistics Group GmbH
Photometer zur DNA-Konzentrationsmessung (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer)	Thermo Fisher Scientific
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH
Pipettierhilfe (Pipetboy Acu 2)	INTEGRA Biosciences AG
Präzisionswaage (Traveler TA3001)	Ohaus Corporation
Reinstwasseranlage	Thermo Fisher Scientific
Schüttelinkubator (KS 4000i control)	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Sicherheitswerkbank (MSC Advantage 1.8)	Thermo Fisher Scientific
Spannungsquelle (PowerPac Basic Power Supply)	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Thermocycler (labcyclus Gradient Thermoblock 96)	SensoQuest GmbH
Tisch-Sequenziergerät I (MiSeq)	Illumina

## Material

Gerät	Hersteller
Tisch-Sequenziergerät II (NextSeq 500)	Illumina
UV/Visible Spektralphotometer (P4 VIS)	VWR International
Vakuumpumpe (N840.3 FT.18)	KNF
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, Inc.
Wasserbad (OLS Aqua Pro Shaking Water Bath)	Grant Instruments (Cambridge) Ltd.
Zentrifugen	
➔ Mikrozentrifuge I (MiniStar)	VWR International
➔ Mikrozentrifuge II (FRESCO 21)	Thermo Fisher Scientific
➔ Große Zentrifuge (Super T21)	Thermo Fisher Scientific

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2: Auflistung aller verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben.**

Material	Hersteller
96-well Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific
Einmalkanülen	B. Braun Melsungen
Einmalspritzen	B. Braun Melsungen
Elektroporationsküvetten (1mm Spaltbreite)	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Filter Pipettenspitzen	nerbe plus GmbH & Co. KG
Impfösen blau	SARSTEDT AG & Co. KG
Kryoröhrchen	VWR International
Küvetten	SARSTEDT AG & Co. KG
Mikro Schraubröhrchen 1,5 mL	SARSTEDT AG & Co. KG
Mini-Protean TGX Gels (Fertig-SDS-Gele)	Bio-Rad Laboratories, Inc.
MinIon flow cell (R9.4.1), MIN106D	Oxford Nanopore Technologies
Nitrilhandschuhe	Ansell
Papiertücher (fusselfrei)	Essity GmbH
Parafilm	Merck KGaA
PCR-Röhrchen (200 µL)	Thermo Fisher Scientific
Petrischalen (92 x 16 mm, mit Lüftungsnocken)	SARSTEDT AG & Co. KG
Pipettenspitzen	Starlab International GmbH, SARSTEDT AG & Co. KG
Reaktionsgefäße (1,5 mL und 2 mL)	SARSTEDT AG & Co. KG
Reaktionsgefäße (14 mL, 15 mL und 50 mL)	Greiner AG
Sterilfilter (0,22 µm Porengröße)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Sterilfilter 0,5 L (0,22 µm Porengröße)	TPP Techno Plastic Products AG

## Material

### 2.3 Chemikalien

**Tab. 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Abkürzung und Herstellerangaben.**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Abkürzung</b>
1 kb DNA Ladder	New England BioLabs	
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid	Carl Roth GmbH & Co. KG	X-Gal
5X Q5 Reaction Buffer	New England BioLabs	
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG	
Agarose	VWR International	
Ambion Nuclease Free Water	Thermo Fisher Scientific	
AmPure XP	Beckman Coulter GmbH	
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen	Aqua a.i.
BenchMark™ His-tagged Protein standard	Thermo Fisher Scientific	
Benzonase® Nuclease (purity $\geq 99\%$ )	Merck KGaA	
Borsäure	VWR International	
Calciumchlorid Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG	CaCl <sub>2</sub>
Coomassie G-250 Stain	Bio-Rad Laboratories, Inc.	
Deoxynucleotide Solution Mix (10 mM)	New England BioLabs	dNTP's
Essigsäure	Merck KGaA	
Ethylendiamintetraessigsäure	VWR International	EDTA
Ethanol 100%	Sigma-Aldrich GmbH	
Gel Loading Dye, Purple (6x)	New England BioLabs	
GelRed® Nucleic Acid Gel Stain 10x in Water	Biotium, Inc.	
Glycerol bidistilled 99,5 %	VWR International	
InVision™ His- Tag In- Gel Stain	Thermo Fisher Scientific	
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid		IPTG
Kaliumacetat	VWR International	KAc
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG	KCl
L(+)-Arabinose	Carl Roth GmbH & Co. KG	
Laemmli 2x Concentrate, Sample Buffer	Sigma-Aldrich GmbH	
LB-Medium (Luria/Miller) Pulver	Carl Roth GmbH & Co. KG	
Lysozym	Roche Holding	
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG	MgCl <sub>2</sub>
Mangan(II)-chlorid, Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG	MnCl <sub>2</sub>
Müller-Hinton-Bouillon Pulver	Carl Roth GmbH & Co. KG	MHB-Medium
Natriumchlorid	VWR International	NaCl
Natriumhydroxid	VWR International	NaOH
Natriumphosphat, monobasisch 99%	Merck KGaA	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
N,N-Dimethylformamid	Carl Roth GmbH & Co. KG	DMF

## Material

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Abkürzung</b>
Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards	Bio-Rad Laboratories, Inc.	
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG	HCl
SOC-Medium	New England BioLabs	
Sodium-Dodecyl-Sulfate		SDS
Quick Start Bovine Serum Albumin Standard Set	Bio-Rad Laboratories, Inc.	
Quick Start Bradford 1x Dye Reagent	Bio-Rad Laboratories, Inc.	
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	VWR International	TRIS
Tween® 20	SERVA Electrophoresis GmbH	
Deionisiertes Wasser	hauseigen	VE-H <sub>2</sub> O
Reinstwasser	hauseigen	ddH <sub>2</sub> O

Deionisiertes Wasser (VE-H<sub>2</sub>O) wurde für alle Kulturmedien verwendet. Für molekularbiologische Arbeiten wurde autoklaviertes und sterilfiltriertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) oder das Aqua a.i verwendet.

### 2.4 Nährmedien

Das LB-Medium wurde für die Anzucht der Bakterien und das MHB-Medium für Colistin-Resistenzmessungen verwendet. Das in Wasser gelöste Medium wurde bei 121°C für 15 Minuten (min) autoklaviert. Dem Festmedium wurden vor dem Autoklavieren 1,5% Agar hinzugegeben. Nachdem das Festmedium auf ca. 50°C abgekühlt ist, erfolgte die Zugabe des Antibiotikums. Anschließend wurden etwa 25 mL dieser Lösung in Petrischalen gegossen.

Zur Herstellung der Platten für die Blau-Weiß Selektion wurden dem LB-Agar neben Antibiotika auch IPTG und X-Gal in den entsprechenden Konzentrationen hinzugegeben (Tab. 4).

**Tab. 4: Angaben der verwendeten Konzentrationen von X-Gal und IPTG.**

	<b>Stocklösung</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Endkonzentration</b>
X-Gal	100 mg/mL	DMF	30 µg/mL
IPTG	0,5 M	Aqua a.i.	0,1 mM

## 2.5 Antibiotika

**Tab. 5: Auflistung der verwendeten Antibiotika in den Nährmedien.** Das Antibiotikum ist mit seiner Stock- und working Konzentration sowie der verwendeten Abkürzung und Hersteller angegeben.

<b>Antibiotikum</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Abkürzung</b>
Ampicillin	Stock: 100 mg/mL	Carl Roth GmbH &	Ap
	work: 100 µg/mL	Co. KG	
Cefotaxim	Stock: 50 mg/mL	Fresenius Kabi	CTX
	work: 2 µg/mL	Deutschland GmbH	
Chloramphenicol	Stock: 34 mg/mL	Carl Roth GmbH &	Cm
	work: 34 µg/mL	Co. KG	
Colistin	Stock: 50 mg/mL	Sigma-Aldrich GmbH	Col
	work: 1-2 µg/mL	Carl Roth GmbH &	
Hygromycin B	Stock: 50 mg/mL	Carl Roth GmbH &	Hyg
	work: 200 µg/mL	Co. KG	
Kanamycin	Stock: 50 mg/mL	Carl Roth GmbH &	Km
	work: 50 µg/mL	Co. KG	
Natriumazid	Stock: 50 mg/mL	Carl Roth GmbH &	NaZ
	work: 200 µg/mL	Co. KG	
Tetrazyklin	Stock: 10 mg/mL	Carl Roth GmbH &	Tet
	work: 10 µg/mL	Co. KG	

Ampicillin, Cefotaxim, Colistin, Kanamycin und Natriumazid wurden in sterilfiltriertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) gelöst. Chloramphenicol und Tetrazyklin wurden in Ethanol (EtOH) gelöst. Alle Antibiotika wurden sterilfiltriert und bei -20°C bzw. 4°C gelagert.

## 2.6 Puffer und Lösungen

Die Angaben beziehen sich auf 1 L bzw. 1 mL (Tab. 6). Die Puffer und Lösungen wurden autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

**Tab. 6: Angaben der Komponenten der verwendeten Puffer.**

<b>Puffer</b>	<b>Komponenten</b>
10x TBE (TRIS-Borat-EDTA)-Puffer für Agarose-Gelelektrophorese	108 g TRIS (890 mM) 20 mL EDTA (20 mM) 55 g Borsäure (890 mM) pH 8,0 ad 1 L ddH <sub>2</sub> O
10x Tris/Glycine/SDS Electrophoreses Buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc.) für SDS-Gel-Elektrophorese	3,03 g Tris (25 mM) 14,4 g Glycine (192 mM) 0,1% SDS pH 8,3 ad 1 L ddH <sub>2</sub> O

## Material

Puffer	Komponenten
10% Glycerin (zur Herstellung elektrokompeter Zellen)	100 mL Glycerol $\geq$ 99,5% ad 1 L ddH <sub>2</sub> O + autoklavieren
CCMB80 Transformations-Puffer (zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen)	11,76 g CaCl <sub>2</sub> (80 mM) 3,96 g MnCl <sub>2</sub> (20 mM) 2,03 g MgCl <sub>2</sub> (10 mM) 10 mL KAc (10 mM) 10% Glycerol Magnesiumchlorid und Mangan(II)-chlorid werden zunächst in 800 mL ddH <sub>2</sub> O gelöst. Das Glycerol und die KAc-Lösung werden hinzugegeben und der pH-Wert mit 1 M HCl auf 6,4 eingestellt. Nach der Einstellung wird ad 1 L ddH <sub>2</sub> O beige-fügt.
Elutions-Puffer (für His-Tag-Protein-Aufreinigung)	6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 mM) 17,5 g NaCl (300 mM) 500 mL Imidazol (500 mM) pH 8,0 ad 1 L ddH <sub>2</sub> O
Lyse-Puffer (für His-Tag-Protein-Aufreinigung)	6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 mM) 17,5 g NaCl (300 mM) 10 mL Imidazol (10 mM) pH 8,0 ad 1 L ddH <sub>2</sub> O
PCR-Puffer	200 $\mu$ L Tris (1 M) 20 $\mu$ L MgCl <sub>2</sub> (1 M) 250 $\mu$ L KCL (1 M) 50 $\mu$ L Tween 20 (10 %) 100 $\mu$ L Gelatine (10 mg/mL) ad 2 mL Aqua a.i.
Phosphat-Puffer (zum Waschen der SDS-Gele nach Färben mit dem InVision™ His-tag In-gel Strain)	2,6 g Natriumphosphat, monobasisch (20 mM) pH 7,8 mit 3 M NaOH ad 1 L ddH <sub>2</sub> O
Wasch-Puffer (für His-Tag-Protein-Aufreinigung)	6 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 mM) 17,5 g NaCl (300 mM) 20 ml Imidazol (20 mM) pH 8,0 ad 1 L ddH <sub>2</sub> O

**Tab. 7: Angaben der Komponenten der verwendeten Lösungen.**

Lösung	Komponenten
Entfärbelösung für SDS PAGE	200 mL VE-H <sub>2</sub> O

## Material

### 2.7 Verwendete Enzyme

Tab. 8: Auflistung aller verwendeten Enzyme mit ihren dazugehörigen Puffern.

Enzym	Reaktionspuffer	Hersteller
BglII	3.1	New England BioLabs
BstBI	CutSmart	New England BioLabs
DpnI	CutSmart	New England BioLabs
EcoRI	EcoRI Buffer	New England BioLabs
HindIII	2.1	New England BioLabs
NaeI	CutSmart	New England BioLabs
PstI	3.1	New England BioLabs
PvuI-HF	CutSmart	New England BioLabs
XbaI	CutSmart	New England BioLabs
T4 DNA-Ligase	T 4 DNA Ligase Buffer	New England BioLabs
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	10x Standard <i>Taq</i> reaction Buffer	New England BioLabs
Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase	5x Q5 Reaction Buffer	New England BioLabs
Quick CIP	CutSmart	New England BioLabs

### 2.8 Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 9: Verwendete *E. coli* Bakterienstämme und ihre jeweiligen Genotypen mit Referenzangabe.

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21	<i>fhuA2[lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS</i>	(Studier & Moffatt, 1986)
DH10β	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>	(Casadaban & Cohen, 1980)
J53	F- <i>met pro Azi<sup>r</sup></i>	(Jacoby & Han, 1996)
MG1655	F- <i>λ- ilvG- rfb-50 rph-1</i>	(Bachmann, 1972)
NEB® 5-alpha	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	(Hanahan, 1985)

## Material

**Tab. 10: Verwendeten Plasmide und ihre jeweiligen Charakteristika mit Referenzangabe.**

<b>Plasmid</b>	<b>Charakteristika</b>	<b>Referenz</b>
pUC19	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Ap <sup>R</sup>	(Norrandar et al., 1983)
pUC19:: <i>p9</i>	pUC19 mit <i>p9</i> Gen, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pUC19:: <i>p9</i> <sub>H56A</sub>	pUC19 mit <i>p9</i> Gen mutiert an Aminosäure-Position 56, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pUC19:: <i>p9</i> <sub>R57A</sub>	pUC19 mit <i>p9</i> Gen mutiert an Aminosäure-Position 57, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pUC19:: <i>p9</i> <sub>P58A</sub>	pUC19 mit <i>p9</i> Gen mutiert an Aminosäure-Position 58, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pUC19:: <i>p9</i> <sub>H56A/R57A</sub>	pUC19 mit <i>p9</i> Gen mutiert an Aminosäure-Positionen 56 und 57, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pUC19:: <i>p9</i> <sub>H56A/P58A</sub>	pUC19 mit <i>p9</i> Gen mutiert an Aminosäure-Positionen 56 und 58, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pUC19:: <i>p9</i> <sub>R57A/P58A</sub>	pUC19 mit <i>p9</i> Gen mutiert an Aminosäure-Positionen 57 und 58, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pUC19:: <i>p9</i> <sub>H56A/R57A/P58A</sub>	pUC19 mit <i>p9</i> Gen mutiert an Aminosäure-Positionen 56, 57 und 58, Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pACYC184	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, Cm <sup>R</sup>	(Martinez et al., 1988)
pACYC184:: <i>p9</i>	pSU2719 mit <i>p9</i> Gen, Cm <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD3	<i>frt-aph-frt</i> Kasette Template Plasmid, <i>oriR<sub>y</sub></i> , Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD3:: <i>hyg</i>	<i>frt-aph-frt</i> Kasette Template Plasmid, <i>oriR<sub>y</sub></i> , Hyg <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD4	<i>frt-aph-frt</i> Kasette Template Plasmid, <i>oriR<sub>y</sub></i> , Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pKD4:: <i>hyg</i>	<i>frt-aph-frt</i> Kasette Template Plasmid, <i>oriR<sub>y</sub></i> , Hyg <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>	Diese Arbeit
pKD46*	λ Red Rekombinationsplasmid, <i>oriR101</i> , <i>repA101(ts)</i> , <i>araC</i> , <i>P<sub>a-raB-gam-bet-exo</sub></i> , Temperatur induzierbar, Ap <sup>R</sup>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pSIM5 tet*	λ Red Rekombinationsplasmid, <i>oriR101</i> , <i>repA101(ts)</i> , <i>araC</i> , <i>P<sub>a-raB-gam-bet-exo</sub></i> , Temperatur induzierbar, Tc <sup>R</sup>	(Koskiniemi et al., 2011)
pV163M Δ <i>p9</i>	pV163M mit Deletion des hypothetischen Proteins 9, Km <sup>R</sup>	Azarderakhsh, 2017 (unv. Masterarbeit)
pV163M <i>p9</i> <sub>R57A/P58A</sub>	pV163M mit mutiertem <i>p9</i> an den Aminosäure-Positionen 57 und 58, Km <sup>R</sup>	Diese Arbeit

## Material

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pV163M <i>p9</i> <sub>H56A/R57A/P58A</sub>	pV163M mit mutiertem <i>p9</i> an den Aminosäure-Positionen 56, 57 und 58, Km <sup>R</sup>	Diese Arbeit

\* Bakterien, welche pKD46 oder pSIM-5 enthielten, mussten bei 30°C inkubiert werden

### 2.9 Primer

Die Primer wurden eigenständig designed und von Eurofins Genomics synthetisiert. Das Lösen der Primer erfolgte nach Herstellerangaben in Aqua a.i.

#### 2.9.1 IncN Plasmid

Im Folgenden werden alle Primer aufgelistet, die für die Umklonierung von pKD3 und die Lambda-Red Mutagenese verwendet wurden.

##### 2.9.1.1 Klonierungsprimer

**Tab. 11: Primer zur Umklonierung der Resistenzkassette der Plasmide pKD3 und pKD4.** Die Sequenzen sind vom 5' zum 3' Ende dargestellt. Fwd=forward; rev=reverse

Oligoname	Sequenz (5'→3')
pKD3_fwd	TTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATC
pKD3_rev	GTGGCAGGGCGGGGCGTAAG
Hygro_fwd	CTTACGCCCCGCCCTGCCACCTATTCCTTTGCCCTCGG
Hygro_rev	CAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGAAAAAGCCTGAACTCAC
pKD4_Backbone_fwd	AAAGGAATAGGCGGGACTCTGGGGTTCG
pKD4_Backbone_rev	GCTTTTTCATGCGAAACGATCCTCATCCTGTC
pKD4_FRT1_fwd	GAGCTGCTTCAAGATCCCCTCACGCTGC
pKD4_FRT1_rev	AGGGGATCTTGAAGCAGCTCCAGCCTAC
Hygro_f2	ATCGTTTCGCATGAAAAAGCCTGAACTCA
Hygro_r2	AGAGTCCCGCCTATTCCTTTGCCCTCGG

### 2.9.1.2 Kontrollprimer

**Tab. 12: Primer zum Nachweis der IncN Deletionsmutanten und der durch Aqua cloning umklonierten Plasmide pKD3 und pKD4.** Die Sequenzen sind vom 5' zum 3' Ende dargestellt. Fwd/F=forward; rev/R=reverse

Oligoname	Sequenz (5'→3')
K_hyg_fwd	GAATAGGAACTTCGGAATAGG
K_hyg_rev	CACCATAATGAAATAAGATCACTAC
K_pKD4_f	GCCAAGGATCTGATGGCGC
K_pKD4_r	CGGCGGTGGAATCGAAATC
K_s-tI_R	GCTTTTAGGGGTCGTTTGCG
K_s-tI_F	GTCGAAGTGGCTGCAAGCC
K_tA4_R	TCCTTTTGTGTTTGAAGAAGCTG
K_tA4_F	GATATTTTCCTATTATTACCTGG
K_sA8_F	CGCGGGCATCCGGCATAAC
K_sA8_R	GATGCTGCCGATACTACATAAC

### 2.9.1.3 Lambda-Red-Rekombinase-Primer

**Tab. 13: Primer zur Generierung der IncN Mutanten mit dem Lambda-Red-Mutagenese Verfahren.** Die Sequenzen sind vom 5' zum 3' Ende dargestellt. Die mit Kleinbuchstaben markierten Bereiche, sind die mit der von pKD3 übereinstimmenden Sequenz. F=forward; R=reverse

Oligoname	Sequenz (5'→3')
LF_lacZ_F3	GGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTgaactcaagatcccctcac
LF_lacZ_R3	TTACGCGAAATACGGGCAGACATGGCCTGCCCGGTTATTAagcgaagaactccagcatgag
sB-tA1_R2	ATTGATGTGTTCCCAGGGGATAGGAGAAGTCGCTTGATATcatatgaatactctccttag
sB-tA1_F2	TAAGGGTTAATTTGAGGGTTTCTGCTCGTAGCAGGCATAACgtgtaggctggagctgcttc
tA-4_R2	TCAGATTTTCGGGTAAGTCTCCCCGTAGCGGGTTGTGTTTcatatgaatactctccttag
tA-4_F2	CCATGCGCGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTGCTGAGgtgtaggctggagctgcttc
sA0008_R2	GTTTCTCTGCCGCGCCATTACCGTTATACATACAATAATGcatatgaatactctccttag
sA0008_F2	TGATCAAACCTGTATTAAATAAGCCACTGTACCGTTTATAgtgtaggctggagctgcttc

## 2.9.2 IncX4 Plasmid

Im Folgenden sind die Primer aufgelistet, die für die Komplementation, Site-directed Mutagenese und die Mutagenese mittels Aqua cloning sowie die Kontrollprimer verwendet wurden.

### 2.9.2.1 Klonierungsprimer der $\Delta p9$ Mutante

**Tab. 14: Primer zur Generierung der Komplementanten von  $\Delta p9$ .** Die Sequenzen sind vom 5' zum 3' Ende dargestellt. fwd=forward; rev=reverse

Oligoname	Sequenz (5'→3')
<i>hp9_fwd</i>	GGGTGTCGGGGCTGGCTTAATTAATCATTCTGTCAGCTCTG
<i>hp9_rev</i>	ATTCACACAGGAAACAGCTATGGCAAAGCTGGAAGTACC
<i>pUC19_fwd</i>	AGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG
<i>pUC19_rev</i>	TTAAGCCAGCCCCGACACC
<i>p9_pACYC184_fwd</i>	GGCACCGTGTATGGCAAAGCTGGAAGTACC
<i>p9_pACYC184_rev</i>	CGGCTTCCATTTAATCATTCTGTCAGCTCTG
<i>pACYC184_fwd</i>	AAATGATTAATGGAAGCCGGCGGCACC
<i>pACYC184_rev</i>	GCTTTGCCATACACGGTGCCTGACTGCG

### 2.9.2.2 Lambda-Red-Rekombinations-Primer

**Tab. 15: Primer zur Generierung der  $p9$  Deletionsmutanten von pV163M mit der Lambda-Red-Mutagenese.** Die Sequenzen sind vom 5' zum 3' Ende dargestellt. Die mit Kleinbuchstaben markierten Sequenz ist die mit pKD3 übereinstimmende Sequenz.

Oligoname	Sequenz (5'→3')
<i>p9 reverse</i>	AAAGAAAATGATAAAGAGTTTATTGGGCCACTTGCTATGAcatatgaatcctccttag
<i>p9 forward</i>	ATATACATTAGTGTGAAACAATCAGATTAGAAGGTACATCggttaggctggagctgcttc

### 2.9.2.3 Site-directed Mutagenese Primer für Mutagenese von $p9$ in pUC19

**Tab. 16: Primer zur Generierung der Site-directed Mutanten von  $p9$  in pUC19.** Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung dargestellt. Die mit Kleinbuchstaben markierten Bereiche sind die Sequenzen, die ausgetauscht werden und somit eine Mutation eingeführt wird. F=forward; R=reverse

Oligoname	Sequenz (5'→3')	Mutation
<i>p9_H56A_F</i>	AAAAAGACTGgctCGTCCCAAGAC	H56A
<i>p9_H56A_R</i>	GATTCGTTATCAATGAATTCAAG	
<i>p9_R57A_F</i>	AAGACTGCATgctCCCAAGACAAAAATAATC	R57A
<i>p9_R57A_R</i>	TTTGATTTCGTTATCAATGAATTC	
<i>p9_P58A_F</i>	ACTGCATCGTgctAAGACAAAAATAATC	P58A
<i>p9_P58A_R</i>	CTTTTTGATTTCGTTATCAATGAATTC	
<i>p9_H56R57A_F</i>	AAAAAGACTGgctgctCCCAAGACAAAAATAATCAAAGC	

## Material

Oligoname	Sequenz (5'→3')	Mutation
<i>p9_H56R57A_R</i>	GATTCGTTATCAATGAATTCAAG	H56A, R57A
<i>p9_H56P58A_F</i>	tgctAAGACAAAAATAATCAAAGCAG	H56A,
<i>p9_H56P58A_R</i>	cgagcCAGTCTTTTTGATTTCGTTATC	P58A
<i>p9_R57P58A_F</i>	AAGACTGCATgctgctAAGACAAAAATAATCAAAGCAG	R57A,
<i>p9_R57P58A_R</i>	TTTGATTTCGTTATCAATGAATTC	P58A
<i>p9_Trippel_F</i>	tgctAAGACAAAAATAATCAAAGCAG	H56A,
<i>p9_Trippel_R</i>	gcagcCAGTCTTTTTGATTTCGTTATC	R57A, P58A

### 2.9.2.4 Site-directed Mutagenese Primer für Mutagenese von *p9* in pV163M

**Tab. 17: Primer zur Generierung der Site-directed Mutanten von *p9* in pV163M.** Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung dargestellt. Die mit Kleinbuchstaben markierten Bereiche sind die Sequenzen, die ausgetauscht werden und somit eine Mutation eingeführt wird. fwd/f=forward; rev/r=reverse

Oligoname	Sequenz (5'→3')	Mutation
LF_F2_hha.2_r	TTTCAGCAGTTGCGACACTCGATTTATCGGGACTTGGTG-GATATC	Zur Erzeugung aller Mutanten
LF_F3_hha.2_f	TTTCAGATATCCACCA-AGTCCCGATAAATCGAGTGTCGCAAGTG	Zur Erzeugung aller Mutanten
pV163M_p9_H56A_rev	TATTTTTGTCTTGGGACGagcCAGTCTTTTTGATTTCGTTATCAATG	H56A
pV163M_p9_H56A_fwd	AATCAAAAAGACTGGCtgcTCCCAAGACAAAAATAATCA-AAG	
pV163M_p9_R57A_rev	GATTATTTTTGTCTTGGGgagcATGCAGTCTTTTTGATTTCGT-TATC	R57A
pV163M_p9_R57A_fwd	CAAAAAGACTGCATgctCCCAAGACAAAAATAATCA-AAGCAG	
pV163M_p9_P58A_rev	TTTGATTATTTTTGTCTTagcACGATGCAGTCTTTTTGATTTCG	P58A
pV163M_p9_P58A_fwd	AAAGACTGCATCGTgctAAGACAAAAATAATCA-AAGCAGCATTAC	
pV163M_p9_H56AR57A_rev	GATTATTTTTGTCTTGGGgagcagcCAGTCTTTTTGATTTCGT-TATC	H56A R57A
pV163M_p9_H56AR57A_fwd	CAAAAAGACTGgctgctCCCAAGACAAAAATAATCAAAGCAG	
pV163M_p9_H56AP58A_rev	TTTGATTATTTTTGTCTTagcACGagcCAGTCTTTTTGATTTCG	H56A P58A
pV163M_p9_H56AP58A_fwd	AAAGACTGgctCGTgctAAGACAAAAATAATCA-AAGCAGCATTAC	
pV163M_p9_R57AP58A_rev	TTTGATTATTTTTGTCTTagcagcATGCAGTCTTTTTGATTTCG	R57A P58A

## Material

Oligoname	Sequenz (5'→3')	Mutation
pV163M_p9_R57	AAAGACTGCATgctgctAAGACAAAATAATCAAAGCAGCAT-	
AP58A_fwd	TAC	
pV163M_p9_Trip	TTTGATTATTTTTGTCTTagcagcageCAGTCTTTTTGATTTCG	H56A
pel_rev		R57A
pV163M_p9_Trip	AAAGACTGgctgctgctAAGACAAAATAATCAAAGCAGCAT-	P58A
pel_fwd	TAC	

### 2.9.2.5 Kontrollprimer

**Tab. 18: Primer zur Überprüfung der Aqua-Cloning Mutanten.** Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung dargestellt. fwd/f=forward; rev/r=reverse

Oligoname	Sequenz (5'→3')
K_hp9_f2	GTAAGCGGATGCCGGGAG
K_hp9_r2	CACTTTATGCTTCCGGCTCG
K_184_p9_fwd	GTCAGCCCCATACGATATAAG
K_184_p9_rev	GACGCGATGGATATGTTCTGC
K_delta_p9_f	CTGTACAAGGGTATTTTATTGC
K_delta_p9_r	CGAACTCTTGCTGAAAGAAC

## 2.10 Verwendete Kits

**Tab. 19: Auflistung der verwendeten Kits.**

Name	Hersteller
His-Tag Protein Expression Check Kit	Abcam
PCR Purification Kit	QIAGEN
Plasmid Mini Kit	QIAGEN
PureLink™ Genomic DNA Kit	Thermo Fisher Scientific
Ni-NTA Spin Kit	QIAGEN
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	New England BioLabs
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
Nextera XT DNA Library Preparation Kit (96 samples)	Illumina
MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles)	Illumina
NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 Cycles)	Illumina
Rapid Barcoding Kit, SQK-RBK004	Oxford Nanopore Technologies

### 3. Methoden

#### 3.1 Mikrobiologische Methoden

##### 3.1.1 Kultivierung der Bakterien

In Abhängigkeit, wozu die Bakterien gebraucht wurden, wurden sie entweder in Flüssigmedium oder auf Festmedium stets mit dem entsprechenden Antibiotikum, zur Stabilisierung der Plasmide in der Bakterienzelle, kultiviert. Für die Gewinnung von Einzelkolonien wurde sie auf Agarplatten kultiviert. Dafür wurde entweder ein 3-Ösen-Ausstrich mit einer sterilen Impföse durchgeführt oder eine Bakterienlösung mit einem Drigalskispatel ausplattiert und über Nacht bei der, für die Bakterien geeigneten Temperatur (30°C, 37°C) im Inkubator bebrütet. Die Übernachtskultur (ÜNK) in Flüssigmedium wurde am Nachmittag angesetzt und über Nacht (mind. 16 h) bei der Optimaltemperatur inkubiert. Die Bakterienkultur sollte ihre stationäre Wachstumsphase am Morgen erreicht haben und damit ihre maximale Zelldichte besitzen. Dafür wurden 20 mL LB-Selektionsmedium mit einer Bakterienkolonie beimpft und unter Schütteln bei 180 revolutions per minute (rpm) für etwa 20 Stunden bei 37°C inkubiert.

##### 3.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Als Kompetenz wird die Fähigkeit bezeichnet, aus dem umgebenen Medium frei vorhandene DNA aufzunehmen. Da *E. coli* keine natürliche Kompetenz besitzt, muss diese durch eine CaCl<sub>2</sub> Behandlung künstlich (chemisch) erzeugt werden. Dazu wurde eine ÜNK 1:50 mit LB-Medium verdünnt und bei 37°C und 180 rpm so lange inkubiert, bis eine optische Dichte (OD) von 0,3 bei 600 nm Wellenlänge (OD<sub>600</sub>) erreicht war. Anschließend wurde die Kultur für 10 min auf Eis inkubiert und danach abzentrifugiert (10 min; 4000 rpm; 4°C). Das Pellet wurde in 1/3 Volumen CCMB80-Puffer resuspendiert und für weitere 10 min auf Eis gestellt. Danach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min; 4000 rpm; 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1/12 Volumen CCMB80-Puffer resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde in Portionen von 200 µl aliquotiert, für kurze Zeit bei -20°C eingefroren und danach bei -80°C gelagert.

##### 3.1.3 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Für die Herstellung elektrokompenter Bakterien wurde zunächst eine Flüssigkultur angesetzt und über Nacht inkubiert. Bei Bakterien mit pKD46/pSIM5-Tet musste diese Inkubation bei

## Methoden

30°C erfolgen. Am nächsten Tag wurde eine Subkultur, mit der Zugabe der entsprechenden Antibiotika, angesetzt, indem die ÜNK 1:100 verdünnt wurde (Endvolumen 50 mL). Bei pKD46/pSIM5-Tet erfolgte neben den Antibiotika außerdem die Zugabe von 20 mM Arabinose, da dieses Plasmid einen Arabinose-induzierbaren Promotor ( $P_{araB}$ ) für die Expression der auf diesen Plasmiden kodierten Rekombinase-Gene besitzt. Die Kultur wurde dann bei 30°C und 180 rpm so lange inkubiert, bis eine  $OD_{600}$  von 0,6 erreicht war. Der Kolben wurde anschließend für fünf Minuten in eiskaltem Wasser geschwenkt und danach für 10 min auf Eis gestellt. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 50 mL 10%igem Glycerol resuspendiert und der Zentrifugationsschritt noch 3-mal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 500 µL Glycerol (10%) resuspendiert und in 50 µL-Aliquots in 1 mL Mikroreaktionsgefäßen mit Schraubverschluss für kurze Zeit bei -20°C eingefroren und langfristig bei -80°C gelagert.

### 3.1.4 Chemische Transformation

Die gefrorenen Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 5 µL der DNA des zu transformierenden Plasmids in 200 µL Bakterien gegeben. Diese wurden für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C im Heizblock für 90 Sekunden (s). Danach wurden die Bakterien für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden dann in 500 µl SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C und 180 rpm schüttelnd inkubiert. 100 µL und 200 µL der transformierten Bakterien wurden dann auf entsprechenden LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden am nächsten Tag vereinzelt.

### 3.1.5 Elektroporation

Die elektro-kompetenten Bakterien wurden für 10 min auf Eis aufgetaut und für jeden Ansatz ein 1,5 mL Reaktionsgefäß und jeweils eine 0,1 cm Elektroporationsküvette auf Eis gestellt. In dem kalten Reaktionsgefäß wurden 50 µL der Zellen mit der gewünschten DNA-Menge gemischt, da der enge Spalt der Küvette ein gleichmäßiges Mischen verhindern würde. Die DNA kann dabei sowohl ein PCR-Produkt als auch aufgereinigte Plasmid-DNA sein und sollte in einem niedrig ionischen Puffer (z. B. Aqua a.i.) vorliegen. Die Zellen wurden dann für eine Minute auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde in eine Elektroporationsküvette übertragen und die Küvette in den Schieber des Elektroporators gestellt. Der Schieber wurde in die Kammer

geschoben, bis die Küvette zwischen den Kontakten der Kammer saß. Anschließend wurde einmal pulsiert mit einer Spannung von 1,8 kV. Danach wurde die Küvette sofort aus der Kammer genommen und 500 µL SOC-Medium auf die Zellen gegeben. Es erfolgte die Übertragung der Zellen in ein 14 mL Reaktionsgefäß, welches für eine Stunde bei 37°C und 180 rpm inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurden 250 µL auf geeignete LB-Selektionsplatten ausplattiert. Der restliche Transformationsansatz wurde, aufgrund der geringen Transformationseffizienz, noch einmal abzentrifugiert (2 min; 2000 rpm), 50 µL des Überstands verworfen und das Pellet in der restlichen Lösung aufgenommen. Anschließend wurde der restliche Transformationsansatz ebenfalls ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht im Brutschrank.

### 3.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren, um spezifische Amplifikate von DNA-Abschnitten zu generieren. Die Sequenz, die repliziert werden soll, wird durch Primer begrenzt, die den Startpunkt der Replikation für die DNA-Polymerase festlegt. Für den Reaktionsansatz wird das DNA-*template* mit dem jeweiligen Puffer, dNTP's, Primern und der DNA-Polymerase in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben. Im Thermocycler erfolgt nach der Denaturierung der doppelsträngigen DNA die Anlagerung (Annealing) der Primer. Im Anschluss findet die Elongation der DNA bei der optimalen Temperatur für die DNA-Polymerase statt (überwiegend 72°C). Danach erfolgt die Trennung des neusynthetisierten Stranges durch erneutes Aufschmelzen bei 98°C. Der Prozess wird mehrere Male wiederholt.

Für die PCR wurden je nach Anwendung unterschiedliche DNA-Polymerasen verwendet. Zur Erzeugung von PCR-Fragmenten für die Mutagenese und für die Klonierung von Genen wurde eine PCR mittels der Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA-Polymerase durchgeführt. Diese Polymerase weist eine  $\approx$  280-fach niedrigere Fehlerrate als die *Taq*-DNA-Polymerase auf und ist in der Lage *blunt-end* PCR-Produkte mit einer Länge von bis zu 20 kB zu erzeugen (Herstellerangabe). Für die Amplifikation der gDNA (chromosomale DNA) wurden 1 ng bis 1 µg als Template DNA eingesetzt. Für die Amplifikation von Plasmid-DNA für z. B. Aqua cloning oder site directed mutagenesis wurde 1 pg bis 1 ng DNA benötigt.

## Methoden

Die *Taq*-DNA-Polymerase wurde verwendet, um nach erfolgreicher Transformation die Plasmid-Konstrukte zu verifizieren. Dafür wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, indem etwas Zellmaterial von der LB-Selektionsplatte abgenommen wurde und in 150 µL Aqua a.i. gelöst und anschließend bei 95°C für 10 min inkubiert wurde. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 11.000 rpm für 3 min. Der Überstand enthielt die DNA.

### **Reaktionsansatz und Cyclerbedingungen für die Q5® High-Fidelity DNA Polymerase**

			<b><u>Schritt</u></b>	<b><u>Temperatur</u></b>	<b><u>Zeit</u></b>
5x Q5 Reaction Buffer	10 µL				
10 mM dNTPs	1 µL		Initial Denaturation	98°C	30 s
10µM Primer F	2,5 µL	25	Denaturation	98°C	10 s
10µM Primer R	2,5 µL		Annealing	variabel	30 s
Template DNA	variabel		Elongation	72°C	30 s/kb
Polymerase	0,5 µL		Final Extension	72°C	120 s
Aqua a.i.	ad 50 µL		Hold	8°C	∞

### **Reaktionsansatz und Cyclerbedingungen für die *Taq*-DNA-Polymerase**

			<b><u>Schritt</u></b>	<b><u>Temperatur</u></b>	<b><u>Zeit</u></b>
10x PCR-Buffer, Mg	5 µL				
50mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 µL (optional)		Initial Denaturation	94°C	30 s
10mM dNTPs	1 µL	30	Denaturation	94°C	30 s
10µM Primer F	1 µL		Annealing	variabel	30 s
10µM Primer R	1 µL		Elongation	72°C	60 s/kb
Template DNA	5 µL		Final Extension	72°C	420 s
Polymerase	0,25 µL		Hold	8°C	∞
Aqua a.i.	ad 50 µL				

### 3.2.2 Restriktionsanalyse

Alle Enzyme wurden nach Angaben des Herstellers mit den entsprechenden Puffern verwendet. Es wurden analytische und präparative Restriktionsanalysen durchgeführt. Der analytische Restriktionsverdau dient zur weiteren Verifizierung der Plasmid-Konstrukte nach positiver PCR (Tab. 20).

## Methoden

**Tab. 20: Reaktionsansatz des analytischen Restriktionsverdau.**

DNA	Variabel (~ 200 ng)
Enzympuffer	2 µL
Restriktionsenzym	1 µL
Aqua a.i.	ad 20 µL

Die präparative Restriktionsanalyse dient dazu, die DNA zu schneiden und so die Ligation mit einem anderen DNA-Fragment zu ermöglichen (Tab. 21).

**Tab. 21: Reaktionsansatz der präparativen Restriktionsanalyse.**

DNA	Variabel (~ 2000 ng)
Enzympuffer	5 µL
Restriktionsenzym	2,5 µL
Aqua a.i.	ad 50 µL

Der präparative Restriktionsverdau wurde sowohl für den Vektor als auch für das Insert durchgeführt.

### 3.2.3 Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Elektrophorese-Verfahren, bei dem Nukleinsäuren durch ein elektrisches Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Sie kann entweder analytisch oder präparativ genutzt werden.

#### 3.2.3.1 Analytische Gelelektrophorese

Die analytische Gelelektrophorese wurde entweder für die Ermittlung der Größe von PCR-Fragmenten oder für die Überprüfung eines Restriktionsverdau-Ergebnisses durchgeführt. Hierzu musste zunächst ein 1%iges Agarosegel hergestellt werden. Dazu wurde 1% (w/v) Agarose in TBE-Puffer (1x) gegeben und aufgekocht, bis die Agarose komplett gelöst war. Sobald die Agarose etwas abgekühlt war, konnte das Gel gegossen und nach dem Aushärten in die Gelkammer gelegt werden. Die Kammer wurde dann mit TBE-Puffer (1x) aufgefüllt, sodass die Taschen mit Puffer gefüllt waren. Anschließend wurden 5 µL PCR-Produkt oder Restriktionsverdau mit 1 µL Gel Loading Dye (6x) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Am Rand wurden 6 µL des 1kb DNA Ladder aufgetragen. Das Auftrennen der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung von 140 V für 90 min. Nachdem das Gel für 30 min gefärbt wurde (Gel-Red<sup>®</sup>Nucleic Acid Strain), konnten die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Abschätzung der Fragmentgrößen erfolgte anhand des aufgetragenen Markers.

## Methoden

### 3.2.3.2 Präparative Gelelektrophorese

Die präparative Gelelektrophorese wird durchgeführt, um geschnittene DNA in größeren Mengen aus dem Gel zu gewinnen. Dafür wurde ebenfalls ein 1%iges Agarosegel gegossen und die Kammer mit TBE (1x) aufgefüllt. Die restriktionsverdaute DNA (12  $\mu\text{L}$ ) wurde mit der entsprechenden Menge Gel Loading Dye 6x (8  $\mu\text{L}$ ) gemischt. Das Auftrennen der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung von 140 V für 45 min. Nachdem das Gel gefärbt wurde, konnten die Banden unter Blau/Grün-Licht am LED-Transilluminator sichtbar gemacht und anschließend aus dem Gel eluiert werden. Dafür wurde zunächst das Mikroreaktionsgefäß gewogen und dann das Gel-Stück mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde das Gesamtgewicht des Gel-Stückes ermittelt und mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit von QIAGEN nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt.

### 3.2.4 Dephosphorylierung

Die nach der Gelelektrophorese aufgereinigten Gelstücke, wurden dephosphoryliert (Tab. 22), um eine Selbstligation der geschnittenen Fragmente zu vermeiden.

**Tab. 22: Reaktionsansatz der Dephosphorylierung.**

Enzympuffer	2 $\mu\text{L}$
Quick CIP	1 $\mu\text{L}$
DNA	1 pmol der DNA-Enden (~ 1 $\mu\text{g}$ eines 3 kb Plasmids)
Aqua a.i.	ad 20 $\mu\text{L}$

Der Ansatz wurde bei 37°C für 10 min inkubiert und anschließend bei 80°C für 2 min inaktiviert. Dieser Ansatz wurde im Weiteren für die Ligation verwendet.

### 3.2.5 Ligation

Bei der Ligation werden die beiden zuvor geschnittenen DNA-Fragmente enzymatisch verknüpft (Tab. 23).

**Tab. 23: Reaktionsansatz der Ligation.**

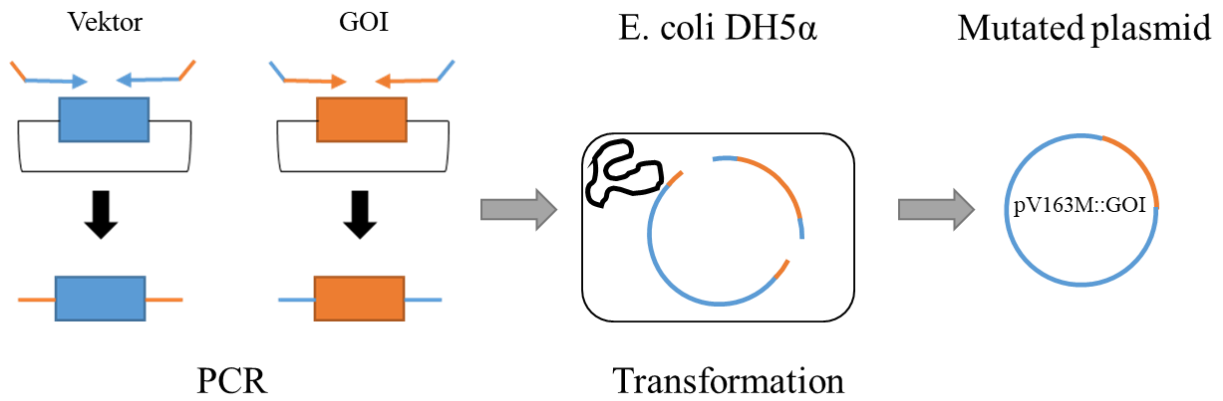
Vektor	50 ng
Insert	37,5 ng
Enzympuffer	2 $\mu\text{L}$
Ligase	1 $\mu\text{L}$
Aqua a.i.	ad 20 $\mu\text{L}$

Der Reaktionsansatz wurde durch auf und ab pipettieren gemischt. Für sticky ends erfolgte eine Inkubation bei RT für 10 min und für blunt ends bei RT für zwei Stunden. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65°C für 10 min. Der Reaktionsansatz wurde dann auf Eis gestellt und 1-5 µL des Ligations-Ansatzes in chemisch-kompetente *E. coli* transformiert.

### 3.2.6 AQUA Klonierung in *E. coli*

Die *Advanced quick assembly* (AQUA) Klonierung gehört zu den Assemblierungstechniken, die auf der *in vivo* Verarbeitung durch *E. coli* basieren. Die Assemblierung wird mit zwei DNA-Fragmenten durchgeführt, die durch PCR hergestellt werden (Beyer et al., 2015). Für diese Methode müssen der Vektor und das Insert in z. B. *E. coli* DH5α zusammengebracht werden. Dafür müssen die PCR-Produkte zunächst so verdünnt werden, dass eine Konzentration von ca. 100 ng/µL erhalten wurde. Die in Wasser verdünnten PCR-Produkte wurden in einem Mischverhältnis von 1:1 (Insert:Vektor) gemischt. 50 µL der NEB DH5α hochkompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und der gemischte Insert/Vektor-Ansatz hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C. Danach wurden die Zellen für weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 950 µL gebrauchsfertigem SOC-Medium, welches zuvor auf Raumtemperatur (RT) erwärmt wurde. Die Zellen wurden dann bei 37°C und 250 rpm für eine Stunde inkubiert. Die homologen Enden der Amplikons finden nach der Transformation zueinander und wurden von bakteriellen Enzymen *in vivo* über homologe Rekombination verknüpft (Abb. 7) (Beyer et al., 2015). Anschließend wurden 100 µL und 200 µL der Zellen auf 37°C vorgewärmte LB-Selektionsplatten ausplattiert.

## Methoden



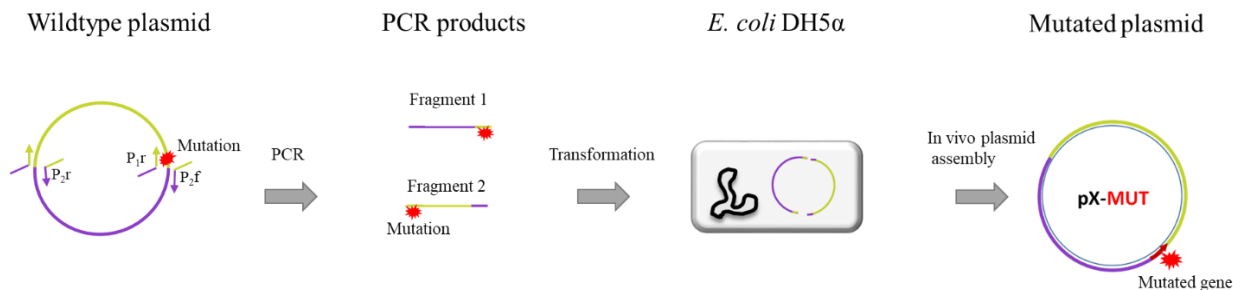
**Abb. 7: Schematische Darstellung der AQUA-Klonierung.** DNA-Teile werden durch PCR oder Restriktionsverdau (oder beides) hergestellt. Die DNA-Teile werden durch sequenzbestimmte Direktionalität zu einem kreisförmigen Plasmid zusammengesetzt (Beyer et al., 2015). GOI=gene of interest

Die gewachsenen Kolonien wurden am nächsten Tag vereinzelt. Dazu wurden auf einer Agarplatte acht Kolonien ausgestrichen.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus dem Zell-Pellet einer ÜNK mit Hilfe des Plasmid Mini Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop überprüft.

### 3.2.6.1 2-Fragment Methode

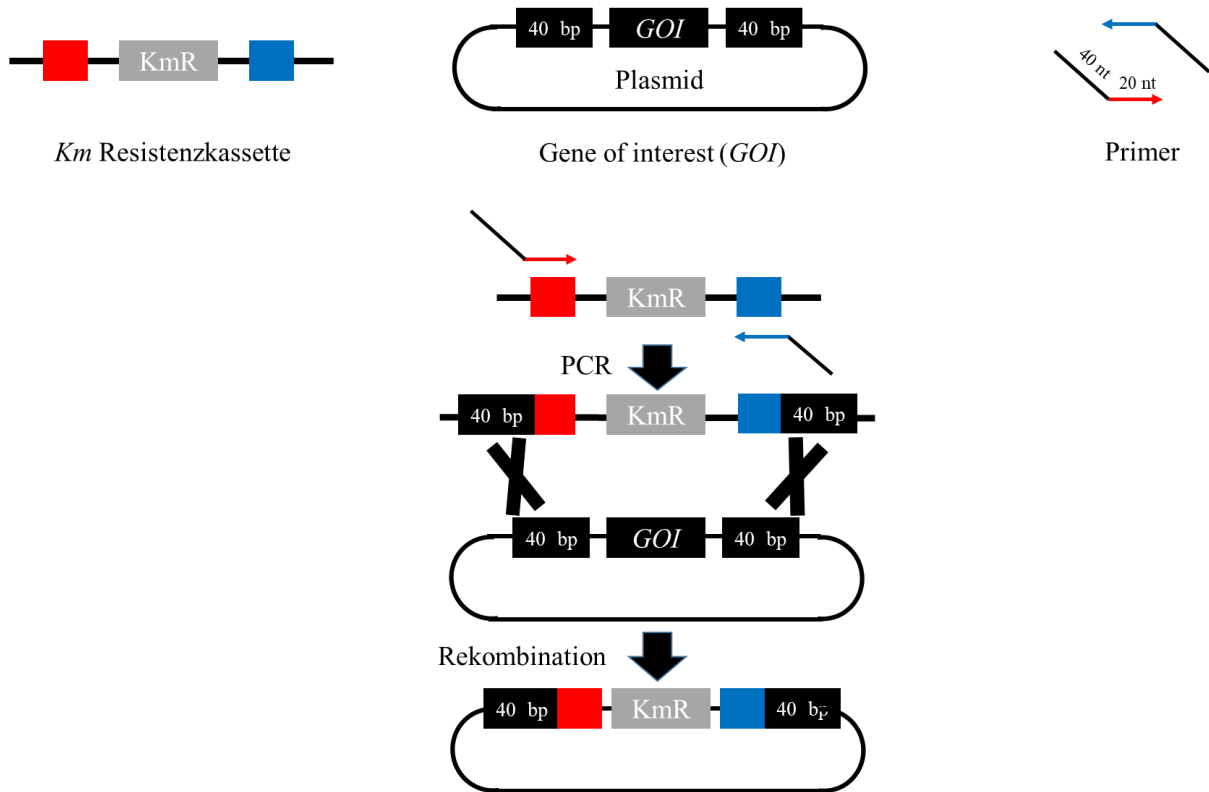
Die 2-Fragment Methode (Name abgeleitet aus den zwei verwendeten PCR-Produkten) ist eine auf der AQUA-Klonierungs-Methode basierende Mutagenese-Methode. Durch systematisches Primerdesign ist es möglich, die überlappenden homologen Sequenzen am 3' oder 5'-Ende der Fragmente so zu gestalten, dass während der Assemblierung bestimmte Basenpaare im Zielgen ausgetauscht werden. Für die Transformation wurden zwei Fragmente eingesetzt, welche zuvor durch PCR erzeugt wurden (Abb. 8). Als DNA-*template* diente in dieser Arbeit pV163M.



**Abb. 8: Mutagenese mittels 2-Fragment Methode.**

### 3.2.7 Lambda-Red-Mutagenese

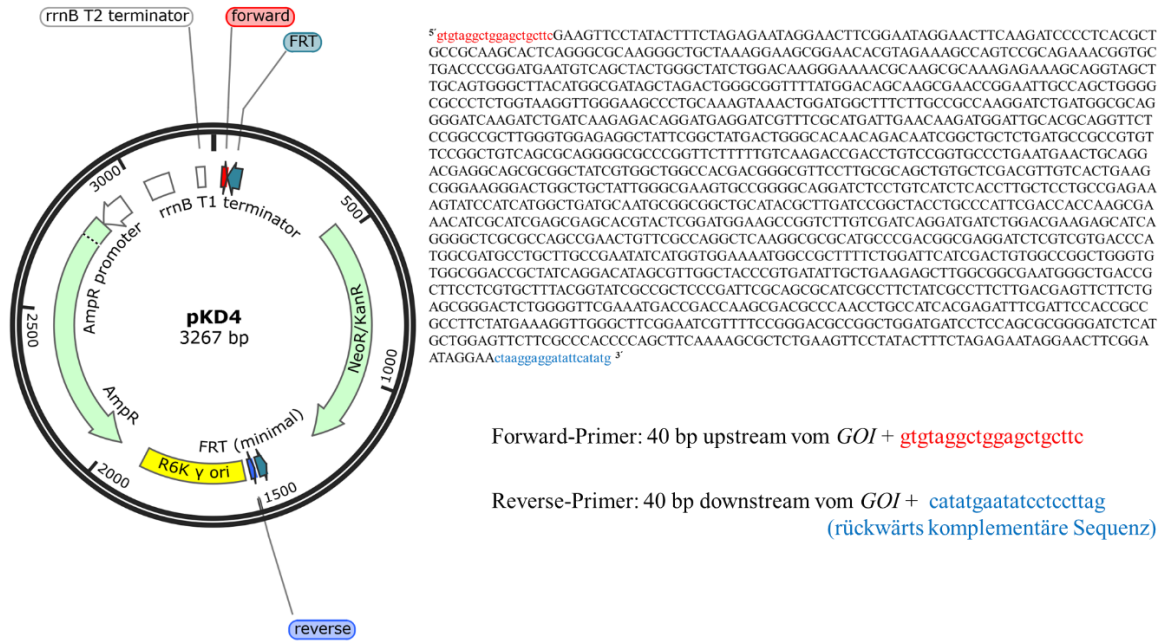
Die Lambda-Red-Mutagenese ist eine vom Phagen Lambda abgeleitetes Rekombinationssystem, mit dem gezielt Insertions-, Deletions- und Punktmutationen auf chromosomalen, Plasmid- oder BAC-Zielen in *E. coli* generiert werden können (Abb. 9).



**Abb. 9: Schematische Darstellung des Lambda-Red-Rekombinase Verfahrens.** Das Plasmid pKD4, mit seinen von FRT-Sequenzen flankierten Antibiotikaresistenzkassette (KmR), dient als Template zur Erzeugung der PCR-Produkte. Die PCR-Produkte enthalten am 3'-und 5'-Ende 40 bp der flankierenden Sequenzen des Gene of interest (*GOI*). Durch die homologe Rekombination mit dem Plasmid wird das *GOI* mit der Kan-Resistenzkassette ausgetauscht.

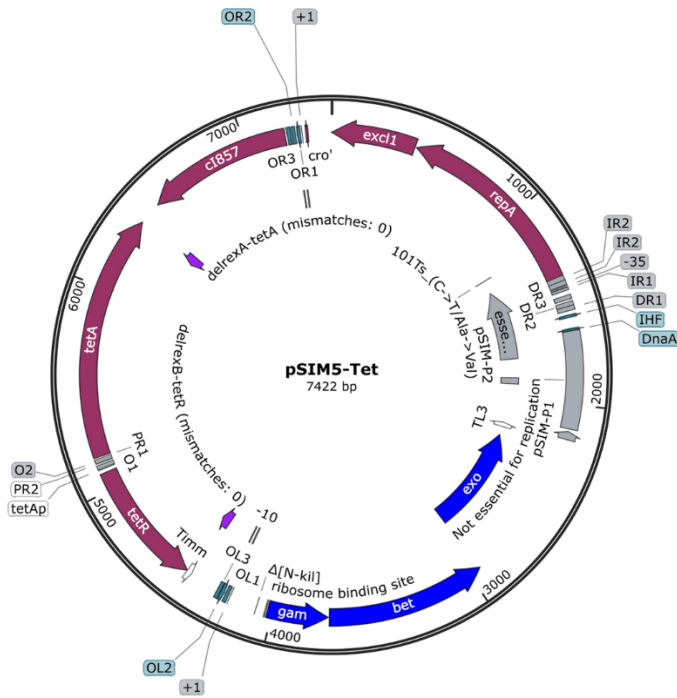
Die Methode basiert auf homologe Rekombination von synthetischen PCR-Produkten, wofür ein spezielles Primerdesign erforderlich ist (Abb. 10).

## Methoden



**Abb. 10: Primerdesign am Beispiel von pKD4.** Der Forward-Primer enthält die ersten 20 bp (gtgtagctggagctgcttc) und der Reverse-Primer die letzten 20 bp (ctaaggaggatattcatatg) der flankierenden Bereiche der Kanamycin Resistenzkassette jeweils am Ende des Primers. Die Sequenz der Kanamycin-Resistenzkassette ist vom 5' zum 3' Ende dargestellt. Beim Reverse-Primer ist darauf zu achten, dass die rückwärts komplementäre Sequenz verwendet werden muss. Die ersten 40 bp der Primer enthalten die flankierende Sequenz des zu deletierenden Zielgens (*GOI*).

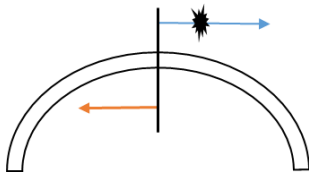
Die Primer müssen eine Überlappung mit den flankierenden Bereichen des Resistenzmarkers als auch eine Überlappung mit dem Zielgen besitzen (Datsenko & Wanner, 2000). Lineare DNA-Fragmente können mit diesen Primern mittels Q5<sup>®</sup> High-Fidelity Polymerase synthetisiert werden. Als Template diente dafür pKD4, welches die von FRT-Sequenzen flankierte Antibiotikaresistenzkassette (KmR) besitzt. Die FRT-Sequenzen selbst sind kurze Genabschnitte im Plasmid (34 bp) und Teil des Flp/FRT-Systems. Dabei bindet die Rekombinase „Flippase“ (*Flp*) an die FRT-Sequenz und rekombiniert diese (Zhu & Sadowski, 1995). Die über PCR synthetisierten Fragmente wurden anschließend mit DpnI verdaut, um vollständig methylierte template DNA zu entfernen. Durch Elektroporation (50-300 ng pro 50 µL elektrokompente Zellen) wurden die DNA-Fragmente in die Wirtszelle eingebracht. Diese rekombinierten mithilfe der über pKD46 oder pSIM5-Tet (Koskiniemi et al., 2011) exprimierten Lambda-Red-Proteine Gam, Exo und Beta mit den entsprechenden homologen Regionen des Wirtschromosoms oder einer anderen Ziel-DNA (z. B. Antibiotika-Resistenzplasmid) (Abb. 11). Nach der Elektroporation wurde sofort SOC-Medium (500 µL) auf die Zellen gegeben und bei 42°C für eine Stunde inkubiert. Die Bakterienzellen wurden anschließend auf Selektionsplatten ausplattiert.



**Abb. 11: Plasmidkarte des pSIM5-Tet.** Die Lambda-Red-Proteine Gam, Exo und Beta sind in blau markiert und für die homologe Rekombination verantwortlich.

### 3.2.8 Site-directed Mutagenese

Die Site-directed Mutagenese (ortsspezifische Mutagenese) ist ein *in vitro* Verfahren, bei dem spezifische Primer verwendet werden, um Nukleotide an einer gewünschten Stelle in einem Plasmid zu verändern (Abb. 12).



**Abb. 12: Primerdesign für die Site-directed Mutagenese.**

Verwendet wurde ein Primerdesign, das Rücken an Rücken orientiert ist. Die Mutagenese wurde mit dem Q5<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit von NEB nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.2.9 Validierung der Mutanten mittels Sanger Sequenzierung

Nachdem Mutanten oder Umklonierungen mittels PCR bzw. Restriktionsanalyse bestätigt wurden, wurden diese mittels Sanger Sequenzierung validiert. Die Sequenzierung nach Sanger diente der Bestimmung der Nukleotidsequenz. Dabei sollte die erwartete Sequenz bekannt sein. Die Sequenzierung wurde aus PCR-Produkten oder isolierter DNA (siehe Abschnitt 3.2.7) von der Firma Eurofins Genomics durchgeführt. Verwendet wurde dafür das Mix2Seq Kit nach Herstellerangaben. Zur Validierung der sequenzierten Nukleotidsequenz wurde *search page blastn* des NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit der jeweiligen Referenz (pV163M, pUC19::*p9*, pCF13069 oder pKD4::*hyg*) verwendet.

### 3.2.10 Validierung der Mutanten mittels Next Generation Sequenzierung (NGS)

Von den Klonen, die bereits mittels Sanger Sequenzierung als positive Mutanten bestätigt wurden, wird eine ÜNK angesetzt. Aus 1 mL ÜNK wurden mithilfe des PureLink™ Genomic DNA Mini Kit nach Herstellerangaben genomische DNA isoliert. Danach wurde eine Nextera XT *library* des Genoms (Illumina, San Diego, USA) nach Herstellerangaben erzeugt und mithilfe der NextSeq 500-Maschine in einem 2x150 bp-Lauf sequenziert. Die Rohdaten wurden mit dem Programm SPAdes zu *contigs* assembliert (Bankevich et al., 2012; Schwengers et al., 2020).

Zur Validierung der Mutanten wurde die *search page blastn* des NCBI verwendet (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Als Referenz diente bei der Mutagenese von *p9* in pV163M das Plasmid pV163M (*query*), bei der Mutagenese von *p9* in pUC19 (pUC19::*p9*) die Sequenz des hypothetischen Proteins 9 (*p9*) (*subject*). Das *blastn* Ergebnis wurde als *hit table* in Microsoft Excel geöffnet und die Anzahl der *gaps* und *mismatches* überprüft. *Contigs* mit 0 *gaps* und 0 *mismatches* galten als fehlerfrei. War die gesamte Sequenz bis auf den zu erwartenden mutierten Bereich von fehlerfreien *contigs* abgedeckt, galt die Site-directed Mutante als fehlerfrei.

### 3.2.11 His-Tag-Protein-Aufreinigung

Für die His-Tag-Protein-Aufreinigung musste zunächst das Zell-Lysat des Protein-kodierenden Isolates hergestellt werden. Dafür wurde eine ÜNK 1:60 verdünnt und bei 37°C und 180 rpm so lange inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht war. Danach erfolgte die Zugabe von IPTG, sodass eine Endkonzentration von 1 mM erreicht wurde. Die Kultur wurde für weitere vier

## Methoden

Stunden bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden jeweils 5 mL Zell-Aliquots bei 4000 x g für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde bei -20°C eingefroren.

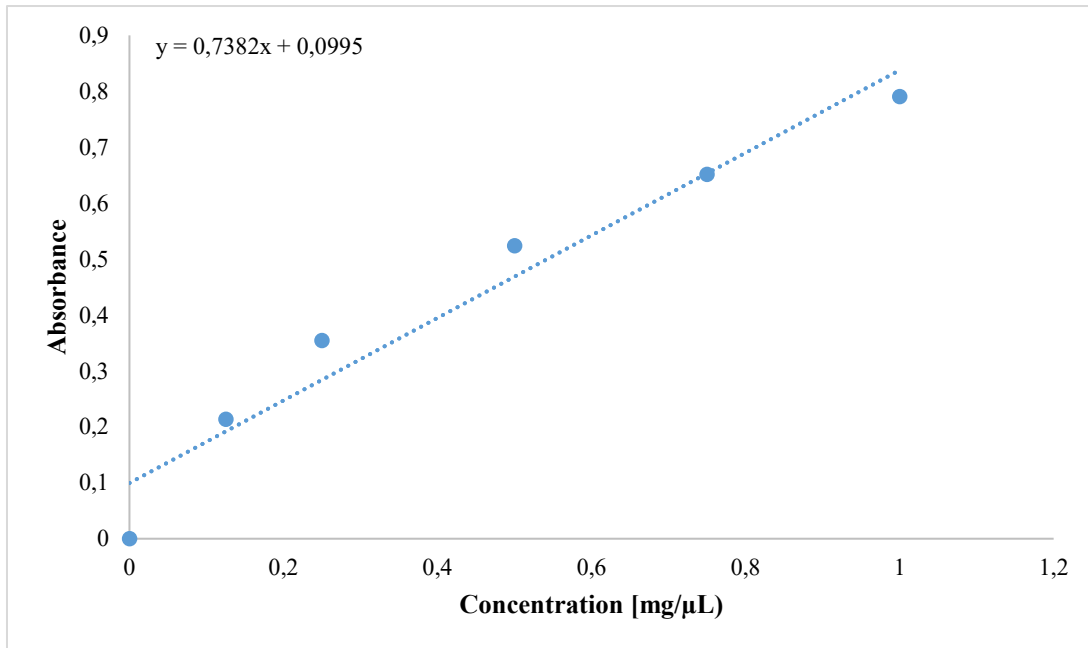
Am nächsten Tag wurde das Zellpellet aus 5 mL Aliquots in einem Volumen von 630 µL Lysis-Puffer resuspendiert. Es wurden außerdem 70 µL Lysozym (Stock-Lösung 10 mg/mL) und 3 Units/mL Kultur Volumen Benzonase® Nuclease (purity ≥99%) hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min. Anschließend wurde das Lysat für 30 min bei 4000 x g bei 4°C abzentrifugiert. Vom klaren Lysat wurden 20 µL als „Lysatkontrolle“ für das SDS-PAGE-Gel in ein Reagenzröhrchen gesammelt und bis zum Beladen des Gels bei 4°C gelagert. 600 µL des Lysats wurden auf eine mit 600 µL Lysis-Puffer equilibrierte NTA-Säule aufgetragen. Die Säule wurde bei 1600 rpm für 5 min (RT) abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde als „Durchflusskontrolle“ für das SDS-PAGE-Gel gesammelt. Die Säule wurde anschließend mit 600 µL Wasch-Puffer zweimal gewaschen und bei 2900 rpm für 2 min abzentrifugiert. Das Eluieren der Proteine erfolgte zweimal mit 300 µL Elutionspuffer und wird für 2 min 2900 rpm abzentrifugiert. Das Eluat wurde bei -20°C gelagert.

### 3.2.12 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wird zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen verwendet. Nachdem die Proben aufgereinigt wurden, wurde mit His-Tag Protein Expression Check Kit getestet, ob ein His-Tag vorhanden war. Das Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben.

#### 3.2.12.1 Bradford-Assay

Der Bradford-Assay ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976). Zur Bestimmung der Konzentration einer eigenen Probe musste zunächst eine Standardkurve mit einer Referenzsubstanz erstellt werden. Für diese Standardreihe wurde Rinderserumalbumin (BSA) mit einer Konzentration von 125-1000 µg/mL verwendet. Das 1X Dye Reagent wurde aus dem Kühlschrank genommen und auf RT aufgewärmt. Dann wurden jeweils 5 µL der BSA-Standards und der unbekannt Probe in ein sauberes Loch einer 96-well Mikrotiterplatten pipettiert. Es erfolgte die Zugabe von 250 µL 1X Dye Reagent. Die Reaktion wurde für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die OD<sub>595</sub> im TECAN gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der in Excel erstellten BSA-Standardkurve (Abb. 13).



**Abb. 13: Beispiel einer BSA-Standardkurve mit sechs Punkten in Excel.** Verwendet wurde ein Punkt zu Punkt-Diagramm der einzelnen Konzentrationen der Standardreihe. Die gepunktete Linie ist die lineare Regression, aus der die Regressionsgleichung ermittelt werden konnte.

### 3.2.12.2 SDS-PAGE

Das SDS-PAGE wurde mit den Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup> Gel durchgeführt. Dieses vorgefertigte Gel ist für die Auftrennung einer weiten Bandbreite an Proteingrößen geeignet. Dafür wurde zunächst der Tris/Glycine/SDS Electrophoresis Buffer (10x) auf 1x verdünnt. Im nächsten Schritt wurde das Gel vorbereitet. Dafür wurde der Kamm aus dem vorgefertigten Gel gezogen und das Klebeband von der Unterseite des Gels entfernt. Als nächstes wurde der innere (200 mL) und äußere Behälter der Elektrophorese-Kammer (2 Gele 550 mL) mit Lauf-Puffer gefüllt. Danach wurden die Proben vorbereitet, indem 5 μL Probe mit 5 μL Laemmli Sample buffer gemischt wurden. Diese Proben wurden bei 90°C für 5 min erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Am Rand wurden der BenchMark<sup>™</sup> His-tagged Protein Standard zur Detektion des His-Tag markierten Proteins und der Precision Plus Protein<sup>™</sup> Dual Xtra Standards aufgetragen. Die Elektrophorese-Kammer wurde an den Stromgeber angeschlossen und das SDS-PAGE-Gel bei einer Spannung von 200 V für 30 min aufgetrennt. Nach dem Abschluss der Elektrophorese wurde die elektrische Spannung abgetrennt, das SDS-Gel aus der Gelkammer herausgelöst und in Wasser gelegt.

### 3.2.12.3 Färben der Gele

Das Gel wurde als erstes mit dem InVision™ His-Tag In-Gel Stain gefärbt. Dies ist ein gebrauchsfertiges hochsensibles Färbemittel und dient der Visualisierung von His-Tag-markierten Protein direkt im SDS-Polyacrylamid-Gel, wodurch ein Western Blot nicht notwendig ist. Es ermöglicht den Nachweis von ~0,5 Pikomol eines 6xHis-Tag markierten Proteins (z. B. 1 Pikomol eines 30 kDa-Proteins entspricht 30 ng) (Herstellerangaben). Das Färben erfolgte nach Herstellerangaben. Nach dem Färben wurde das Gel 3-mal für jeweils 5 min in 200 mL ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach dem Waschen des Gels wurden His-Tag-markierte Proteine ähnlich wie Gel-Red-markierte DNA-Agarose-Gele unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und dokumentiert (z. B. mit dem BioRAD Geldokumentations-Gerät).

Anschließend war es möglich das SDS-Gel in 50 mL Bio-Safe™ Coomassie für eine Stunde zu färben, nachdem das Wasser vollständig entfernt wurde. Die Proteinbanden wurden bereits nach etwa 20 min sichtbar. Das Entfärben erfolgte mit 200 mL ddH<sub>2</sub>O für 30 min, um den Hintergrund zu reduzieren. Mit der letztgenannten Methode wurden alle Proteine im Gel sichtbar gemacht. Dadurch konnten unter anderem zusätzliche Banden im Eluat detektiert werden.

### 3.2.12.4 Matrix unterstützte Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Die MALDI-TOF-MS Analyse dient der Proteinidentifizierung und wurde am Biochemischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Apl. Prof. Dr. Günter Lochnit durchgeführt.

Für die Analyse wurde ein SDS-PAGE, wie in Kapitel 3.2.12.2 beschrieben, angefertigt und anschließend mit Bio-Safe™ Coomassie, wie in Kapitel 3.2.12.3 beschrieben, gefärbt. Die im Gel sichtbaren Banden im Bereich zwischen 15 kDa und 20 kDa wurden auf einer sauberen Glasplatte ausgeschnitten. Dies war wichtig, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die aus dem Gel extrahierten Proteine wurden nach der Reduktion und Carbamidomethylierung mit Trypsin verdaut und mit C18-ZipTips entsalzt. Die MALDI-TOF-MS Analyse wurde mit einem Ultraflex TOF/TOF-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen), welches mit einem Stickstofflaser und einer LIFT-MS/MS-Anlage ausgestattet ist, durchgeführt. Das Gerät wurde im Positiv-Ionen-Reflektron-Modus mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure und Methylendiphosphonsäure als Matrix betrieben. Aufgenommen wurden Summenspektren, die aus 200-400 Einzelspektren bestehen. Für die Kalibrierung wurde ein Peptidstandard verwendet (Bruker

Daltonics). Die Datenverarbeitung und Gerätesteuerung wurde mit dem Softwarepaket Compass 1.4 durchgeführt. Dieses bestand aus FlexControl 4.4, FlexAnalysis 3.4.4, Sequence Editor und BioTools 3.2.

Die Proteine wurden anschließend mittels MASCOT Peptid-Massen-Fingerprint-Suche (<http://www.matrixscience.com>) in der Swissprot-Datenbank (2019\_11, 561568 Sequenzeinträge) identifiziert. Die Suche wurde dabei auf Bakterien beschränkt.

### 3.3 Charakterisierungs-Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden verwendet, um zu ermitteln, ob die Komplementation funktioniert oder welche Auswirkungen die erstellten Mutationen im *p9* Gen des pV163M Plasmids oder in pUC19::*p9* haben.

#### 3.3.1 Wachstumsanalyse

Für die Erstellung der Wachstumskurven wurden die Plasmide in *E. coli* DH10 $\beta$  transformiert. Von diesen Transformanten wurden ÜNK angesetzt, die am nächsten Tag auf eine OD<sub>600</sub> von 1,0 verdünnt wurden. Anschließend wurden 298  $\mu$ L LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum in ein Loch einer 96-well Mikrotiterplatten pipettiert. Es erfolgte die Zugabe von 2  $\mu$ L der verdünnten Proben. Es wurden jeweils drei Ansätze pro Probe als Replikate aufgetragen. Als Blank wurden 298  $\mu$ L LB-Medium ohne Antibiotikum verwendet. Die Bestimmung des Wachstums erfolgte über die OD<sub>600</sub> im NanoQuant Infinite M200 Pro (TECAN) im fünfminütigen Intervall über einen Zeitraum von 20 Stunden. Aus den drei Messwerten pro Probe (technische Replikate) wurden die Mittelwerte gebildet und der Blank abgezogen. Aus diesen Werten wurden die Wachstumskurven mit Microsoft Excel erstellt.

#### 3.3.2 Bestimmung der Verdopplungsraten

Die Verdopplungsraten wurden mit dem Programm Growthrates 6.2 (Bellingham Research Institute) (Hall et al., 2014) aus den erstellten Wachstumskurven berechnet. Dazu wurden in Microsoft Excel die Mittelwerte der technischen Replikate der OD<sub>600</sub> für jeden Messwert gebildet. Diese wurden in eine Standardtabelle eingetragen (Abb. 14) und als .txt-Datei gespeichert.

## Methoden

Min	A1	A2	A3	A4	A5
0	0.0855	0.0915	0.0907	0.0902	0.0907
5	0.0856	0.0915	0.0907	0.0903	0.0912
10	0.0855	0.0916	0.0909	0.0907	0.0916
15	0.0857	0.0918	0.0909	0.0907	0.0915
20	0.0857	0.0919	0.0910	0.0907	0.0916
25	0.0858	0.0921	0.0913	0.0910	0.0918
30	0.0861	0.0924	0.0915	0.0911	0.0921
35	0.0859	0.0923	0.0916	0.0910	0.0923
40	0.0859	0.0924	0.0918	0.0912	0.0924
45	0.0859	0.0927	0.0920	0.0913	0.0925
50	0.0858	0.0926	0.0920	0.0915	0.0925
55	0.0858	0.0928	0.0923	0.0914	0.0927
60	0.0857	0.0930	0.0924	0.0915	0.0929
65	0.0856	0.0931	0.0926	0.0917	0.0931
70	0.0856	0.0932	0.0929	0.0919	0.0932
75	0.0856	0.0933	0.0929	0.0920	0.0936
80	0.0855	0.0935	0.0932	0.0923	0.0936
85	0.0855	0.0936	0.0933	0.0925	0.0938
90	0.0856	0.0937	0.0936	0.0927	0.0940
95	0.0853	0.0938	0.0938	0.0932	0.0942
100	0.0852	0.0942	0.0941	0.0936	0.0947

**Abb. 14: Ausschnitt einer verwendeten Standardtabelle.**

Diese Tabelle wurde als Grundlage für die Berechnungen durch das Programm Growthrates 6.2 verwendet. Als Ergebnis erstellt das Programm eine *results*- (Abb. 15) und eine *summary*-Datei (Abb. 16).

```

*****
                                  Well A1
The growth rate was zero so no results are reported.
*****

*****
                                  Well A2
13 points from 190.0 through 250.0 minutes were used to estimate the growth rate.
The growth rate ± s.e. is 0.01942 ± 0.000154 per minute or 1.1651 ± 0.00924 per hour .
This is equivalent to a doubling time of 35.7 ± 0.28 minutes.
The correlation coefficient R is 0.99965
The maximum OD is 0.8423.
The lag time is 109.1 minutes
*****

```

**Abb. 15: Ausschnitt einer results-Datei.** Es werden die Wachstumsraten pro Minute oder pro Stunde angegeben. Außerdem errechnet das Programm die Verdopplungsraten, gibt den Korrelationskoeffizienten R an, bestimmt die maximale OD<sub>600</sub> und die lag Zeit.

Well	Growth Rate	Growth Rate	R	Max OD	lag time (minutes)
	min	hours			
A1	0.00	0.0	----	----	
A2	0.01942	1.165	0.99965	0.8423	109.1
A3	0.01548	0.929	0.99967	0.7438	84.0
A4	0.02254	1.353	0.99952	0.7321	94.0
A5	0.015	0.9	0.99958	0.4832	86.8
A6	0.01652	0.991	0.99963	0.518	102.8
A7	0.02151	1.291	0.99967	0.7277	66.7
A8	0.01619	0.972	0.99925	0.5322	120.1

**Abb. 16: Ausschnitt einer summary-Datei.** Dies ist eine tabellarische Zusammenfassung der results-Datei und gibt dieselben Werte an.

In der *results*-Datei wurden die berechneten Wachstumsraten und Verdopplungsraten mit Standardabweichung, der Korrelationskoeffizient R, die maximale OD<sub>600</sub> und die lag-Zeiten angegeben. Die *summary*-Datei gab dieselben Werte in tabellarischer Weise an. Der Korrelationskoeffizient R sollte bei >0,99 liegen. War der Wert kleiner, konnte das Programm die Verdopplungsraten nicht korrekt bestimmen. Dies passierte z. B. dann, wenn die Wachstumskurve starke

Abweichungen innerhalb der einzelnen Zeitpunkte zeigte. Wachstumskurven mit einem  $R < 0,99$  wurden aus der Auswertung herausgenommen, also nicht verwendet.

### 3.3.3 Konjugationsversuche

Zur Bestimmung der Konjugationseffizienz wurde *E. coli* DH10 $\beta$  als Donor und der Stamm *E. coli* J53 als Rezeptor verwendet. Da der Stamm *E. coli* J53 eine Resistenz gegenüber Natriumazid (NaZ) besitzt, erfolgte nach erfolgreicher Konjugation eine Doppel-Selektion mit NaZ und dem entsprechenden Antibiotikum. Als erstes wurden LB-Agarplatten ohne Antibiotikum unter der Steril-Werkbank für etwa 20 min zum Trocknen hingelegt. Die Proben wurden anschließend auf eine OD<sub>600</sub> von 2,0 verdünnt, indem diese aus der ÜNK am Spektralphotometer bestimmt wurden. Die jeweils errechnete Menge wurde bei 5000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL LB-Medium resuspendiert. Dieser Schritt diente dazu das Antibiotikum zu entfernen, welches für die Anzucht verwendet wurde und wurde zweimal wiederholt. Danach kann der Konjugationsansatz (100  $\mu$ L Rezeptor und 50  $\mu$ L Donor) in einem frischen 1,5 mL Reaktionsgefäß gemischt werden. Der komplette Ansatz wurde dann mittig in der zuvor getrocknet LB-Agarplatte pipettiert und für 20 min bei RT zum Trocknen stehen gelassen. Danach wurden die Platten für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Um die eingesetzte Zellzahl bestimmen zu können, wurden die verwendeten Bakteriensuspensionen in einer Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$ - $10^{-7}$ ) in Phosphat gepufferter Saline (PBS) verdünnt und die Verdünnungsstufen  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  ausplattiert (100  $\mu$ L). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und die gewachsenen Kolonien am nächsten Tag gezählt. Daraus kann die *colony forming units* (*cfu*) bestimmt werden.

Nach Ablauf der vier Stunden Inkubation des Konjugationsansatzes wurde das gesamte Zellmaterial mit einer Impföse von der Platte abgenommen und in 1 ml PBS resuspendiert. Zum Lösen der Bakterien wurde jeder Ansatz für 1 min auf dem Vortex durchmischt. Anschließend wurde eine weitere Verdünnungsreihe in PBS angesetzt und die Verdünnungsstufen  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  auf LB-Selektionsplatten mit NaZ und dem entsprechenden Antibiotikum (z. B. Km) ausplattiert (100  $\mu$ L). Die Inkubation dieser Platten erfolgte für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank. Danach konnten ebenfalls die *cfu* der einzelnen Ansätze bestimmt und die Konjugationseffizienz mit folgender Formel berechnet werden:

**Formel 1: Berechnung der Konjugationseffizienz**

$$\text{Konjugationseffizienz} = \frac{\text{cfu (Transkonjugant)}}{\text{cfu (Donor)}}$$

Anschließend wurde der Mittelwert der Konjugationseffizienz der Verdünnungsstufen  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  berechnet. Um die relativen Konjugationseffizienzen besser vergleichen zu können, wurde die des WT auf 1,0 gesetzt, indem der Mittelwert durch sich selbst dividiert wurde. Die berechneten Konjugationseffizienzen der einzelnen Donoren wurden ebenfalls durch die des WT dividiert und anschließend graphisch aufgetragen.

### 3.3.4 Bestimmung der Plasmidkopienzahl durch Nanopore-Sequenzierung

Für die Plasmidkopienzahl-Bestimmung wurde das Rapid Barcoding Sequencing Kit von Nanopore verwendet. Als erstes wurden 400 ng genomische DNA in einem sauberen 0,2 mL PCR-Tube mit Aqua a.i. auf ein Gesamt-Volumen von 7,5  $\mu$ L aufgefüllt. Die Mischung wurde vorsichtig durchmischt und in der Mikrozentrifuge kurz runterzentrifugiert. Für das Barcoding wurden anschließend jeweils 2,5  $\mu$ L Fragmentation Mix RB01-12 pro Probe hinzugegeben (jeweils ein individueller Barcode pro Probe). Die Mischung wurde kurz vorsichtig durchmischt und wieder kurz zentrifugiert. Die Proben wurden für 1 min bei 30°C und anschließend bei 80°C im PCR-Cycler inkubiert und dann auf Eis gestellt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben in ein sauberes 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß vereinigt und das Gesamt-Volumen notiert. Die AMPure XP beads wurden durch vortexen resuspendiert und dasselbe Volumen an AMPure XP beads zu den Proben hinzugegeben. Die Proben wurden für 5 min bei 29 rpm auf einem Hula-Mixer inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert und auf einem Magnet-Ständer pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet 2x mit 200  $\mu$ L frisch hergestelltem 70%igem Ethanol gewaschen. Die Ethanolreste wurden durch Zentrifugation und kurzes Trocknen an der Luft vollständig entfernt. Das Pellet wurde anschließend in 12  $\mu$ L 10 mM Tris-HCl pH 7,5-8,0 mit 50 mM NaCl resuspendiert. Es erfolgte eine Inkubation für 2 min bei RT. Anschließend wurden die Beads auf dem Magnet-Ständer pelletiert und 10  $\mu$ L des Eluats in ein sauberes 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß gegeben und die Beads verworfen. Zu den 10  $\mu$ L der gepoolten barcodeten DNA wurden 1  $\mu$ L RAP-Puffer gegeben und bei RT für 5 min inkubiert.

Nachdem die Proben vorbereitet waren, konnte nun die MinION flow cell im MinION Mk1B-Gerät positioniert werden. Zur Vorbereitung wurde als erstes der Priming Port der flow cell geöffnet und die Luftblasen entfernt, indem etwas vom *storage* Puffer entfernt wurde. Zur Herstellung des Flow Cell Priming Mixes wurden 30  $\mu$ L des Flush Tether (FLT) zu einem Aliquot Flush Buffer (FB) gegeben. Vom priming Mix wurden 800  $\mu$ L vorsichtig in den priming Port gegeben, ohne Luftblasen einzuführen, und für 5 min bei RT inkubiert. Zum Ansetzen der finalen Library wurden zu der mit RAP-Puffer gemischten aufgereinigten, barcodeten DNA 34  $\mu$ L

## Methoden

Sequencing Buffer (SQB), 25,5 µL Loading Beads (LB) und 4,5 µL Nuklease-freies Wasser gegeben. Das Flow Cell Priming wurde beendet, indem der SpotON sample Port geöffnet wurde und weitere 200 µL des Flow Cell priming Mixes in den priming Port gegeben werden. Die Library wurde durch vorsichtiges auf und ab pipettieren gemischt und tropfenweise vollständig in den SpotON sample Port aufgetragen. Beide Ports wurden abschließend geschlossen und die Sequenzierung wurde am PC gestartet.

Nach der Nanopore-Sequenzierung erfolgte das Mapping der Roh-Daten (Reads) mit dem Programm CLC Genomics Workbench 12.0. Für das Mapping der Nanopore-Reads wurden die Parameter auf 50% Abdeckung und 80% Identität eingestellt. Als Referenzen dienten das *E. coli*-DH10β Genom (NCBI-Referenznummer: NC\_010473.1) und pV163M (NCBI-Referenznummer: MF381176.1). Mit CLC wurde nach dem Mapping die Abdeckung („coverage“) dieser beiden Referenzen bestimmt. Die relative Abdeckung wurde über die folgende Formel bestimmt:

**Formel 2: Berechnung der Plasmidkopienzahl**

$$\text{Plasmidkopienzahl} = \frac{\text{coverage pV163M}}{\text{coverage DH10}\beta}$$

### 3.4 Bioinformatische Methode

Da die Funktion des P9 Proteins weitgehend unbekannt ist, wurde eine *In silico* Analyse durchgeführt, um nähere Informationen zu erhalten. Diese wurde zunächst mit dem Programm ProDom durchgeführt. ProDom ist eine umfassende Datenbank, welche die Familien von Proteindomänen aus allen verfügbaren Proteinsequenzen enthält (Bru et al., 2005) und einen Vergleich damit durchführt. Des Weiteren wurde eine Clustal Omega Analyse durchgeführt, in der die P9 Proteinsequenz mit der P9-like-Proteine aus anderen Plasmiden verglichen wurde. Clustal Omega ist ein Programm zur Erstellung von multiplen Sequenzalignments in einer rechnerisch effizienten und genauen Weise. Es erzeugt biologische aussagekräftige multiple Sequenzalignments von divergenten Sequenzen (Sievers & Higgins, 2018).

### 3.5 Datenauswertung

Für die Auswertung und Bearbeitung der erhobenen Daten wurde das Programm Excel (Microsoft Office 365, 2021) verwendet. Die graphische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit

## Methoden

dem Programm SigmaPlot 10.0. Informationen zur Anzahl technischer Replikate bzw. biologischer Replikate sind aus den Bildunterschriften zu entnehmen. Zur statistischen Auswertung wurden die Mittelwerte der Wachstumsanalysen von zwei Versuchsgruppen miteinander verglichen. Die Berechnungen wurden mittels Student's t Test in RStudio (R Core Team, 2021) durchgeführt. Dabei wurde ein p-Wert von  $* \leq 0,05$ ;  $** \leq 0,01$  und  $*** \leq 0,001$  als statistisch signifikant angenommen. Ein p-Wert  $>0,05$  galt als nicht signifikant.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 IncN

Das Resistenzplasmid pCF13069 (NCBI-Referenznummer: NZ\_VKMZ01000118) wurde aus einem klinischen, Carbapenem-resistenten *Citrobacter freundii* isoliert und gehört zur Plasmid-Inkompatibilitätsgruppe (Inc) N (Abb. 17).

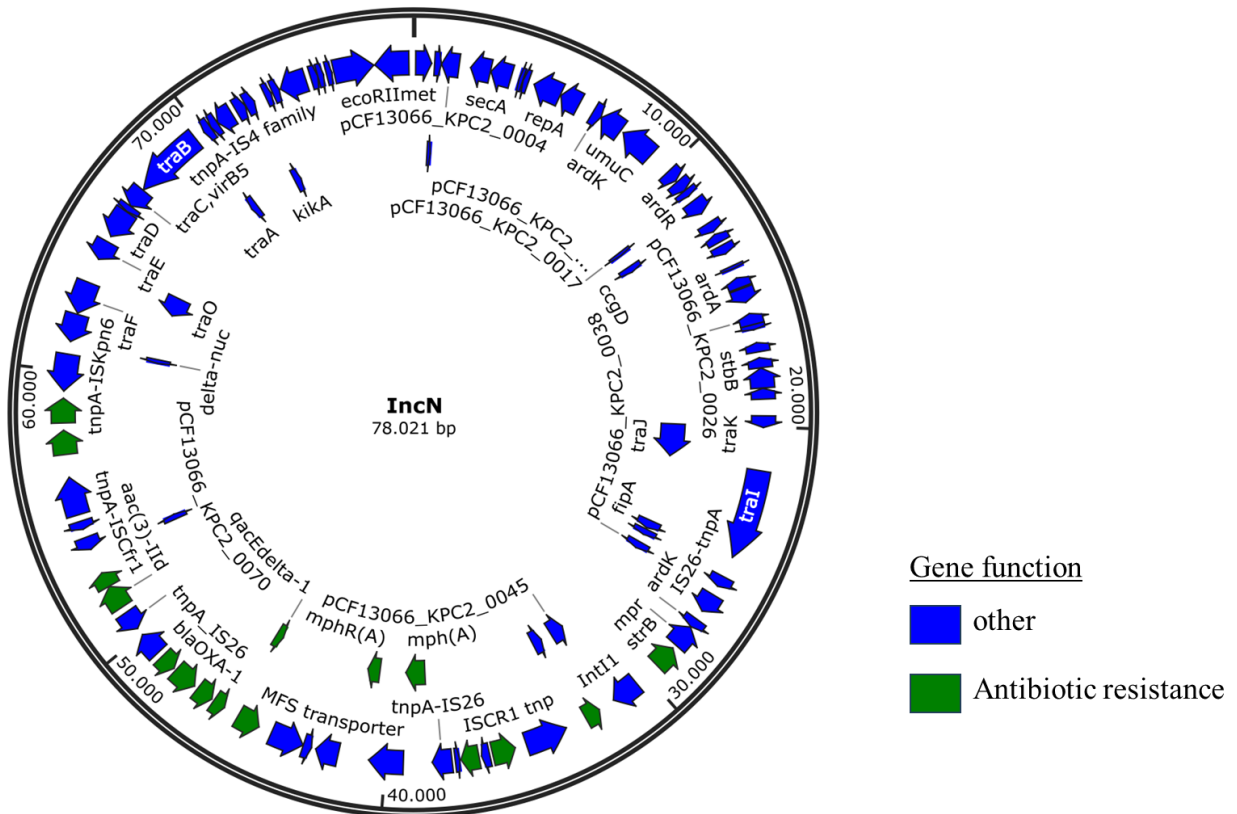


Abb. 17: Plasmidkarte des Resistenzplasmids pCF13069 (in Referenz: pCP13069-KPC2) (Yao et al., 2024). Die Gene wurden mit grün (Antibiotika Resistenzgene) und blau (Gene mit einer anderen Funktion) markiert.

Dieses Plasmid hat sich als ein sehr erfolgreiches Plasmid dargestellt (weit verbreitet über Hessen hinweg und in vielen unterschiedlichen Spezies zu finden), und sollte daher auf diesen Erfolg hin mittels Mutagenese bestimmter Bereiche (siehe Abschnitt 3.2.8) überprüft werden (Yao et al., 2024).

Zur Herstellung der Deletionsmutanten sollte die Lambda-Red-Mutagenese verwendet werden. Bevor Deletionsmutanten hergestellt werden können, wurde das Plasmid mittels der Website Center for Genomic Epidemiology (<https://www.genomicepidemiology.org>) auf möglich Resistenzgene analysiert, um zu ermitteln, ob die klassischerweise für die Lambda-Red-Mutagenese verwendeten Mutagenese-Plasmide (pKD3, pKD4, pKD46) verwendet werden könnten.

## Ergebnisse

Bei dieser Analyse zeigte sich, dass pCF13069 Resistenzgene trägt, die gegen sieben verschiedene Antibiotikaklassen eine Resistenz verursachen. Dazu gehören Aminoglykoside, Phenicol, Beta-Laktame, Makrolide, Fluorchinolone, Rifampicin sowie Folsäure-Antagonisten (Tab. 24).

**Tab. 24: Auflistung der Antibiotikaklassen gegen die pCF13069 eine Resistenz besitzt mit den dazugehörigen Antibiotika.**

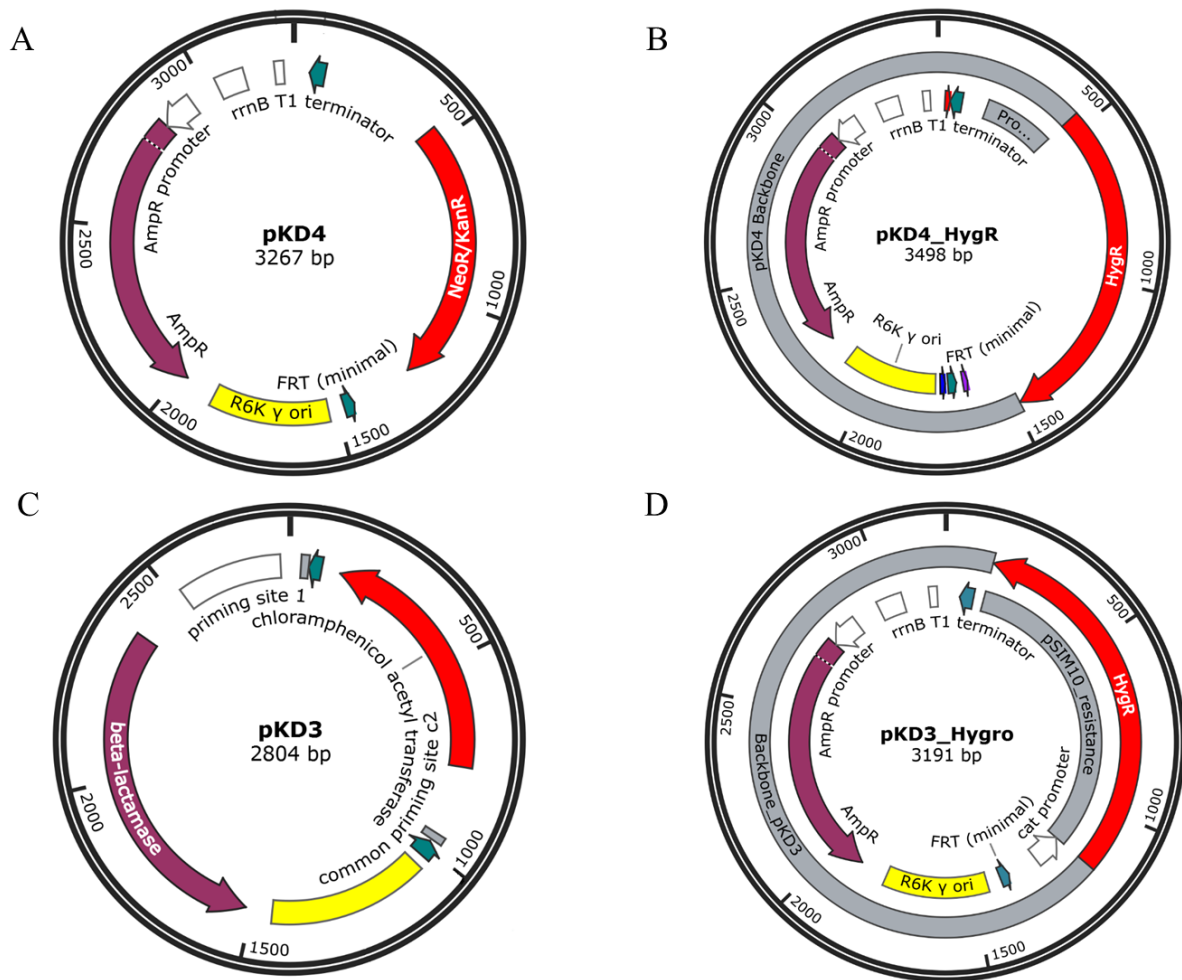
<b>Antibiotikaklasse</b>	<b>Antibiotikum</b>
Aminoglykoside	Gentamicin, Tobramycin, Streptomycin, Amikacin, Dibekacin, Netilmicin, Apramycin, Sisomicin
Phenicol	Chloramphenicol
Beta-Laktame	Amoxicillin, Amoxicillin + Clavulansäure, Ampicillin, Ampicillin + Clavulansäure, Cefepim, Cefotaxim, Cefoxitin, Ceftazidim, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Piperacillin, Piperacillin + Tazobactam, Aztreonam, Ticarcillin, Ticarcillin + Clavulansäure, Cephalothin
Makrolide	Erythromycin, Azithromycin, Spiramycin, Telithromycin
Fluorchinolone	Fluorchinolone, Ciprofloxacin
Rifampicin	Rifampicin
Folsäure-Antagonisten	Sulfamethoxazole, Trimethoprim

Aufgrund des Vorhandenseins aller dieser Resistenzen in pCF13069 können pKD3 (Cm<sup>R</sup>), pKD4 (Kan<sup>R</sup>) und pKD46 (Ap<sup>R</sup>) nicht für die Lambda-Red-Mutagenese verwendet werden. Als Alternative zu pKD46 wurde daher pSIM5-Tet verwendet (Koskiniemi et al., 2011). Für pKD3 und pKD4 standen aktuell keine Alternativen zur Verfügung. Aufgrund dieser Tatsache musste der Austausch der in pKD3/4 vorhandenen Antibiotika-Resistenzkassetten mit einer anderen Antibiotika-Resistenzkassette in Angriff genommen werden (siehe Abschnitt 4.1.1).

In einem Vor-Versuch wurden zunächst verschiedene Antibiotika getestet, gegen die keine Resistenzgene auf pCF13069 vorhanden waren. Dabei wurde das Hygromycin ausgewählt, da mit pCF13069 konjugierte Bakterien bei diesem Antibiotikum nur ein sehr geringes, bis gar kein Wachstum aufweisen (optische Dichte). Das Hygromycin-Resistenz-Gen, welches in die für die Lambda-Red-Mutagenese-Methode verwendeten Vektoren pKD3 und pKD4 eingebracht werden soll, stammt von einem pCMV-Vektor (pCMV-Hygro), welcher ein Mammalian Expressionsvektor mit einem CMV-Promotor ist.

#### 4.1.1 Klonierung der Hygromycin-Resistenzkassette in pKD3/pKD4

Da das Resistenzplasmid pCF13069 eine natürliche Resistenz gegen Chloramphenicol und Kanamycin besitzt, konnten die Plasmide pKD3 und pKD4 nicht für die Lambda-Red-Mutagenese verwendet werden (siehe Abb. 9), da auch sie jeweils eine Resistenz gegen Chloramphenicol (pKD3) oder Kanamycin (pKD4) tragen. Daher mussten in beiden Plasmiden zunächst die vorhandenen Resistenzgene gegen das Hygromycin-Resistenzgen ausgetauscht werden (resultierende Plasmide pKD4-Hyg/pKD3-Hyg) (Abb. 18).

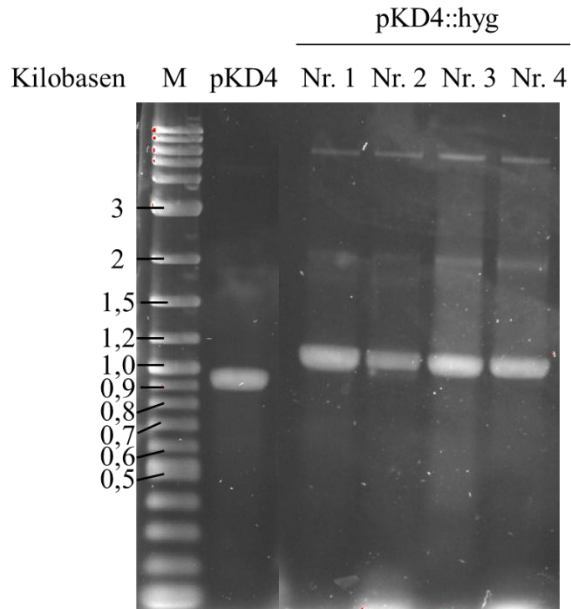


**Abb. 18: Plasmidkarte von pKD4 und pKD4-Hyg.** (A) Das Plasmid pKD4 mit der Kanamycinresistenz. (B) Das pKD4 Plasmid nach dem Austausch von Kanamycin- zu Hygromycin-Resistenz. Der graue Bereich kennzeichnet das pKD4 Backbone und der rote Bereich die Position des ausgetauschten Resistenzgens. (C) Das Plasmid pKD3 mit der Chloramphenicolresistenz. (D) Das pKD3 nach dem Austausch von Chloramphenicol- zu Hygromycin-Resistenz. Der graue Bereich kennzeichnet das pKD4/pKD3 Backbone und der rote Bereich kennzeichnet in allen Plasmiden die Position des ausgetauschten Gens.

Dies wurde zunächst über das AQUA Cloning versucht (siehe Abschnitt 3.2.7). Die generierten Klone wurden sowohl durch eine Kontroll-PCR als auch durch eine Restriktionsanalyse untersucht, ob diese die richtige Größe aufweisen. Bei der Kontroll-PCR (Abb. 19) in möglichen

## Ergebnisse

pKD4-Hyg-Plasmiden wurde das Hygromycin-Resistenz-Gen in vier Klonen und das Kanamycin-Gen in der Positiv-Kontrolle (pKD4) amplifiziert. Bei allen Klonen konnten Banden der richtigen Größe (1165 bp, 934 bp) detektiert werden.

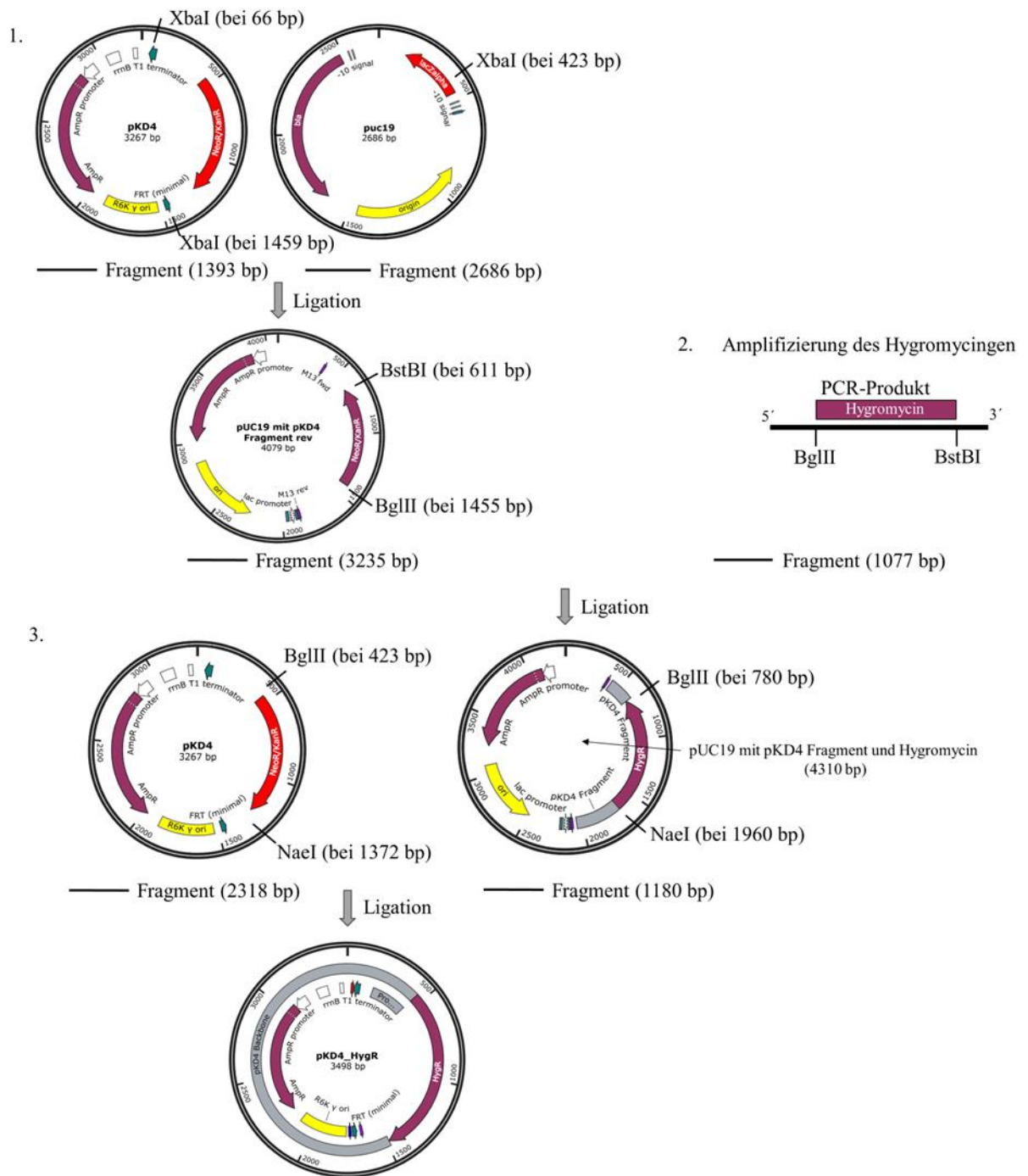


**Abb. 19: PCR zur Identifizierung positiver Klone von pKD4::hyg.** Die Proben wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Für die Amplifizierung der Hygromycin-Resistenzkassette wurde die *Taq*-Polymerase verwendet. Als Marker (M) wurde der 1 kb Plus DNA Ladder verwendet. Als positiv Kontrolle diente pKD4. Die Signale waren bei 1165 bp für pKD4::hyg und bei 934 bp für pKD4 zu erwarten.

Für die Restriktionsanalyse wurde das mögliche Plasmid pKD4::hyg mit dem Restriktionsenzym PvuI geschnitten. Das richtige pKD4::hyg weist zwei Schnittstellen für PvuI auf, wobei die Positiv-Kontrolle pKD4 lediglich eine Schnittstelle aufweist, also linearisiert wird. Ein richtig zusammengestelltes pKD4::hyg sollte Banden der Größe 1830 und 1663 bp aufweisen. Bei dem über Aqua cloning generierten pKD4::hyg wurden im Kontrollrestriktion allerdings Banden ermittelt, welche im Bereich von 3000 bp lagen. Dies entsprach nicht der richtigen Größe. Diese falsche Größe des mittels Aqua Cloning generierten pKD4::hyg wurde trotz zahlreicher Wiederholungen immer wieder gefunden. Die richtige Größe wurde in keinem der Versuche gefunden. Als Erklärung hierfür wurde ermittelt, dass die für das Aqua Cloning verwendeten Fragmente (pKD4-backbone und Hygromycin-Resistenz-Gen-Fragment) in einer falschen Art und Weise von der Zelle zusammgebaut worden waren, eines oder mehrere dieser Fragmente mehrfach. Aus diesem Grunde wurde das Aqua Cloning als Methode für die Herstellung von

## Ergebnisse

pKD4::*hyg* verworfen und das pKD4::*hyg* mittels klassischem Restriktionsverdau generiert (Abb. 20).



**Abb. 20: Schematische Darstellung der Umklonierung der Resistenzkassette in pKD4 durch Restriktionsverdau.** (1) Als Zwischenwirt wurde pUC19 verwendet. Die Plasmide pKD4 und pUC19 wurden mit XbaI geschnitten und die erhaltenen Fragmente ligiert. (2) Das Hygromycin-Resistenz-Gen wurde mittels PCR amplifiziert und mit BglII geschnitten. Es erfolgte eine weitere Ligation der Fragmente. (3) In einem weiteren Restriktionsverdau wurde pKD4 und pUC19 mit pKD4 Fragment und Hygromycin-Resistenz-Gen mit BglII und NaeI verdaut. Nach der Ligation der Fragmente wurde das umklonierte pKD4::*hyg* erhalten.

## Ergebnisse

Als Zwischenwirt wurde dafür pUC19 verwendet. Die Umklonierung erfolgte in mehreren Schritten, bestehend aus Restriktionsverdau, Gelelektrophorese, Dephosphorylierung und Ligation. Die analytische Gelelektrophorese diente zur Überprüfung der Fragmentgrößen. Da jedoch nach dem Verdau mehrere Fragmente erwartet wurden, wurden nach einer präparativen Gelelektrophorese die zu erwartenden Fragmentstücke aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Die Dephosphorylierung, war notwendig, um zu verhindern, dass die geschnittenen Plasmide während der Ligation wieder in sich selbst ligieren.

Im ersten Schritt wurden die Plasmide pKD4 und pUC19 mit XbaI verdaut. Die erhaltenen Fragmente (1393 bp, 2686 bp) wurden aus dem Gel isoliert, aufgereinigt und nach erfolgter Dephosphorylierung ligiert. Das erhaltene Plasmid pUC19 mit pKD4 Fragment wurde in einem zweiten Schritt mit BglIII und BstBI verdaut. Das Hygromycin-Resistenz-Gen wurde mittels PCR amplifiziert und das PCR-Produkt ebenfalls mit BglIII und BstBI verdaut. Es erfolgte die Ligation der beiden Fragmente (3235 bp, 1077 bp). Dadurch wurde das Plasmid pUC19 mit pKD4 Fragment und Hygromycin-Resistenz erhalten. In einem letzten Schritt wurde das Hygromycin-Resistenz-Gen aus dem zuvor durch Ligation erhaltenen Plasmid mit BglIII und NaeI herausgeschnitten. Gleichzeitig wurde pKD4 ebenfalls zur Entfernung des Kanamycin-Gens mit BglIII und NaeI verdaut. Die beiden Fragmente (2318 bp, 1180 bp) wurden zusammen ligiert und das endgültige Plasmid pKD4::*hyg* erhalten.

### 4.1.2 Etablierung der Lambda-Red-Mutagenese

Zur Etablierung der Lambda-Red-Mutagenese wurde zunächst das *lacZ*-Gen bzw. *LacZ $\alpha$* -Fragment in *E. coli* MG1655 bzw. *E. coli* DH10 $\beta$  mit pUC19 deletiert. Das *lacZ* Gen eignet sich zur Etablierung einer Methode zur Herstellung von Deletionsmutanten, da die Mutanten direkt nach der Mutagenese durch blaue und weiße Kolonien auf den LB-Agarplatten identifiziert werden können. Dies basiert auf dem Vorhandensein des natürlicherweise im *lac*-Operon kodierten *lacZ*-Gens, welches für die  $\beta$ -Galactosidase kodiert und es ihnen ermöglicht das Disaccharid Lactose in seine Bestandteile Glukose und Galactose zu hydrolysieren (Juers et al., 2012). Für die Laboranwendung wurden spezielle Laborstämme (z. B. *E. coli* DH10 $\beta$ ) entwickelt, die eine mutierte Version des chromosomalen *lacZ* enthalten. Dieser Mutante fehlt das sogenannte *lacZ $\alpha$* -Fragment. Es kann durch Plasmide, welche ein *lacZ $\alpha$* -Fragment tragen, wie z. B. pUC19, komplementiert werden.

Zur Unterscheidung der Kolonien, die *lacZ* (MG1655) oder das mutierte *lacZ* und das *lacZ $\alpha$* -Fragment (*E. coli* DH10 $\beta$  transformiert mit pUC19) tragen, muss zum Selektionsmedium zusätzlich X-Gal und IPTG hinzugegeben werden. IPTG dient als Induktor, indem es an das *lac*-

## Ergebnisse

Repressorprotein LacI bindet und die Transkription des *lac*-Operons einleitet. Die Färbung der Kolonien beruht darauf, dass die  $\beta$ -Galactosidase den gelben Farbstoff X-Gal in den blauen Indigo-Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo und Galactose spaltet. Die entstehenden weißen Kolonien sind somit Mutanten, welche kein *lacZ* oder verändertes *LacZ* im Falle von DH10 $\beta$  mehr enthalten, da die Galaktosidase durch das Fehlen des *lacZ*-Gens in diesen inaktiviert bleibt und keine blaue Färbung sichtbar ist.

Das *lacZ*-Gen konnte mit dieser Methode in *E. coli* MG1655 erfolgreich deletiert werden, da auf der LB-Agarplatte sowohl weiße als auch blaue Kolonien detektiert werden konnten (Abb. 21).

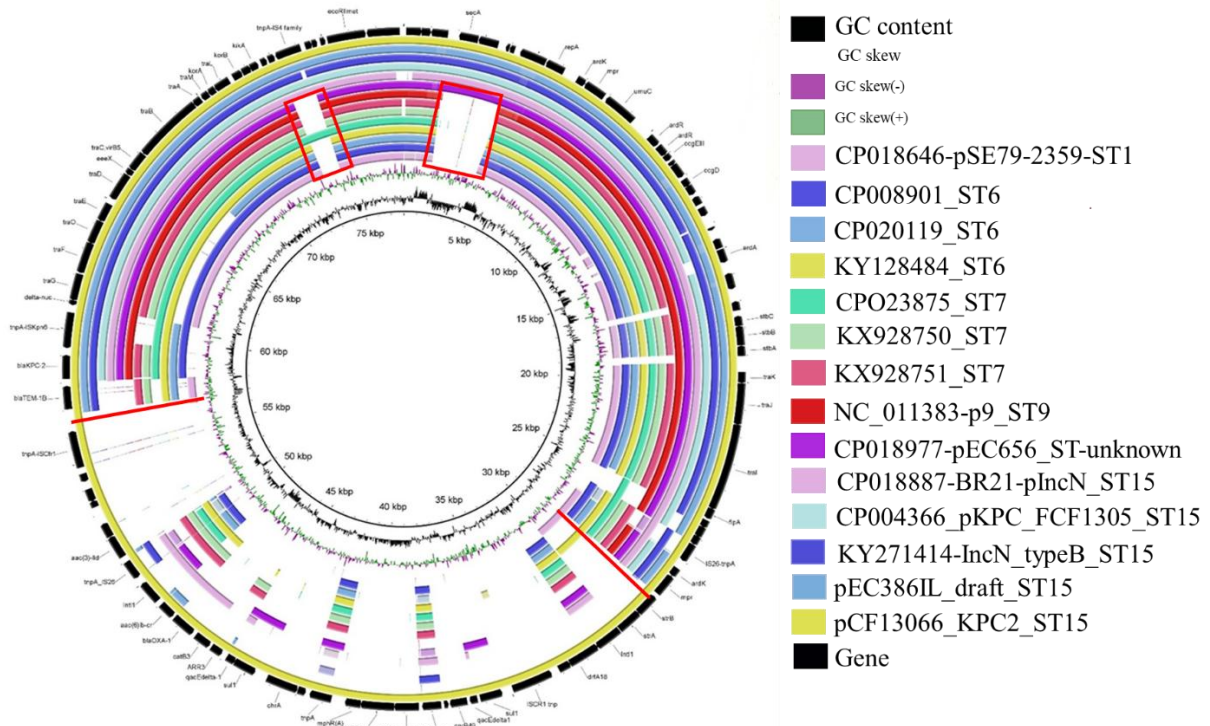


**Abb. 21: Blau-Weiß-Selektion nach Deletion des *lacZ*-Gen.** Ausschnitt einer LB-Agarplatte mit blauen und weißen Kolonien. Der rote Pfeil markiert einen positiven Klon.

In *E. coli* DH10 $\beta$ /pUC19 hatte die Deletion nicht funktioniert, da nur blaue Kolonien sichtbar waren. Auch nach mehrmaligen Wiederholungen konnten keine weißen Kolonien detektiert werden.

### 4.1.3 Lambda-Red-Mutagenese in pCF13069

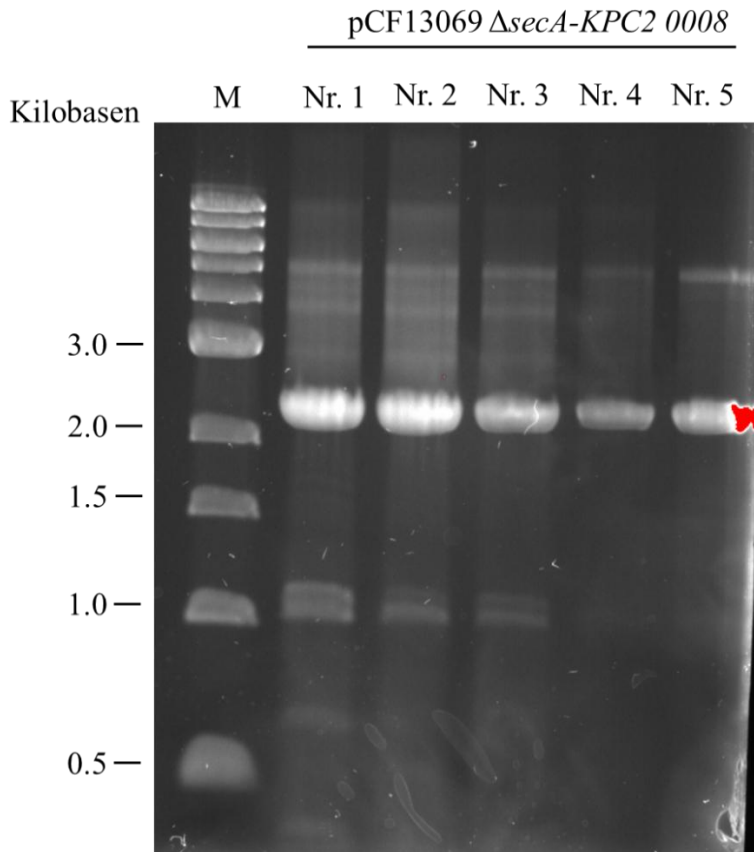
Nachdem die Lambda-Red-Mutagenese erfolgreich im Labor etabliert werden konnte, wurde versucht mit dieser Methode Deletionsmutanten im Resistenzplasmid pCF13069 zu erzeugen. Die Mutationsstellen wurden ausgewählt, indem die DNA-Sequenzen anderer IncN Plasmide mit unterschiedlichen Plasmid-Multilocus Sequenz-Typen (MLST) verglichen wurden. Dabei wurden drei Stellen ausgewählt, die im Plasmid pCF13069 vollständig vorhanden waren, in anderen Plasmiden jedoch fehlten (Abb. 22).



**Abb. 22: BRIG-Grafik der IncN Plasmide unterschiedlicher MLST.** In rot sind die Bereiche markiert, die deletiert werden sollen.

Die PCR-Fragmente, die für die Deletion eingesetzt wurden (angrenzende Bereiche der zu deletierenden Region + Resistenzgen), konnten erfolgreich erzeugt werden. Anschließend wurde mit der Lambda-Red-Mutagenese-Methode versucht, die in Abbildung 22 gezeigten Bereiche zu deletieren. Beispielhaft ist eine Gelelektrophorese-Aufnahme gezeigt (Abb. 23), von der Kontroll-PCR von  $\Delta secA$ -KPC2 0008.

## Ergebnisse



**Abb. 23: Darstellung des PCR-Ergebnisses zur Identifizierung von möglichen pCF13069  $\Delta$ secA-KPC 0008 Mutanten.** Die Proben wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Für die Amplifizierung wurde die *Taq*-Polymerase verwendet. Als Marker (M) wurde der 1 kb DNA Ladder verwendet. Die Signale waren bei 1246 bp für die Deletionsmutante zu erwarten.

Dieser Bereich befindet sich bei 2039 bp- 4150 bp auf dem Plasmid pCF13069. Die Banden sollten für eine Deletionsmutante bei 1246 bp liegen. Wenn die Deletion nicht funktioniert hat, sollten die Banden bei 2332 bp liegen. Da in Banden in beiden Bereichen vorhanden sind, handelt es sich vermutlich um Mischkulturen. Auch nach mehrmaligem Überstreichen und in der Sanger Sequenzierung konnten keine Deletionsmutanten detektiert werden.

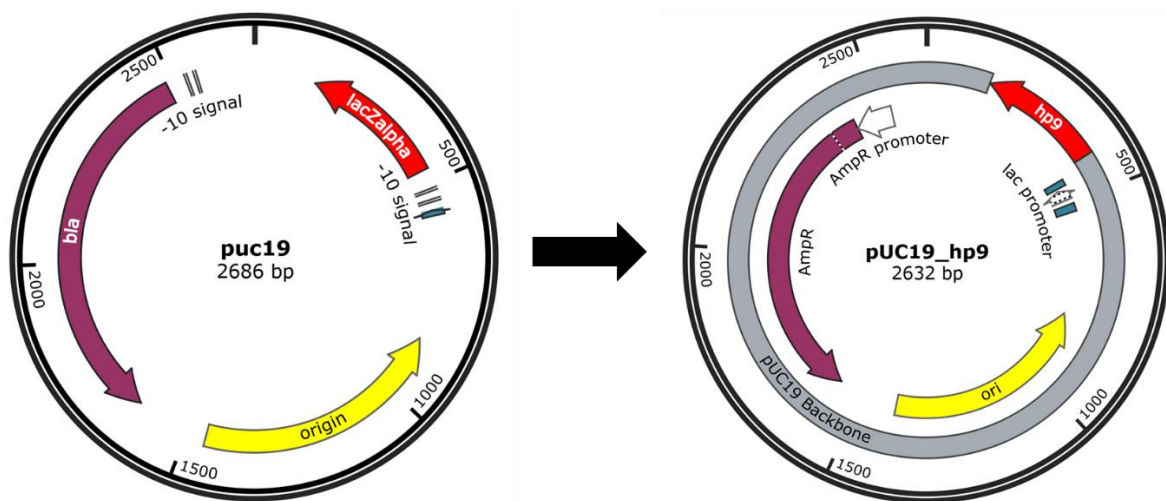
Wie bei diesem Bereich beispielhaft gezeigt, konnten auch für die anderen Genabschnitte trotz mehrfacher Wiederholungen keine Deletionen auf dem Plasmid pCF13069 erzeugt werden. Da trotz mehrfacher Versuche keine IncN-Plasmid-Deletionsmutanten generiert werden konnten, wurde die Mutagenese des IncN-Plasmids nicht mehr weiterverfolgt.

## 4.2 IncX4

Einige Gene des Resistenzplasmids pV163M (Plasmidkarte mit Position des *p9*-Gens siehe Kapitel 1.5.1), welches zur Inkompatibilitätsgruppe IncX4 gehört, wurden in zwei vorherigen Arbeiten deletiert und charakterisiert (Keitmann, 2023; Azarderakhsh, 2017 (unv. Masterarbeit)). Dabei fiel das hypothetische Protein 9 (*p9*) besonders auf, da die Mutanten ein verringertes Wachstum und eine erhöhte Konjugationseffizienz aufwiesen. In ersten Versuchen wurde das Gen zunächst komplementiert.

### 4.2.1 Komplementation der pV163M $\Delta$ *p9* Mutante über Klonierung von *p9* in pUC19 und pACYC184

Die Komplementation dient der funktionellen Ergänzung des deletierten Gens, um die phänotypischen Effekte der Mutation auszugleichen. In dieser Arbeit wurde die Komplementation von pV163M $\Delta$ *p9* über pUC19::*p9* bzw. pACYC184::*p9* durchgeführt. Für die Herstellung der beiden Komplementations-Plasmide wurde *p9* in das high copy Plasmid pUC19 (Abb. 24) bzw. low copy Plasmid pACYC184 kloniert.

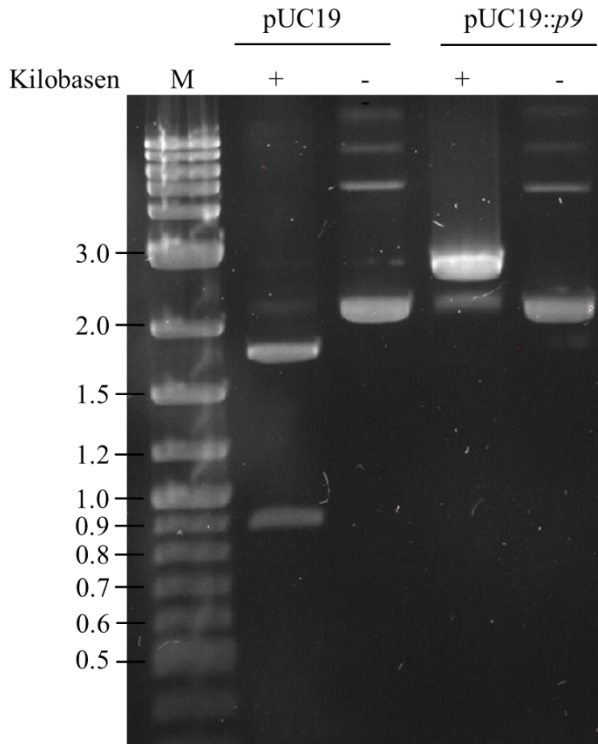


**Abb. 24:** Plasmidkarte von pUC19 und pUC19 mit *p9*. Das *lacZalpha* (rot) aus pUC19 wurde gegen *p9* (rot) ausgetauscht. Der graue Bereich in pUC19\_*hp9* ist der Backbone von pUC19.

Die Klonierung wurde mittels der Aqua Cloning Methode durchgeführt. Die generierten PCR-Produkte konnten *in vivo* erfolgreich zusammengefügt werden. Das *p9*-Gen wurde in pUC19 anstelle des *lacZ*-Gens eingebaut. In Abbildung 25 wird ein Restriktionsverdau gezeigt. Es wurden drei Klone des erfolgreich transformierten pUC19::*p9* mit dem Enzym PvuI geschnitten. Dieses Enzym wurde gewählt, da pUC19::*p9* nur eine Schnittstelle besitzt, pUC19 jedoch zwei.

## Ergebnisse

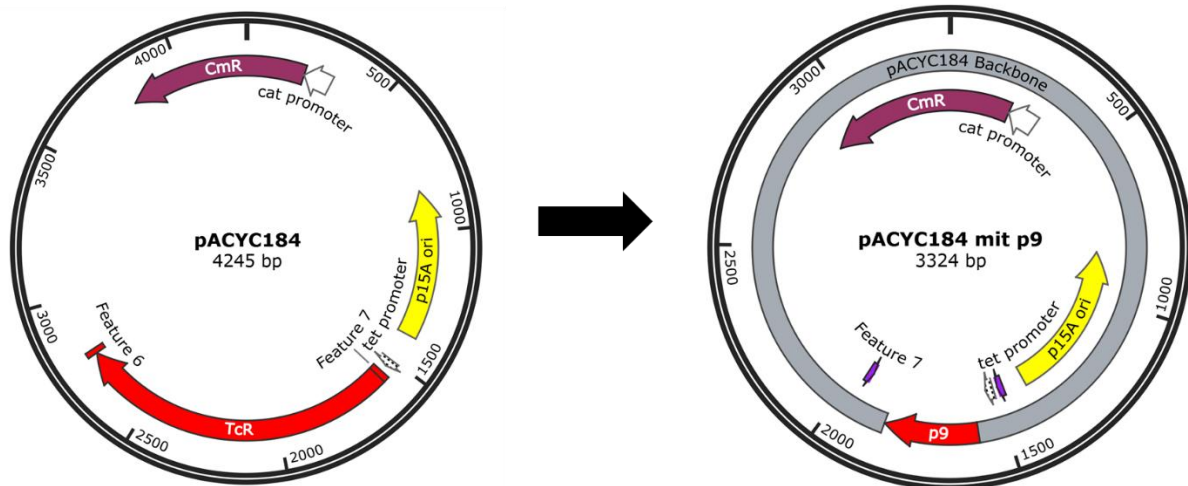
Die Signale waren für pUC19::*p9* bei 2632 bp zu erwarten und für pUC19 bei 1790 bp und 896 bp. Im Gel konnten die zu erwartenden Signale in den richtigen Bereichen detektiert werden.



**Abb. 25: Restriktionsverdau zur Kontrolle der Klonierung von pUC19::*p9*.** Die Proben wurden mit PvuI für eine Stunde verdaut und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Als Marker (M) wurde der 1 kb Plus DNA Ladder verwendet. Als Positiv-Kontrolle für den Restriktionsverdau wurde das Plasmid pUC19 verwendet. Die Signale waren für pUC19::*p9* bei 2635 bp für pUC19 bei 1790 bp und 896 bp zu erwarten.

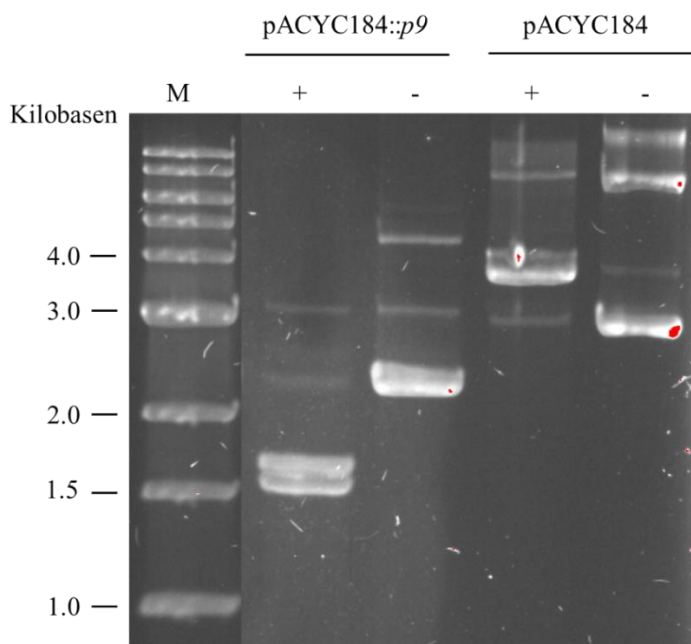
Es konnte mittels einer Sequenzierung nach Sanger bestätigt werden, dass *p9* erfolgreich in pUC19 eingebaut wurde. Das *p9*-Gen wurde ebenfalls in dem Plasmid pACYC184 erfolgreich kloniert. Dafür wurde ebenfalls die Aqua Cloning Methode verwendet. Das *p9*-Gen wurde in pACYC184 anstelle des Tetracyclin Resistenzgens (TcR) eingebaut (Abb. 26).

## Ergebnisse



**Abb. 26: Plasmidkarte von pACYC184 und pACYC184 mit p9.** Das Tetracyclin-Gen (TcR) aus pACYC184 wurde gegen das p9-Gen ausgetauscht (rot). Der graue Bereich in pACYC184 mit p9 ist der Backbone von pACYC184.

In Abbildung 27 wird exemplarisch der Restriktionsverdau eines möglichen pACYC184::p9-Plasmides und des Ursprungs-Plasmides, pACYC184, gezeigt. Es wurden sechs Klone des erfolgreich transformierten pACYC184::p9 mit dem Enzym EcoRI geschnitten. Gewählt wurde dieses Enzym, da pACYC184 nur eine Schnittstelle besitzt, pACYC184::p9 jedoch zwei. Im Gel sind bei pACYC184::p9 zwei Banden bei 1715 bp und 1609 bp zu erkennen. Bei der Kontrolle pACYC184 ist nur eine Bande bei 4245 bp zu erkennen. Die Banden waren jeweils in diesen Bereichen zu erwarten gewesen.

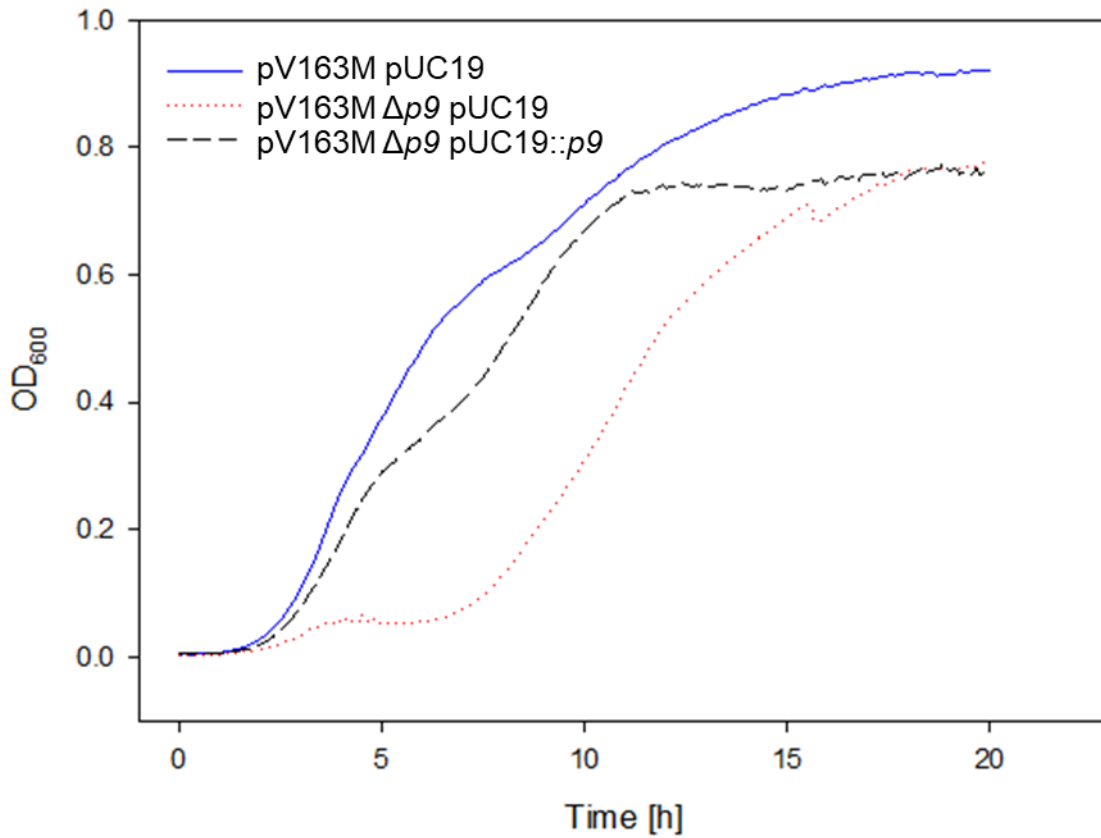


**Abb. 27: Restriktionsverdau zur Kontrolle der Klonierung von pACYC184::p9.** Die Proben wurden mit EcoRI für eine Stunde verdaut und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Als Marker (M) wurde der 1 kb DNA Ladder verwendet. Als Positiv-Kontrolle für den Restriktionsverdau wurde das Plasmid pACYC184 verwendet. Die Signale waren für pACYC184::p9 bei 1715 bp und 1609 bp, für pACYC184 bei 4245 bp zu erwarten.

### 4.2.1.1 Wachstumsanalyse von pUC19::*p9*

Die Wachstumsanalyse wurde durchgeführt, um bestätigen zu können, ob die Komplementation von *p9* in dem Plasmid pUC19 funktioniert hatte. Dafür wurde pUC19::*p9* in die pV163M  $\Delta p9$  Mutante durch chemische Transformation in *E. coli* DH10 $\beta$  transferiert. Um das Wachstum anschließend vergleichen zu können, wurde pUC19 auch in den WT und die Mutante von *p9* transformiert (Leervektorkontrolle). Die Proben wurden im Spektralphotometer bei einer Temperatur von 37°C für 20 Stunden inkubiert und die OD<sub>600</sub> alle fünf Minuten bestimmt. Anhand der gemessenen optischen Dichte kann die Wachstumskurve erstellt werden. Für die Wachstumsversuche erfolgte weder die Zugabe von IPTG noch von Anhydrotetracyclin, da sowohl bei der Komplementante als auch bei der Vektorkontrolle das Wachstum bei Zugabe von IPTG gehemmt wurde. Die Komplementante weist ein besseres Wachstum auf als die Mutante, jedoch ein schlechteres als der WT (Abb. 28). Damit konnte gezeigt werden, dass die Komplementation in pUC19 erfolgreich war. Weiterhin ist zu beobachten, dass die pV163M  $\Delta p9$  Mutante (46,7 min) im Vergleich zum WT pV163M pUC19 (38,4 min) und zur Komplementante pV163M  $\Delta p9$  pUC19::*p9* eine verlängerte lag-Phase hat.

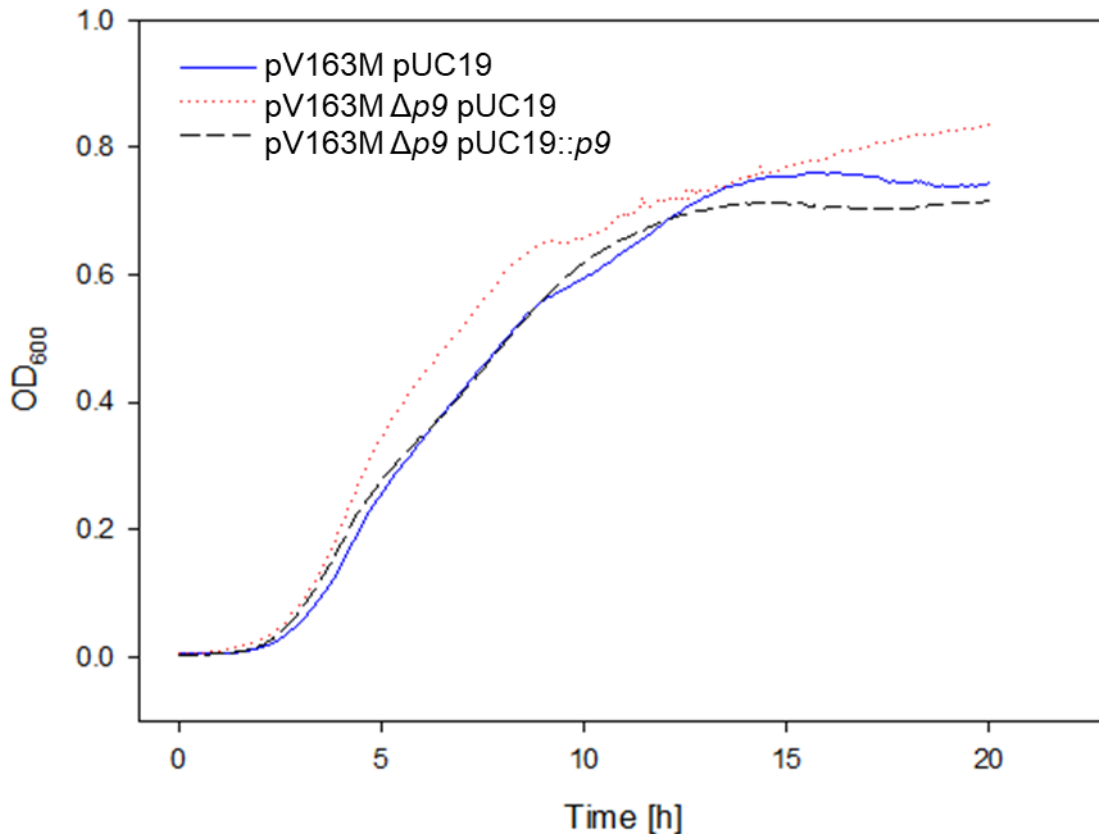
## Ergebnisse



**Abb. 28: Wachstumsanalyse der Komplementante im Vergleich mit dem WT und der Mutante von pV163M.** Das Wachstum erfolgte in LB-Medium mit Kanamycin und Ampicillin bei 37°C für 20 Stunden im Spektralphotometer. Die OD<sub>600</sub> wurde alle fünf Minuten gemessen. Die Ergebnisse konnten in drei unabhängigen Versuchen repliziert werden.

Nach einem längeren Zeitraum von etwa acht Wochen nach der Transformation wurde jedoch beobachtet, dass das Wachstum der Komplementante und des WT abnahm (Abb. 29).

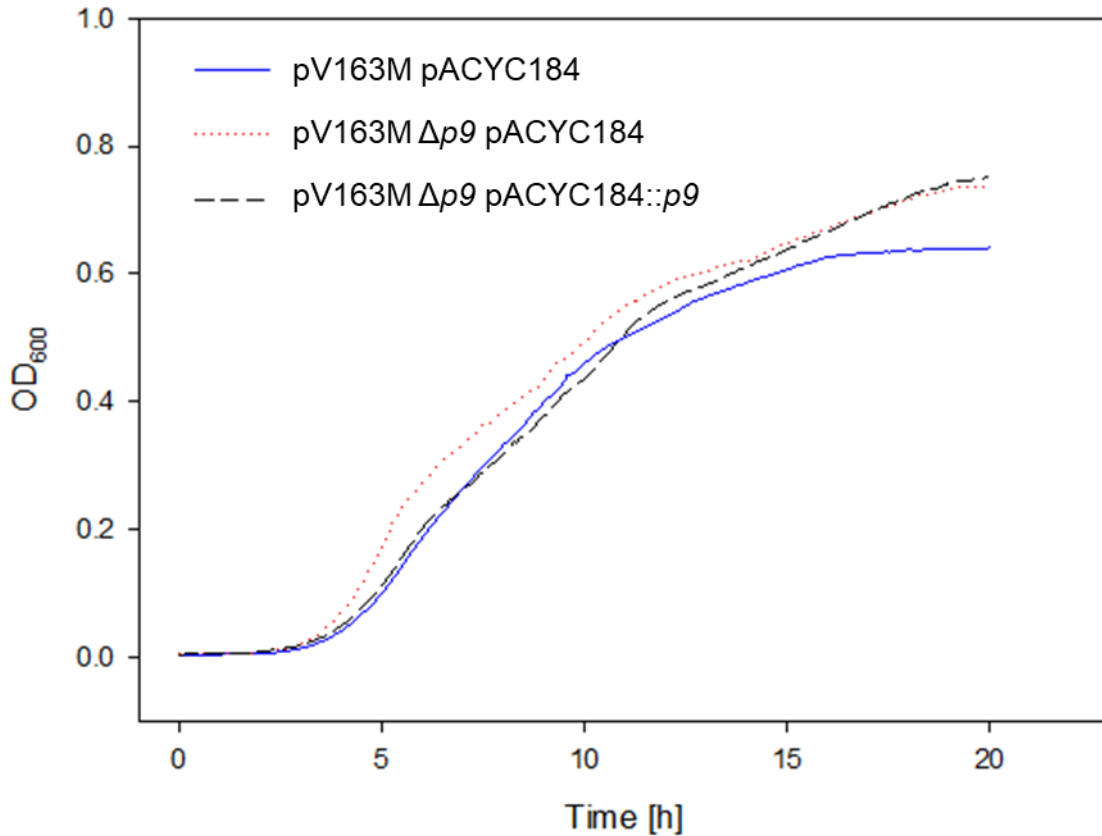
## Ergebnisse



**Abb. 29: Wachstumseffekt der Komplementation von  $p9$  in pUC19 nach acht Wochen.** Das Wachstum erfolgte in LB-Medium mit Kanamycin und Ampicillin bei 37°C für 20 Stunden im Spektralphotometer. Die OD<sub>600</sub> wurde alle fünf Minuten gemessen. Die Ergebnisse konnten in drei unabhängigen Versuchen repliziert werden.

Für die pV163M Δp9 pUC19 Mutante konnte nun ein besseres Wachstum beobachtet werden als das vom WT pV163M pUC19. Die Komplementante hingegen wies ein ähnliches Wachstum auf wie der WT. Für den WT konnte nur noch eine maximale OD<sub>600</sub> von 0,746 ermittelt werden, während die maximale OD<sub>600</sub> von der pV163M Δp9 pUC19 Mutante bei 0,836 lag. Im Vergleich dazu lag die maximale OD<sub>600</sub> direkt nach der Transformation beim WT pV163M pUC19 bei 0,921 und für die pV163M Δp9 pUC19 Mutante bei 0,777. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die lag-Zeit der pV163M Δp9 pUC19 Mutante (45,8 min) sich im Vergleich zum WT pV163M pUC19 (69,6 min) verkürzte. Damit verschwindet nach den acht Wochen auch der Komplementationseffekt. Da dies ein Effekt von pUC19 sein könnte, wurde die Komplementation mit dem Plasmid pACYC184:: $p9$  wiederholt und ebenfalls durch eine Wachstumsanalyse überprüft.

Dafür wurde pACYC184:: $p9$  in die pV163M Δp9 Mutante transformiert. Als Leervektor-Kontrolle wurde pACYC184 in die pV163M Δp9 Mutante und den WT pV163M transformiert. Die OD<sub>600</sub> wurde alle fünf Minuten über einen Zeitraum von 20 Stunden im Spektralphotometer gemessen (Abb. 30).



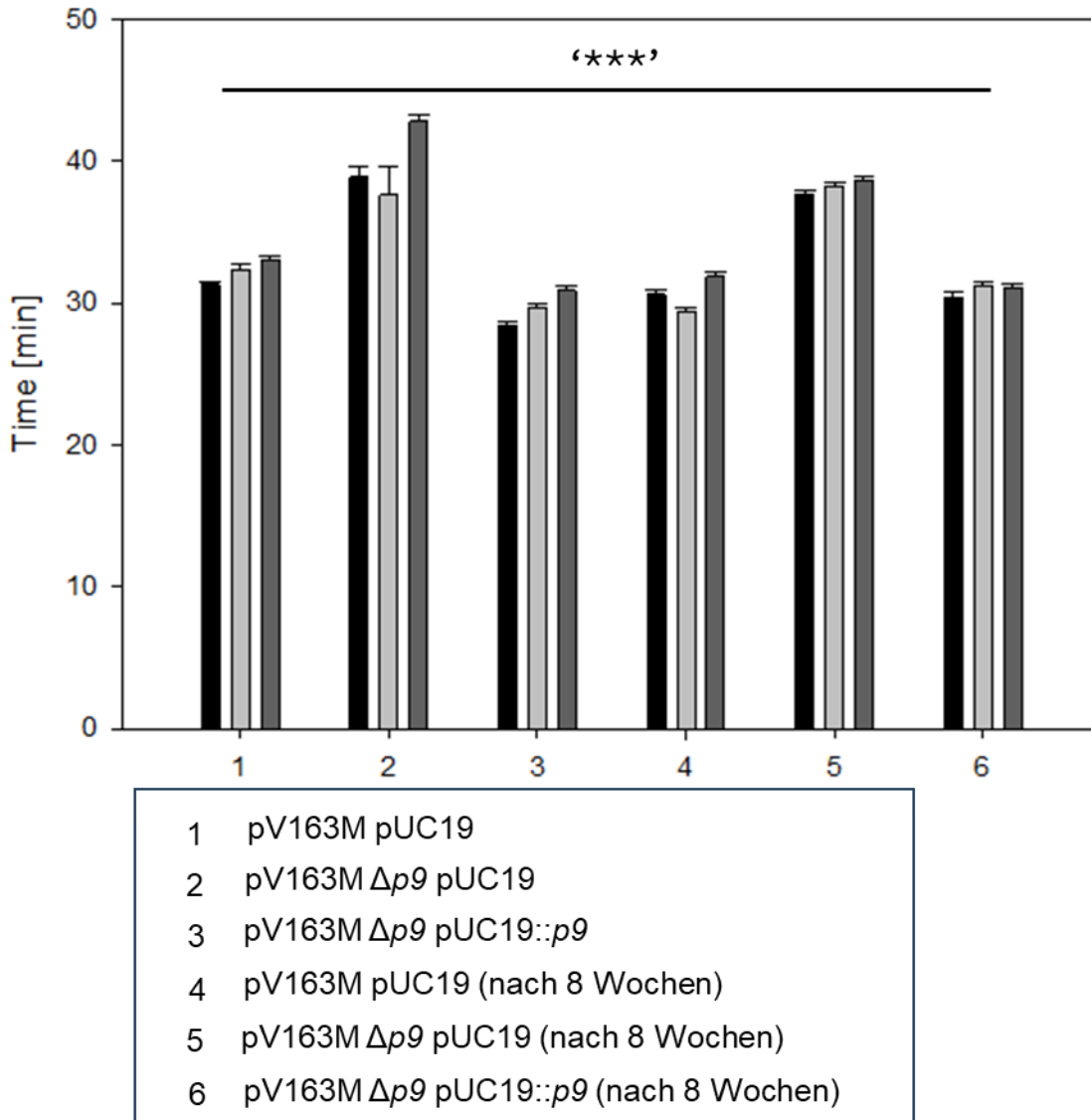
**Abb. 30: Wachstumsanalyse der Komplementation von *p9* in *pACYC184* im Vergleich mit der Mutante und dem WT.** Das Wachstum erfolgte in LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol bei 37°C für 20 Stunden im Spektralphotometer. Die OD<sub>600</sub> wurde alle fünf Minuten gemessen.

Dabei konnte für die Komplementante und dem WT pV163M pACYC184 bis zu einem Zeitpunkt von elf Stunden ein ähnliches Wachstum beobachtet werden. Nach diesem Zeitpunkt wuchs die Komplementante schneller und konnte eine maximale OD<sub>600</sub> von 0,751 erreichen, während der WT pV163M nur 0,641 erreichte. Die pV163M Δ*p9* pACYC184 Mutante hingegen wuchs bis zum Zeitpunkt von 14 Stunden schneller als der WT pV163M pACYC184 und die Komplementante und wies nach diesem Zeitpunkt ein ähnliches Wachstum auf, wie die Komplementante. Die Mutante konnte eine maximale OD<sub>600</sub> von 0,736 erreichen und wuchs damit besser als der WT. Damit konnte gezeigt werden, dass durch pACYC184::*p9* phänotypisch keine Komplementation zu erkennen ist.

#### 4.2.1.2 Bestimmung der Verdopplungsraten

Die Verdopplungsraten wurden anhand der Wachstumsanalysen bestimmt. Die Raten für die Komplementation durch pUC19::*p9* werden in Abb. 31 gezeigt.

## Ergebnisse



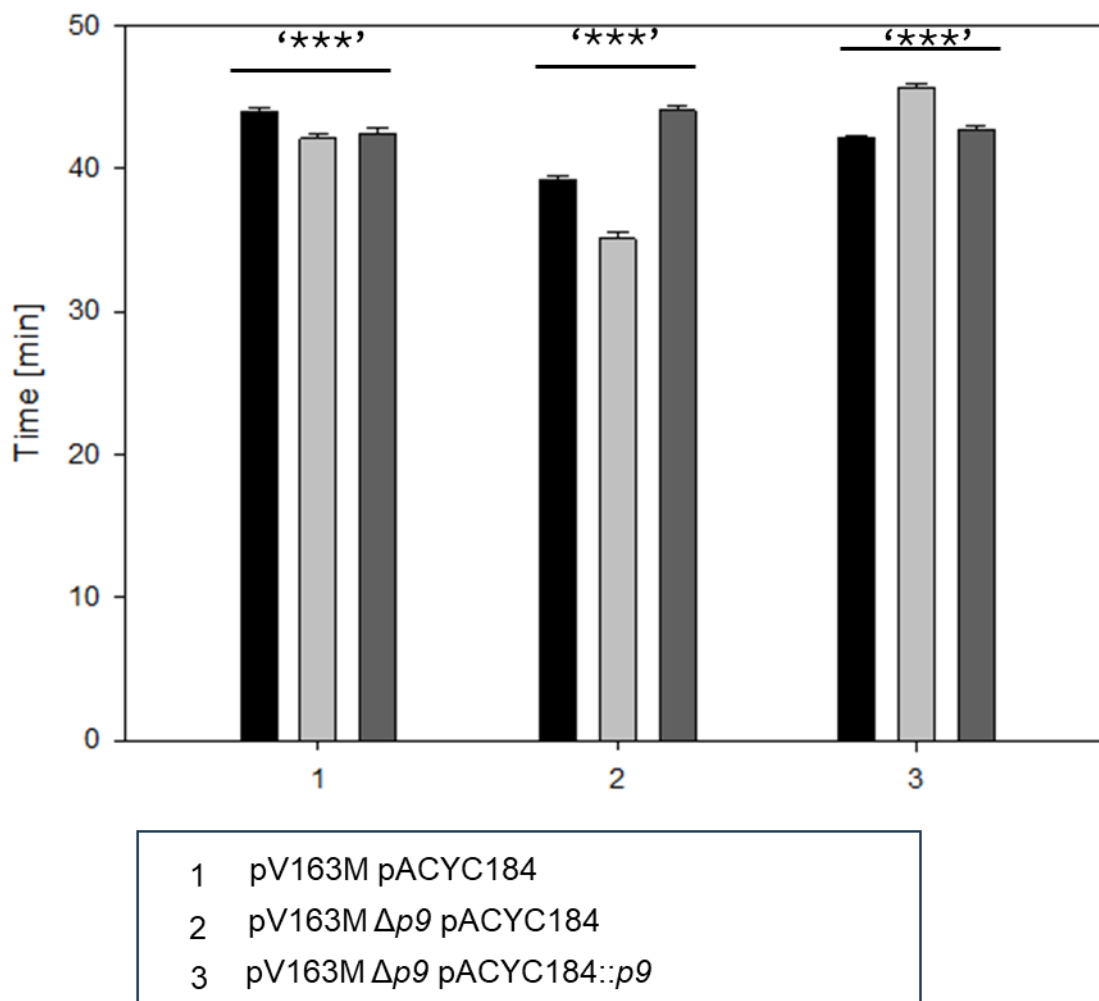
**Abb. 31:** Verdopplungsraten der Komplementation von *p9* in pUC19 im Vergleich mit dem WT (pV163M pUC19) und der Deletionsmutante von *p9* (pV163M $\Delta p9$  pUC19). Die Bestimmung der Verdopplungsraten erfolgte anhand der ermittelten OD<sub>600</sub>, im Spektralphotometer. Die Angaben der Verdopplungsraten erfolgen in Minuten mit ihrer Standardabweichung und es werden jeweils drei unabhängige Versuche verglichen (Signif. codes: \*\*\* $p \leq 0,0001$  Student's t Test) (schwarz, hellgrau, dunkelgrau). Die Balken bei 1-3 zeigen die Verdopplungsraten direkt nach der Transformation, die Balken 4-6 die Verdopplungsraten acht Wochen später.

Die Angabe erfolgt in Minuten. Dabei wird der WT mit der Mutante und der Komplementante verglichen. Für den WT pV163M pUC19 wurde im Vergleich zur pV163M  $\Delta p9$  pUC19 Mutante sowohl nach der Transformation als auch nach acht Wochen eine kürzere Verdopplungsrate ermittelt. Die Verdopplungsrate beim WT pV163M pUC19 betrug nach der Transformation durchschnittlich 32 min, acht Wochen später 30 min. Die lag-Zeit des WT pV163M pUC19 betrug nach der Transformation 38,4 min und nach acht Wochen 69,5 min. Bei der pV163M  $\Delta p9$  pUC19 Mutante betrug die Verdopplungsrate nach der Transformation durchschnittlich 39 min und acht Wochen später 38 min. Weiterhin betrug die lag-Zeit nach der Transformation

## Ergebnisse

46,7 min und nach acht Wochen 45,8 min. Für die Komplementante pV163M  $\Delta p9$  pUC19 wurde nach der Transformation eine kürzere Verdopplungsrate als beim WT pV163M pUC19 ermittelt. Die Rate wurde allerdings nach acht Wochen geringer und betrug nur noch weniger als eine Minute Unterschied zum WT, während sie direkt nach der Transformation ca. drei Minuten betrug. Die Signifikanz wurde zwischen dem WT, der Mutante und der Komplementante nach der Transformation und nach acht Wochen berechnet. Für alle drei ergab sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Verdopplungsraten.

Die Verdopplungsraten für die Komplementation in pACYC184 wurde anhand der Wachstumsanalysen bestimmt und werden in Abb. 32 gezeigt.



**Abb. 32: Verdopplungsraten der Komplementation von  $p9$  in pACYC184 im Vergleich mit dem WT und der Deletionsmutanten von  $p9$ .** Die Bestimmung der Verdopplungsraten erfolgte anhand der ermittelten OD<sub>600</sub> im Spektralphotometer. Die Angaben der Verdopplungsraten erfolgen in Minuten mit ihrer Standardabweichung und es werden jeweils drei unabhängige Versuche verglichen (Signif. codes: \*\*\* $p \leq 0,0001$  Student's t Test) (schwarz, hellgrau, dunkelgrau).

Sowohl bei der pV163M  $\Delta p9$  pACYC184 Mutante (39 min, 35 min, 44 min) als auch bei der Komplementante pV163M  $\Delta p9$  pACYC184::p9 (42 min, 45 min, 42 min) ist kein klarer Trend

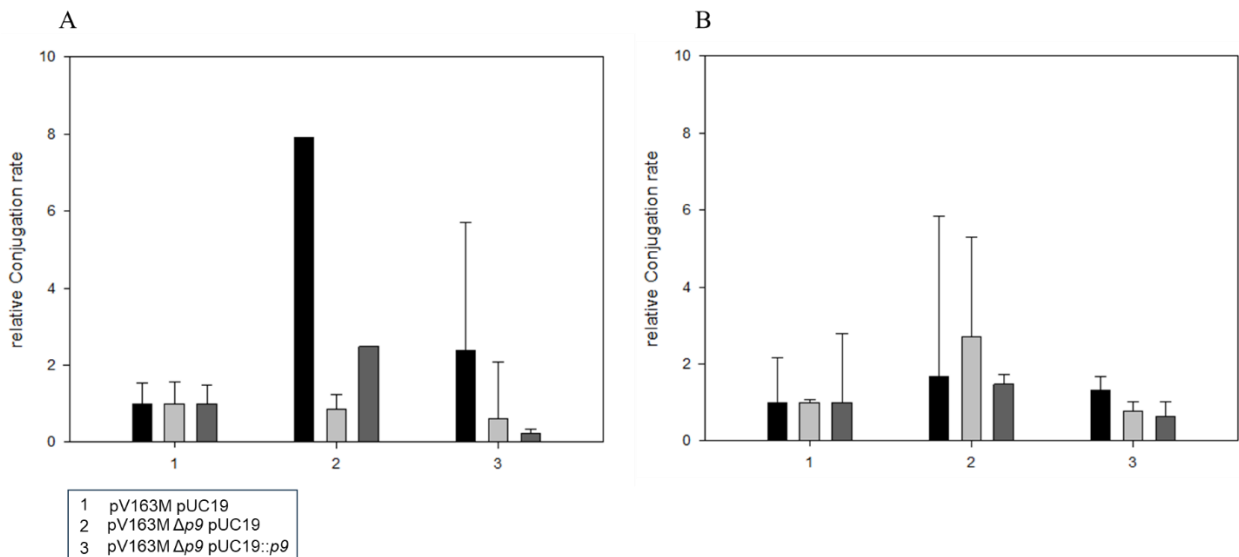
## Ergebnisse

zu erkennen, da hier in den verschiedenen Läufen unterschiedliche Verdopplungsraten im Vergleich zum WT pV163M pACYC184 (44 min, 42 min, 42 min) ermittelt wurden.

### 4.2.1.3 Bestimmung der Konjugationseffizienz

Die Bestimmung der relativen Konjugationseffizienz erfolgte, indem die Konjugation durchgeführt wurde, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben. Die Konjugationseffizienzen werden berechnet, wie in Formel 1 angegeben. Anschließend werden die berechneten Konjugationseffizienzen der einzelnen Donoren durch die des WT dividiert. Die durchschnittliche Konjugationseffizienz des WT wird dabei auf 1,0 gesetzt. Dies ist notwendig, um bestimmen zu können, ob die relative Konjugationseffizienz der Mutanten und der Komplementante höher oder niedriger als die des WT ist. Eine höhere Effizienz im Vergleich zum Wildtyp bedeutet, dass diese Variante besser konjugiert als der Wildtyp, eine geringere Effizienz, dass diese Variante schlechter konjugiert als der Wildtyp.

Die Abbildung 33 zeigt die Konjugationseffizienzen der pV163M  $\Delta p9$  pUC19 Mutante und der Komplementante pV163M  $\Delta p9$  pUC19::*p9* im Vergleich mit dem WT pV163M pUC19. Es werden hier zum einen die Konjugationseffizienz direkt nach der Transformation (A) und etwa acht Wochen später (B) dargestellt.



**Abb. 33: Relative Konjugationsrate der Komplementation in pUC19.** Gezeigt werden der Konjugationseffekt direkt nach der Transformation (A) und etwa acht Wochen später (B). Aufgetragen wurden jeweils drei verschiedene Läufe mit ihrer Standardabweichung.

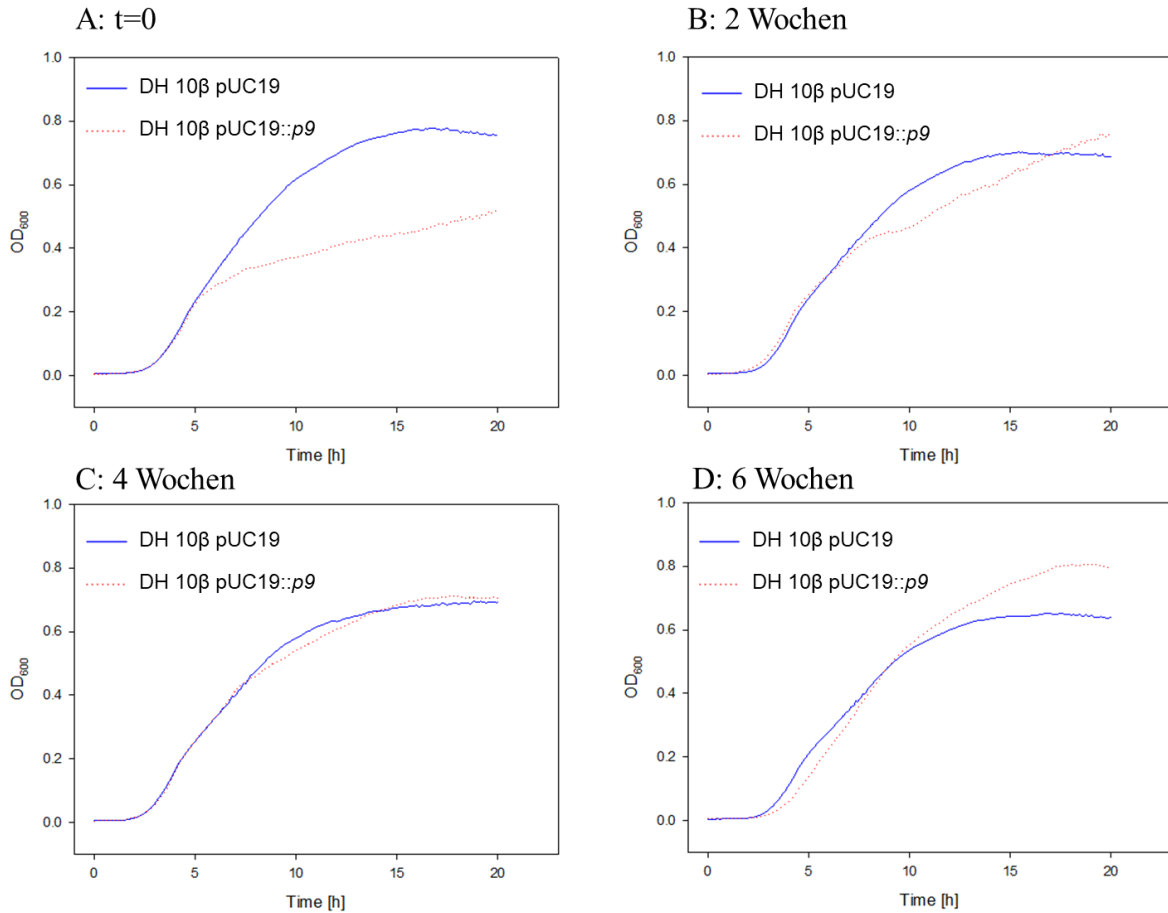
## Ergebnisse

Eine erhöhte Konjugationseffizienz im Vergleich zum WT pV163M pUC19 ist für die pV163M  $\Delta p9$  pUC19 Mutante zu beobachten. Die Konjugationseffizienz wird nach acht Wochen geringer. Die Effizienz lag nach der Transformation in drei von sechs Replikaten zwischen 7,9 und 2,4 und damit deutlich über 1,0. Nur für den 2. Lauf nach der Transformation wurde bei der Komplementante pV163M  $\Delta p9$  pUC19 eine geringfügig niedrigere Effizienz (0,8) im Vergleich zum WT ermittelt. Für die Komplementante pV163M  $\Delta p9$  pUC19::*p9* wurde eine niedrigere Konjugationseffizienz (0,6; 0,2) im Vergleich zum WT pV163M pUC19 in zwei von drei Läufen ermittelt. Hier wurde beobachtet, dass die Konjugationseffizienz in zwei von drei Läufen besser wurde (0,6; 0,8), allerdings immer höher als die vom WT.

### 4.2.1.4 Untersuchung der zeitlichen Effekte von pUC19::*p9* auf das Wachstum

Der beobachtete zeitliche Wachstumseffekt von *p9* wurde noch einmal genauer untersucht, um zu ermitteln, ob dieser Effekt der Ko-Existenz von pV163M und pUC19::*p9* in einer Zelle geschuldet oder auf pUC19::*p9* allein zurückzuführen ist. Dafür wurde pUC19 und pUC19::*p9* in *E. coli* DH10 $\beta$  (DH10 $\beta$ ) transformiert und eine Wachstumsanalyse durchgeführt. Zur Bestätigung dieses Effekts wurde der Versuch dreimal wiederholt, wofür die Stämme für jeden Ansatz neu transformiert wurden. Die Stämme wurden dann wöchentlich auf frische Agarplatten überstrichen und die Wachstumsanalyse im Rhythmus von zwei Wochen wiederholt (Abb. 34).

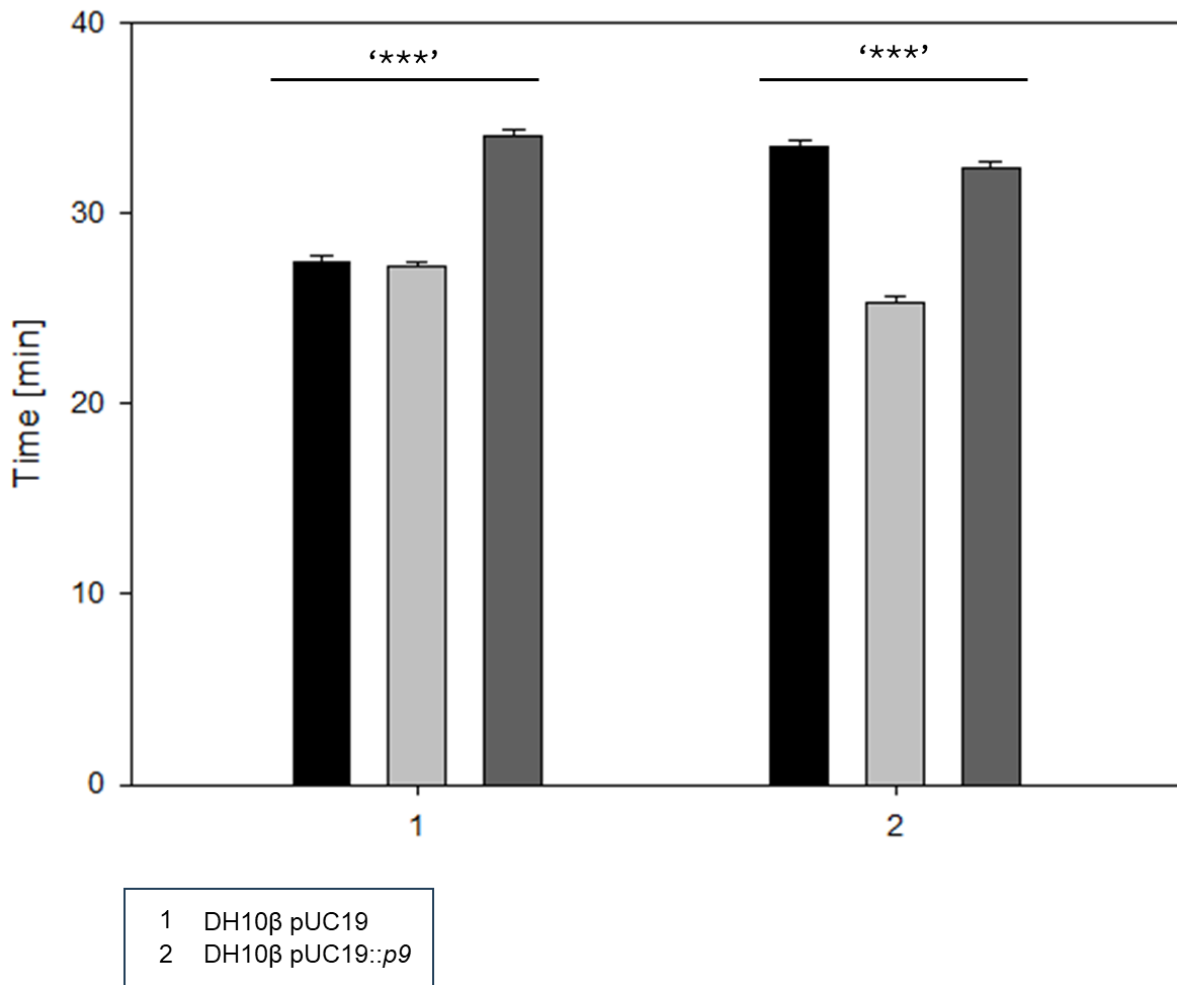
## Ergebnisse



**Abb. 34: Wachstumsanalyse von pUC19::p9 in *E. coli* DH10β mit Zeiteffekt.** Das Wachstum erfolgte in LB-Medium mit Ampicillin bei 37°C im Spektralphotometer für 20 Stunden. Die OD<sub>600</sub> wurde alle fünf Minuten gemessen. Die Proben wurden wöchentlich auf frische Agarplatten überstrichen und die Wachstumsanalyse im Rhythmus von zwei Wochen durchgeführt (A-D).

Es wurde beobachtet, dass das Wachstum von DH10β pUC19 zunächst deutlich besser war, als das von DH10β pUC19::p9. DH10β pUC19 zeigte im zeitlichen Verlauf in allen Analysen keine Veränderung im Wachstum. Bei DH10β pUC19::p9 konnte bereits nach zwei Wochen eine steilere exponentielle Phase beobachtet werden, während DH10β pUC19 nach etwa 14 Stunden in die stationäre Phase übergang. Nach weiteren zwei Wochen konnte für beide Stämme bereits ein ähnliches Wachstum beobachtet werden. Nach einem Zeitraum von sechs Wochen überholte DH10β pUC19::p9 DH10β pUC19 bereits nach etwa neun Stunden im Wachstum und konnte eine maximale OD<sub>600</sub> von 0,798 erreichen, während DH10β pUC19 nur 0,640 erreichen konnte. Dies zeigte sich auch in den ermittelten Verdopplungsraten (Abb. 35).

## Ergebnisse



**Abb. 35: Verdopplungsraten von pUC19::*p9* in *E. coli* DH10β mit Zeiteffekt.** Die Bestimmung der Verdopplungsraten erfolgte anhand der ermittelten OD<sub>600</sub>, im Spektralphotometer. Die Angaben der Verdopplungsraten erfolgen in Minuten mit ihrer Standardabweichung und es werden jeweils drei unabhängige Versuche verglichen (Signif. codes: \*\*\* $p \leq 0,0001$  Student's t Test) (schwarz, hellgrau, dunkelgrau).

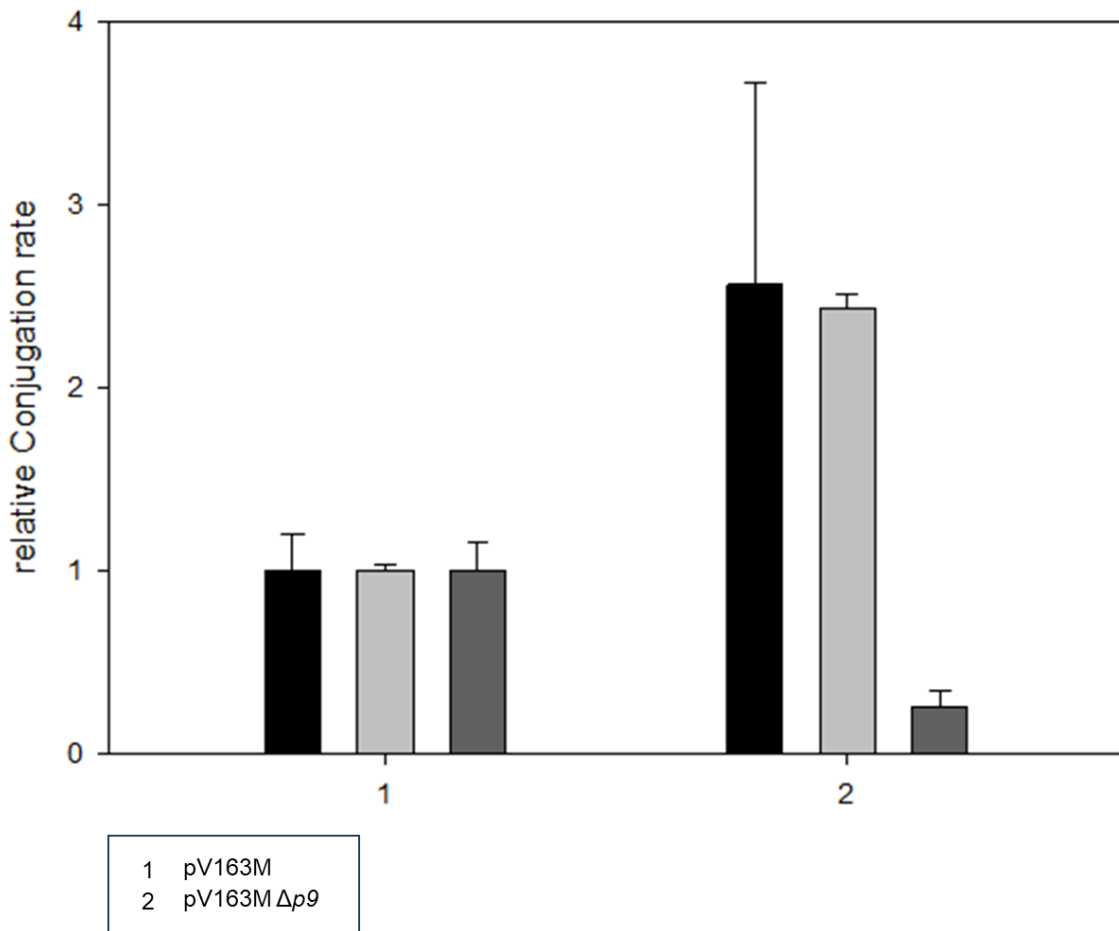
Nach der Transformation wurde für DH10β pUC19 eine schnellere Verdopplungsrate ermittelt als für DH10β pUC19::*p9*. Diese betrug für DH10β pUC19 27 min und für DH10β pUC19::*p9* 33 min. Nach zwei Wochen wurde für DH10β pUC19::*p9* (25 min) eine um 2 Minuten schnellere Verdopplungsrate ermittelt als für DH10β pUC19 (27 min). Die Signifikanz wurde zwischen DH10β pUC19 im wöchentlichen Verlauf und DH10β pUC19::*p9* im wöchentlichen Verlauf berechnet. Dabei konnte ein hoch signifikanter Zusammenhang ermittelt werden.

### 4.2.1.5 Untersuchung der zeitlichen Effekte von pUC19::*p9* auf die Konjugation

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob der Expressionseffekt von *p9* auch in der Konjugation zu beobachten ist (Abb. 36). Dafür wurde zunächst pUC19::*p9* in den als Rezipienten dienenden Stamm J53 transformiert. *E. coli* DH10β pV163M bzw. *E. coli* DH10β pV163M  $\Delta p9$

## Ergebnisse

dienten in diesem Versuch jeweils als Donoren. Zur Bestimmung der relativen Konjugationsrate wurde der WT auf 1,0 gesetzt.



**Abb. 36: Relative Konjugationsrate von pV163M und pV163M  $\Delta p9$  mit zeitlichem Expressionseffekt von  $p9$  (pUC19:: $p9$ ).** Als Rezipient diente J53 pUC19:: $p9$  und als Donor pV163M und pV163M  $\Delta p9$ . Die Proben wurden wöchentlich auf frische Agarplatten überstrichen. Aufgetragen sind die Läufe im zeitlichen Intervall von jeweils zwei Wochen mit ihrer Standardabweichung (1-3).

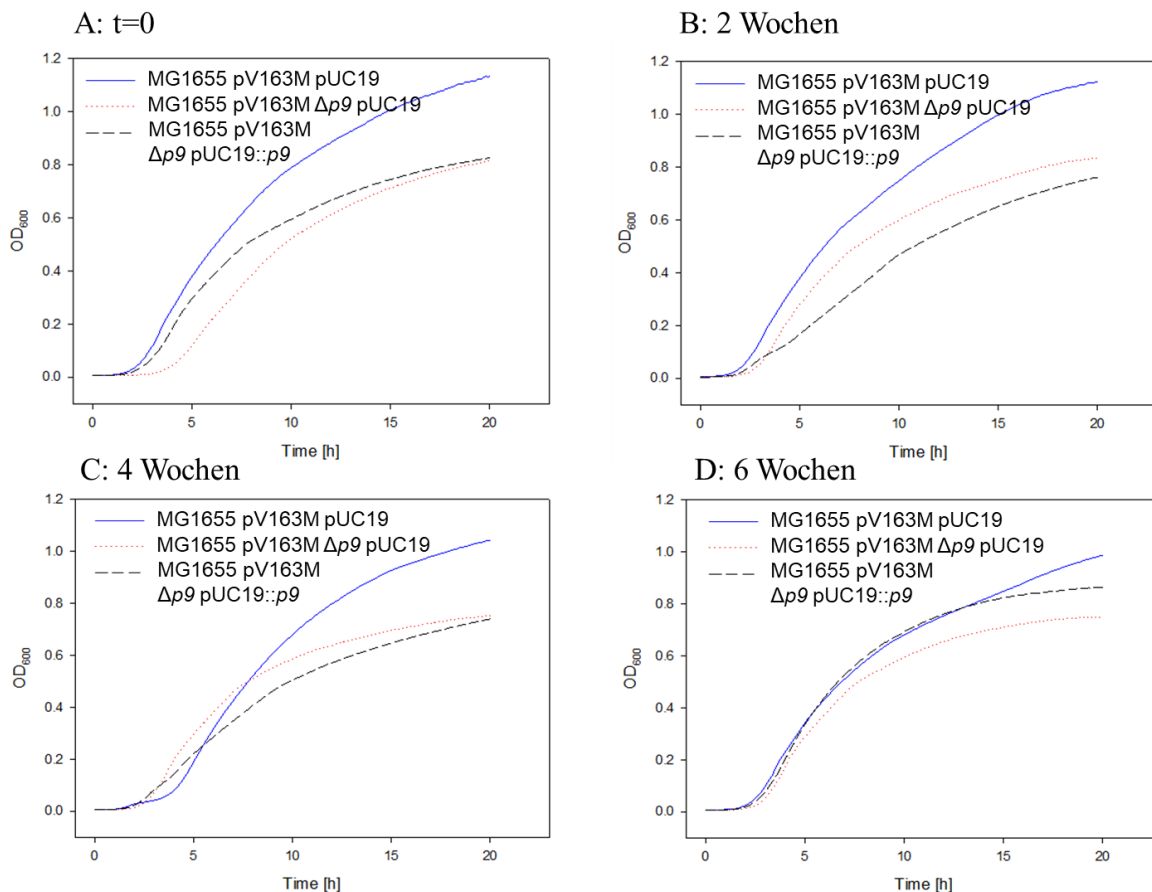
Es konnte gezeigt werden, dass die relative Konjugationseffizienz der pV163M  $\Delta p9$  Mutante im ersten Lauf nach der Transformation deutlich höher ist als die des WT pV163M. Nach weiteren zwei Wochen konnte ein leichter Rückgang der Konjugationseffizienz beobachtet werden. Diese lag im ersten Lauf bei 2,56 und im zweiten bei 2,44. Nach einem Zeitraum von vier Wochen lag die relative Konjugationseffizienz nur noch bei 0,26 und damit deutlich niedriger als beim WT pV163M.

Nachdem der Expressionseffekt von  $p9$  in DH10 $\beta$  untersucht wurde, wurde dies in zwei weiteren *E. coli* Stämmen wiederholt. Dazu wurde zum einen *E. coli* MG1655 und zum anderen *E. coli* BL21 verwendet. MG1655 gehört, wie DH10 $\beta$  auch zu den K-12 *E. coli*- Stämmen. Es kommt einem WT von *E. coli* sehr nahe, da ihm lediglich der Bakteriophage Lambda und das

## Ergebnisse

F- Plasmid fehlen, und er sonst, im Gegensatz zu DH10 $\beta$ , keine weitere Mutation aufweist. Der BL21 Stamm wird normalerweise für die Expression von Proteinen verwendet und ist ein nicht-T7-exprimierender Stamm (Jensen, 1993; Jeong et al., 2016). Er gehört zu den *E. coli* B Stämmen.

In beide Stämme wurde zunächst das Resistenzplasmid pV163M oder seine Deletionsmutante *p9* kloniert und anschließend pUC19::*p9* oder pUC19 mit eingebracht. Zur Untersuchung auf den zeitlichen Wachstumseffekt von *p9* wurden die Stämme wöchentlich auf frische Agarplatten überstrichen, um frische Proben gewinnen zu können. Anschließend wurde die Wachstumsanalyse im Rhythmus von zwei Wochen wiederholt. Der zeitliche Verlauf des Wachstums wird in den Abbildungen 37 und 38 gezeigt.

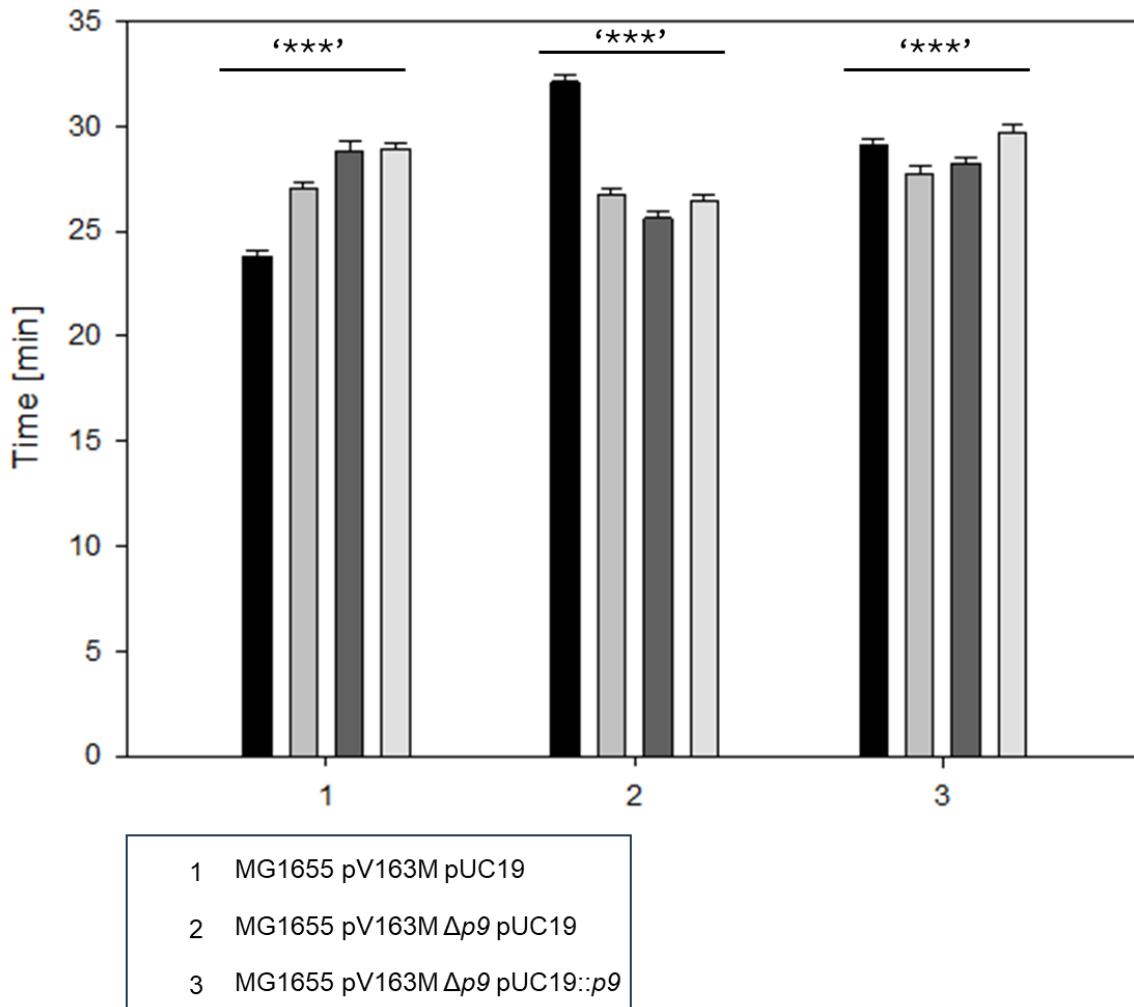


**Abb. 37: Wachstumsanalysen von MG1655 mit zeitlichem Expressionseffekt von *p9*.** Das Wachstum erfolgte in LB-Medium mit Kanamycin und Ampicillin für 20 Stunden im Spektralphotometer. Die OD<sub>600</sub> wurde dabei alle fünf Minuten gemessen. Die Proben wurden wöchentlich überstrichen und im Rhythmus von zwei Wochen das Wachstum überprüft (A-D).

Auch in MG1655 zeigte sich, dass der WT pV163M pUC19 zunächst besser wuchs als die pV163M  $\Delta p9$  pUC19 Mutante. Nach der Transformation konnte für die Komplementante pV163M  $\Delta p9$  pUC19::*p9* ein noch schlechteres Wachstum beobachtet werden als das der pV163M  $\Delta p9$  pUC19 Mutante. Im Verlauf der sechs Wochen änderte sich das Wachstum der

## Ergebnisse

Mutante nur geringfügig. Lediglich für die Komplementante konnte beobachtet werden, dass sich das Wachstum im Verlauf ändert und nach sechs Wochen einen Verlauf hat wie der WT pV163M pUC19. Anhand der Wachstumsanalysen konnte gezeigt werden, dass in MG1655 ebenfalls die Komplementation nicht phänotypisch sichtbar ist, jedoch der Wachstumseffekt von *p9* mit dem zeitlichen Verlauf an der Komplementante nachgewiesen werden konnte. Dies zeigte sich auch in den Verdopplungsraten, welche in Abbildung 38 gezeigt werden.

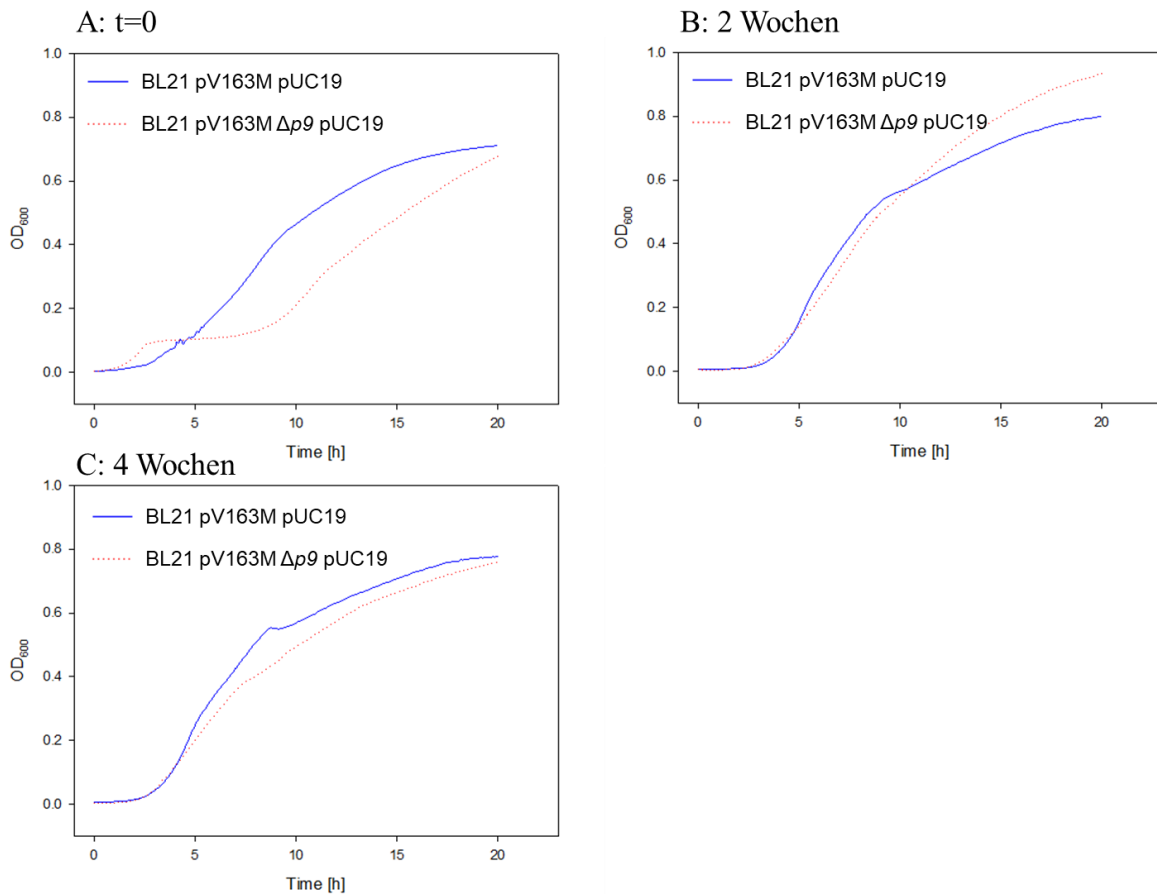


**Abb. 38: Verdopplungsraten von pUC19::*p9* in *E. coli* MG1655 mit Zeiteffekt.** Die Bestimmung der Verdopplungsraten erfolgte anhand der ermittelten OD<sub>600</sub>, im Spektralphotometer. Die Angaben der Verdopplungsraten erfolgen in Minuten mit ihrer Standardabweichung und es werden jeweils vier unabhängige Versuche über einen Zeitraum von sechs Wochen verglichen (Signif. codes: \*\*\* $p \leq 0,0001$  Student's t Test) (schwarz, grau, dunkelgrau, hellgrau). Die Versuche wurden über einen Zeitraum von insgesamt sechs Wochen durchgeführt.

Die Verdopplungsrate betrug beim WT pV163M pUC19 nach der Transformation 23 min und bei der Komplementante 29 min. Nach einem Zeitraum von vier bzw. sechs Wochen wurde bei beiden Stämmen eine Verdopplungsrate von jeweils 27 min bzw. 28 min. bestimmt.

## Ergebnisse

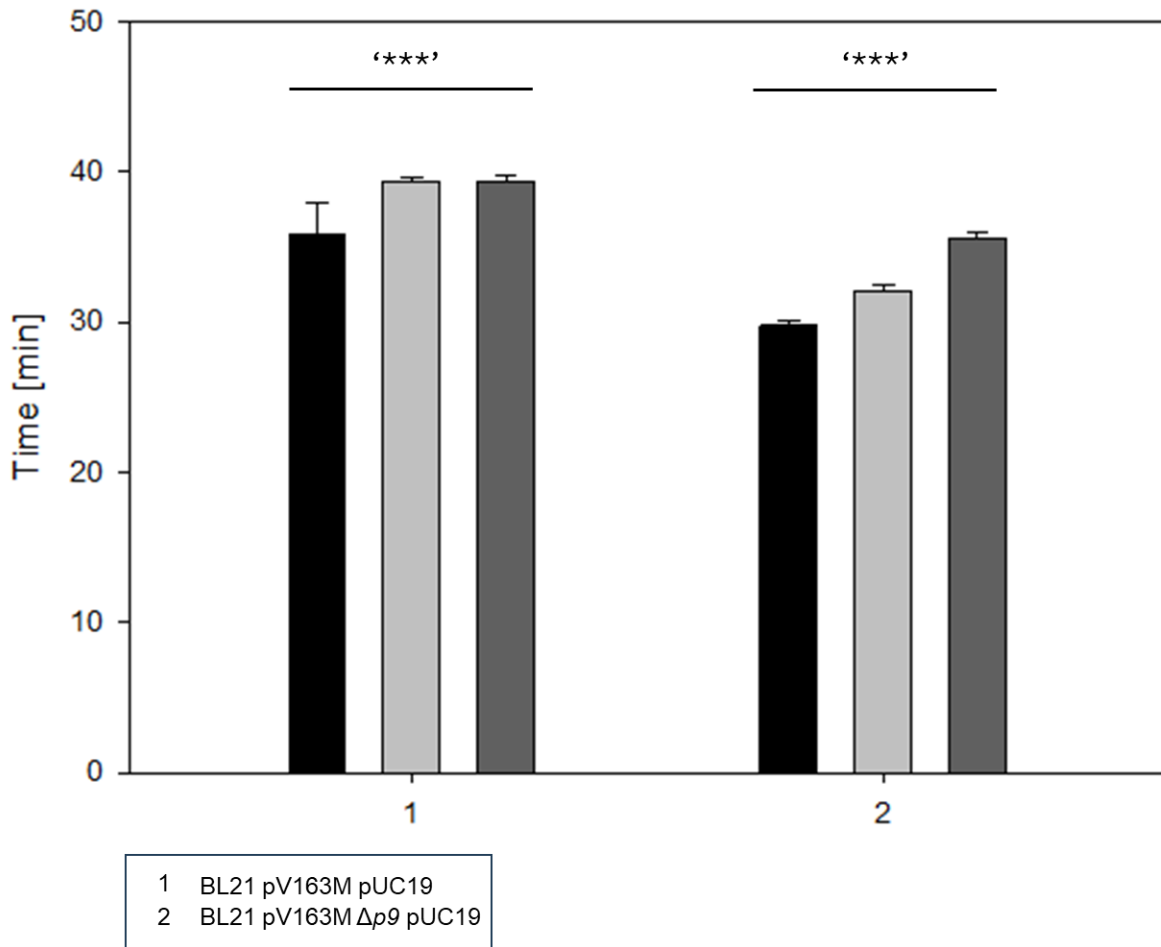
Auch in dem Stamm BL21 wurde der Wachstumseffekt von *p9* im zeitlichen Verlauf untersucht. Der zeitliche Verlauf des Wachstums ist in Abbildung 39 dargestellt.



**Abb. 39: Wachstumsanalyse von BL21 mit dem zeitlichem Expressionseffekt von *p9*.** Die Proben wurden wöchentlich überstrichen und das Wachstum im Rhythmus von zwei Wochen überprüft (A-C). Das Wachstum erfolgte in LB-Medium mit Kanamycin und Ampicillin für 20 Stunden im Spektralphotometer. Die OD<sub>600</sub> wurde dabei alle fünf Minuten gemessen.

Für diesen Versuch wurden nur drei Wachstumsanalysen im Intervall von zwei Wochen durchgeführt, da bereits nach zwei Wochen gezeigt werden konnte, dass es auch hier zu einem Effekt kommt. Die pV163M Δ*p9* pUC19 Mutante wuchs direkt nach der Transformation deutlich langsamer als der WT pV163M pUC19. Die pV163M Δ*p9* pUC19 Mutante konnte nach einem Zeitraum von etwa zehn Stunden in die exponentielle Phase übergehen, während der WT pV163M pUC19 bereits nach etwa drei Stunden in die exponentielle Phase überging. Dadurch betragen die lag-Zeiten für die pV163M Δ*p9* pUC19 Mutante 23,6 min und für den WT pV163M pUC19 79,9 min. Nach zwei Wochen konnte für die pV163M Δ*p9* pUC19 Mutante bereits ein ähnliches Wachstum beobachtet werden, wie für den WT pV163M pUC19 und konnte eine maximale OD<sub>600</sub> von 0,93 erreichen. Für den WT pV163M pUC19 konnte eine maximale OD<sub>600</sub> von 0,79 ermittelt werden. Die Verdopplungsraten wurden aus den Wachstumsanalysen bestimmt und werden in Abbildung 40 gezeigt.

## Ergebnisse

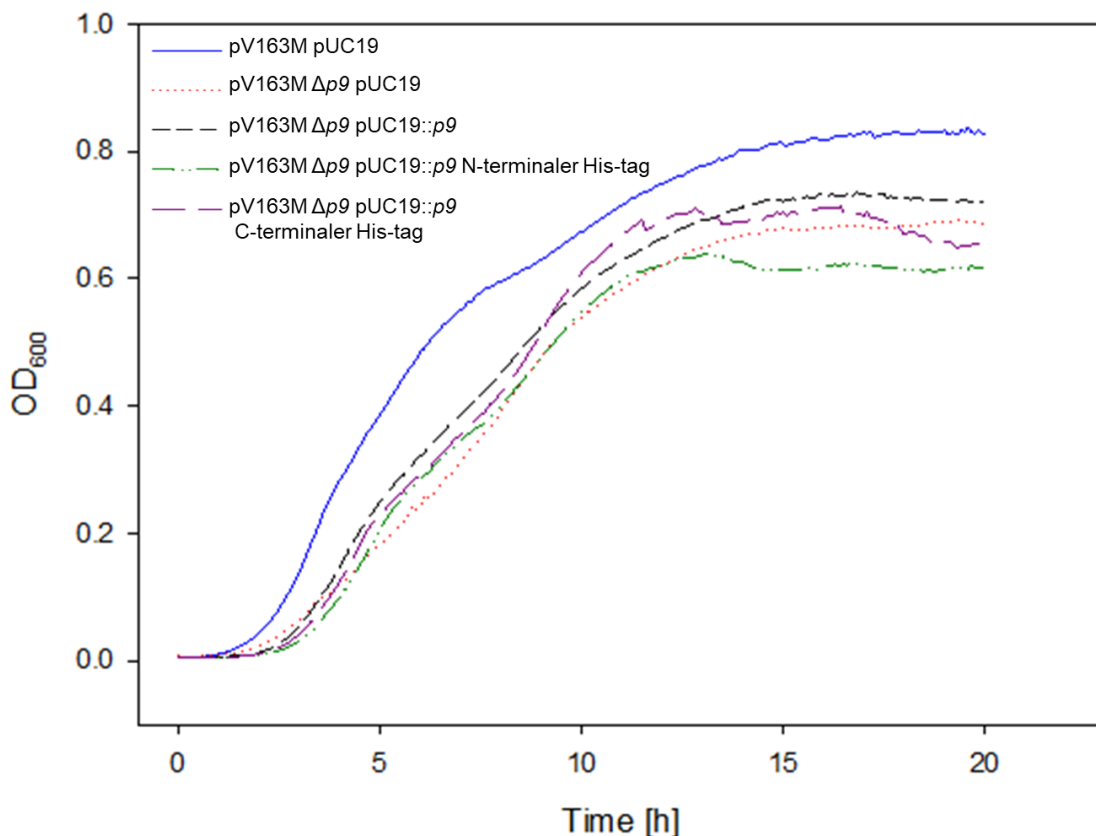


**Abb. 40: Verdopplungsrate von pUC19::*p9* in *E. coli* BL21 mit Zeiteffekt.** Die Bestimmung der Verdopplungsrate erfolgte anhand der ermittelten OD<sub>600</sub>, im Spektralphotometer. Die Angaben der Verdopplungsrate erfolgen in Minuten mit ihrer Standardabweichung und es werden jeweils drei unabhängige Versuche über einen Zeitraum von insgesamt sechs Wochen verglichen (Signif. codes: \*\*\*p ≤ 0,0001 Student's t Test) (schwarz, hellgrau, dunkelgrau).

In allen drei Versuchen wurde für die pV163M  $\Delta p9$  pUC19 Mutante eine schnellere Verdopplungsrate ermittelt im Vergleich zum WT pV163M pUC19. Hier konnte für die pV163M  $\Delta p9$  pUC19 Mutante (29 min) im Vergleich zum WT pV163M pUC19 (35 min) nach der Transformation eine um sechs Minuten schnellere Verdopplungsrate ermittelt werden. Diese verkürzte sich nach weiteren zwei Wochen auf vier Minuten. Der Unterschied zwischen den drei zeitlichen Verläufen war hoch signifikant.

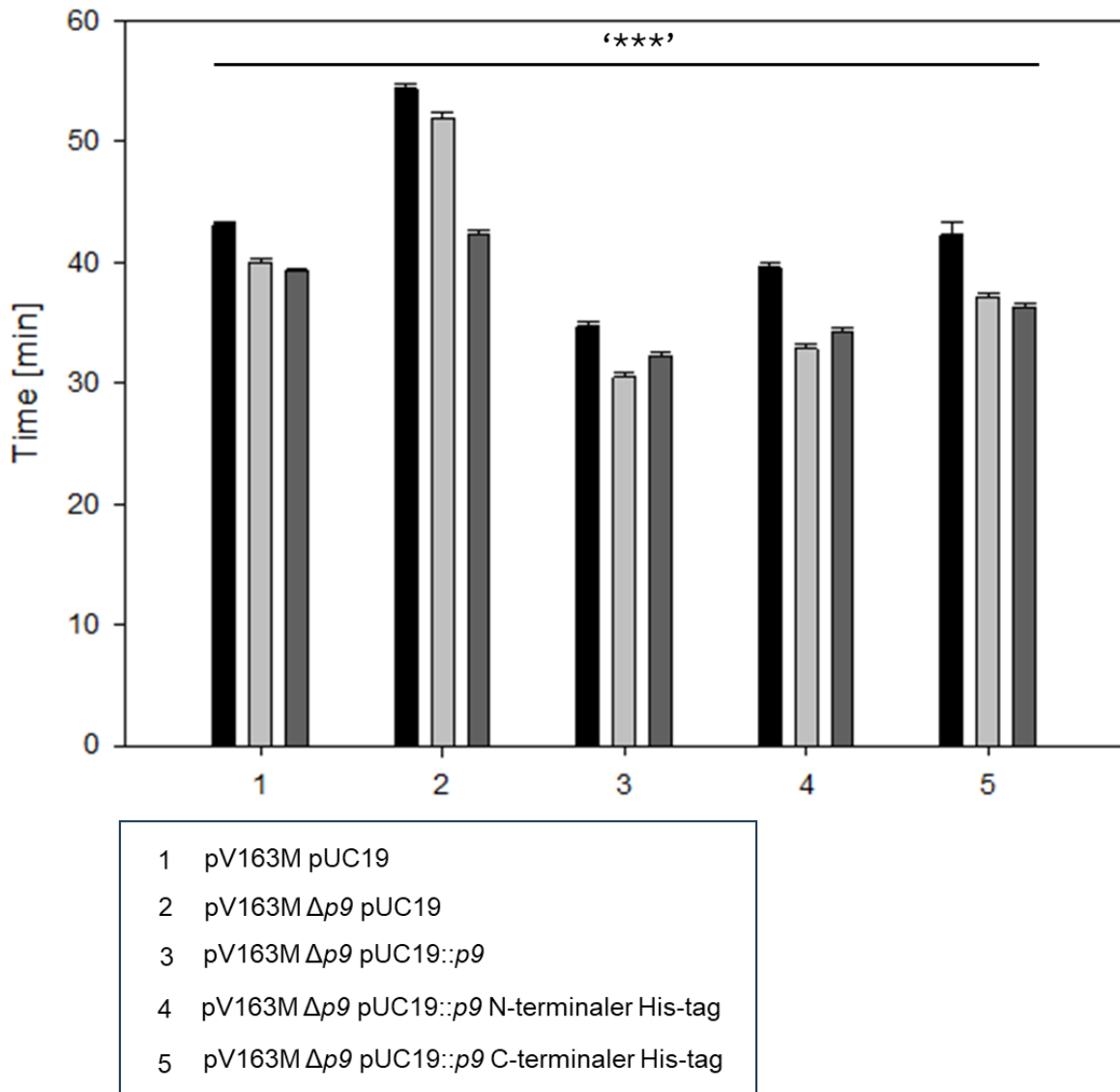
4.2.2 Klonierung eines His-tag-markierten *p9* in pUC19

Der Hexa-Histidin-Tag wird zur Aufreinigung exprimierter Proteine verwendet und wurde an das *p9* Gen angefügt. Dies geschah, indem als Vektor Plasmid pUC19 verwendet wurde. Es wurde zunächst pUC19 und *p9* mit der Sequenz des Hexa-Histidin-Tag mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden zwei unterschiedliche His-Tag-Varianten von *p9* generiert, und zwar eine N-terminale und eine C-terminale. Das Einbringen der getaggten Variante von *p9* in pUC19 erfolgte mit der AQUA Cloning Methode. Anschließend konnte mittels Kontroll-PCR, Restriktion sowie Sanger Sequenzierung das erfolgreiche Einbringen des C-als auch des N-terminalen His-Tags bestätigt werden. Im weiteren Verlauf wurde zunächst mittels Wachstumsanalyse überprüft, ob die Einbringung des His-Tags einen Effekt auf die Fitness der Zellen haben könnte (Abb. 41). Sowohl die Proben mit dem C-terminale als auch mit dem N-terminale His-Tag sind in ihrem Wachstum ähnlich zur Komplementante. Dies zeigt sich auch in den errechneten Verdopplungsraten (Abb. 42).



**Abb. 41: Wachstumsanalyse von pUC19::p9 mit His-tag.** Das Wachstum erfolgte in LB-Medium mit Kanamycin und Ampicillin bei 37°C für 20 Stunden im Spektralphotometer. Die OD<sub>600</sub> wurde dabei alle fünf Minuten gemessen.

## Ergebnisse



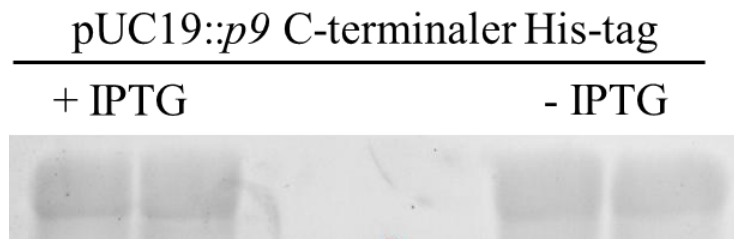
**Abb. 42: Verdopplungsraten von pUC19::p9 mit His-tag.** Die Verdopplungsraten wurden aus den ermittelten OD<sub>600</sub> Werten mit dem Programm GrowthRates berechnet und werden in Minuten angegeben. Es werden drei unabhängige Versuche (Signif. codes: \*\*\*p ≤ 0,0001 Student's t Test) (schwarz, hellgrau, dunkelgrau) verglichen.

### 4.2.2.1 His-Tag-Proteinexpression von P9

Die SDS-PAGE wurde durchgeführt, um das Protein P9 nachweisen zu können. Dafür wurde das Protein P9 aus pUC19::p9 mit dem C-terminalen His-Tag aufgereinigt, wie in Kapitel 3.2.10 beschrieben. Die Proben wurden zum einen so lange inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht war. Anschließend erfolgte die Zugabe von IPTG, damit das p9-Gen abgelesen und bei weiterer Inkubation exprimiert werden kann. Zum anderen wurden die Proben nach Erreichen der OD<sub>600</sub> von 0,6 direkt abzentrifugiert und aufgereinigt, um vergleichen zu können, ob ein Unterschied in der Proteinkonzentration oder der Expression nachzuweisen ist. Es ist außerdem zu beachten, dass das Wachstum der Bakterien bei einer geringeren Zelldichte stoppt, da das LB-Medium

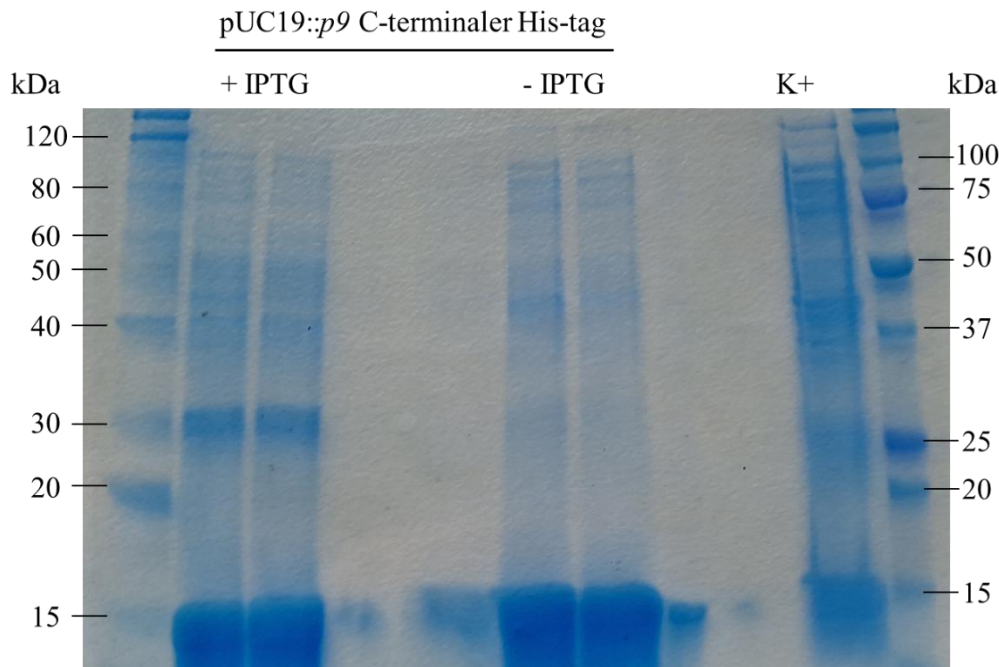
## Ergebnisse

eine geringe Menge Kohlenhydrate und zweiwertige Ionen enthält. Dadurch kommt es auch zu einer geringen basalen Expression des P9. Nach dem Lauf der SDS-PAGE wurde dieses zunächst mit dem InVision™ His- Tag In- Gel Stain gefärbt, um die His-Tag markierten Proteine auf dem Gel sichtbar machen zu können (Abb. 43).



**Abb. 43: SDS-PAGE zum Nachweis von P9.** Das Gel wurde mit dem Farbstoff InVision™ His- Tag In- Gel Stain für eine Stunde gefärbt und anschließend mit einer Waschlösung gewaschen. Die Visualisierung erfolgte am Geldokumentationsgerät mittels Anstrahlung über UV.

Hier ist zu erkennen, dass eindeutig Proteine nachzuweisen sind. Eine genaue Bestimmung der Position war nicht möglich, da die Banden der Marker nach der Färbung nicht sichtbar waren. Anschließend wurde das Gel gewaschen und mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R-250 zur Kontrolle gefärbt (Abb. 44).



**Abb. 44: SDS-PAGE als Kontrolle zum Nachweis von p9.** Die Färbung wurde mit einer Coomassie-Färbelösung für eine Stunde durchgeführt. Als Farbstoff diente dafür Coomassie-Brilliant-Blau R250. Anschließend wurde das Gel mit VE-H<sub>2</sub>O wieder entfärbt. Als Marker wurde an der linken Seite der Bench Mark™ His-tagged Protein Standard und an der rechten Seite der Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards an der rechten Seite aufgetragen.

## Ergebnisse

In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass deutliche Banden, sowohl mit als auch ohne IPTG-Zugabe, im Bereich unter 15 kDa zu erkennen sind. Da die Größe von P9 10,4 kDa beträgt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen um das Protein P9 handelt. Auch für die positiv-Kontrolle, welche eine Größe von 17 kDa hat, konnte eine Bande in diesem Bereich ermittelt werden.

Das P9 Protein konnte ebenfalls in einer Matrix-unterstützten Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) nachgewiesen werden.

Die Proteinsequenz des nachgewiesenen Proteins wird in Abbildung 45 dargestellt.

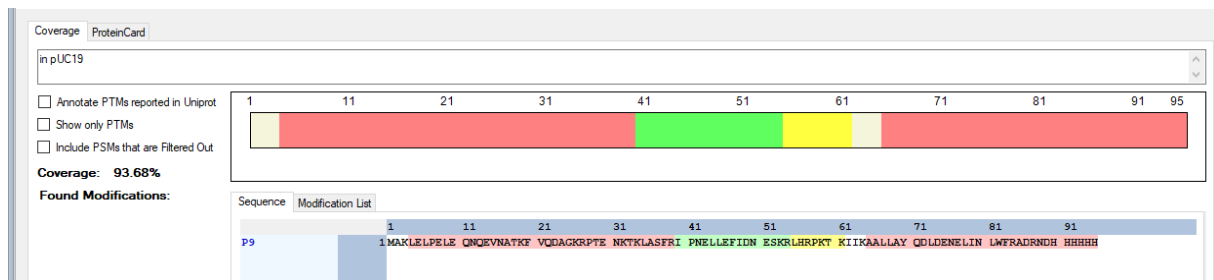


Abb. 45: MALDI-TOF-MS Nachweis des P9 Proteins.

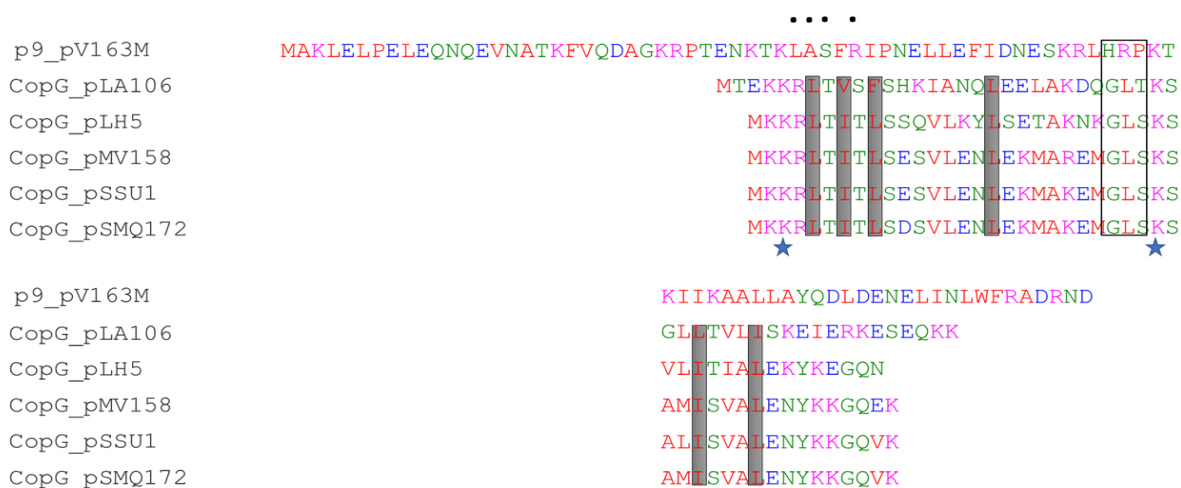
Die Sequenz konnte mit einer Coverage von 93,68% nachgewiesen werden und ist damit fast identisch mit P9.

### 4.2.3 Site-directed Mutagenese von *p9* in pUC19

Um eine Site-directed Mutagenese durchführen zu können, wurde zuerst eine *In silico* Analyse von P9 zum Vergleich der Proteinsequenz von P9 mit anderen Proteinen durchgeführt. Für diese computergestützte Analyse wurde das Programm ProDom verwendet. ProDom ist eine Datenbank von Proteindomänenfamilien, die erstellt wurde, indem alle bekannten Proteinsequenzen verglichen wurden. Die Analyse ergab eine zu 68% bestehende Übereinstimmung mit dem Protein CopG. Das *copG* Gen des Plasmids pMV158 kodiert für den Transkriptionsrepressor CopG (Acebo et al., 1998). Das CopG-Protein bindet und reprimiert den  $P_{cr}$  Promotor, der die Synthese einer bicistronischen mRNA für CopG und den RepB Replikationsinitiator steuert (Del Solar et al., 2002). Damit ist CopG ein Protein, welches die Kopienzahl des pMV158 Plasmids reguliert. Da es sich bei dem *p9* Gen um ein annotiertes Gen mit unbekannter Funktion handelt, könnte es aufgrund der Ähnlichkeit zu CopG eine ähnliche Funktion haben.

## Ergebnisse

Zur Auswahl der geeigneten Stellen für die Aminosäure-Substitutionen in P9 wurde das Programm Clustal Omega verwendet. Clustal Omega ist ein Programm, um ein Alignment mehrerer Sequenzen erzeugen zu können. So wurde die Proteinsequenz von P9 mit der von CopG in verschiedenen Plasmiden aligniert (Abb. 46).



**Abb. 46: Alignment vom P9 Protein im Vergleich mit CopG Proteinen, von RC replizierenden Plasmiden der pMV158 Familie.** Das Alignment wurde mit dem Programm Clustal Omega durchgeführt. Die Proteinsequenz von P9 wurde strukturell mit der von CopG aus verschiedenen Plasmiden angeglichen. Die Punkte markieren Aminosäurereste, die spezifisch mit den DNA-Basen interagieren. Aminosäure, die an derselben Position in allen Plasmiden vorkommen wurden mit einem Stern markiert. Die schattierten Balken markieren konservierte hydrophobe Positionen. Die drei eingerahmten Aminosäuren zeigen den Bereich, der für die Drehung verantwortlich ist und ausgetauscht werden soll.

Das Alignment wurde aus dem Grunde gemacht, um Aminosäurepositionen, die in allen CopG-ähnlichen Proteinen konserviert, also einheitlich sind, zu bestimmen. Solche Positionen sollten für die Funktion dieser Proteine wichtig sein. Die Mutagenese dieser Positionen sollte die Funktion der Proteine negativ beeinflussen, also beeinträchtigen.

Auf Basis der Clustal Omega Alignments aller bekannten CopG-ähnlichen Proteine wurden für die Substitution die Aminosäuren His56, Arg57 und Pro58 ausgewählt. Diese Stellen wurden gewählt, da die Aminosäure Gly25 in CopG eine um 90° verursachte Drehung der Helix B gegenüber der Helix A verursacht. In frühen Studien zu CopG konnte außerdem an Mutanten gezeigt werden, dass eine Mutation an dieser Stelle die Drehung des Helix-Turn-Helix-Motivs beeinflussen würde (Acebo et al., 1996). Der Austausch der Aminosäuren erfolgte gegen die Aminosäure Alanin. Alanin wurde gewählt, da es in der Literatur ebenfalls für Substitutionen verwendet wurde und im Gegensatz zu Histidin und Arginin, die zu den basischen Aminosäuren gehören, eine hydrophobe Aminosäure ist (Acebo et al., 1996). Die Site-directed Mutagenese

## Ergebnisse

wurde, nachdem spezielle Mutageneseprimer designt wurden, mit dem Site-directed Mutagenese Kit von NEB nach Angaben des Herstellers erfolgreich durchgeführt. Insgesamt konnten sieben Mutanten erzeugt werden (Tab. 25). Dazu zählen drei Einzelmutanten, bei denen jeweils nur eine Aminosäure an Position 56, 57 oder 58 ausgetauscht wurde, drei Doppelmutanten, bei denen jeweils zwei Aminosäuren in den Kombination 56/57, 56/58 und 57/58 ausgetauscht wurden sowie eine Dreifachmutante (56/57/58), bei der alle drei Aminosäuren ausgetauscht wurden. Die Mutationsrate war insgesamt sehr hoch, da bei drei bis vier sequenzierten Klonen, bei zwei bis drei eine erfolgreiche Mutation ermittelt werden konnte. Die Effizienz der Mutagenese kann nur bedingt beurteilt werden, da für die Einzelmutanten eine andere Anzahl an Klonen sequenziert wurde als für Doppel- bzw. Dreifachmutante.

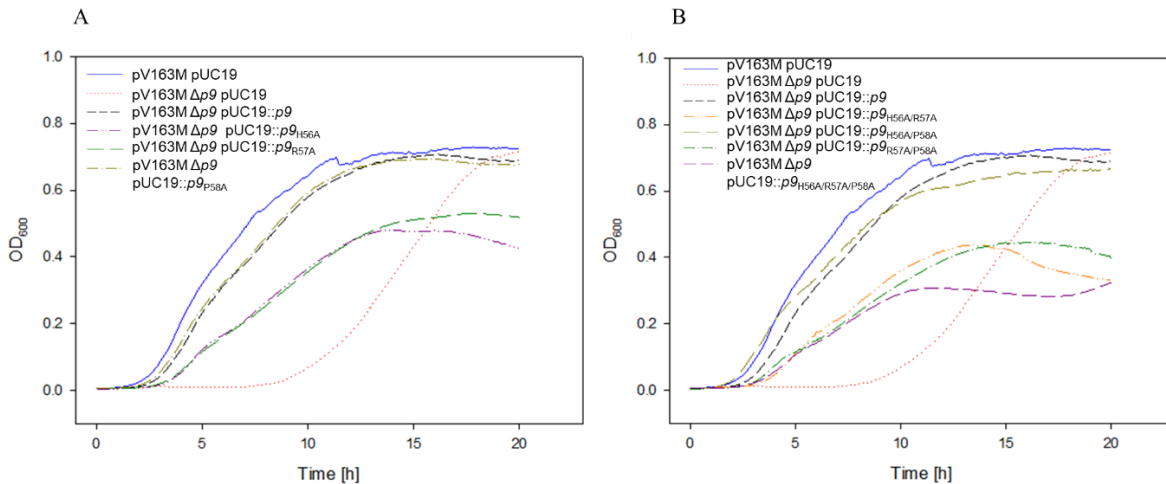
**Tab. 25: Ergebnis der Site-directed Mutagenese von *p9* in pUC19.** Gezeigt werden die Anzahl der Klone, die nach der Transformation insgesamt erhalten wurden für jede Mutante. Außerdem wird die Anzahl der Klone mit der richtigen Mutation gegen die Anzahl der sequenzierten Klone gezeigt.

Mutante	Erhaltene Klone	Anzahl der sequenzierten Klone mit korrekter Mutation
<i>p9</i> <sub>H56A</sub>	16	1/2
<i>p9</i> <sub>R57A</sub>	14	2/3
<i>p9</i> <sub>P58A</sub>	16	3/3
<i>p9</i> <sub>H56A/R57A</sub>	16	4/4
<i>p9</i> <sub>H56A/P58A</sub>	16	2/4
<i>p9</i> <sub>R57A/P58A</sub>	16	4/4
<i>p9</i> <sub>H56A/R57A/P58A</sub>	16	3/4

### 4.2.3.1 Wachstumsanalyse der *p9* Mutanten in pUC19

Nachdem die Mutanten von *p9* in pUC19 erfolgreich erstellt werden konnten, wurde die Fitness der Bakterien mittels einer Wachstumsanalyse überprüft. Die Analyse wurde durchgeführt, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben. Um das Wachstum der Mutanten Vergleichen zu können, erfolgte zunächst die Transformation in die pV163M  $\Delta p9$  Mutante. Es wurden die Einzelmutanten getrennt von den Doppel- und der Dreifach-Mutante (Abb. 47) aufgetragen, um diese besser vergleichen zu können.

## Ergebnisse



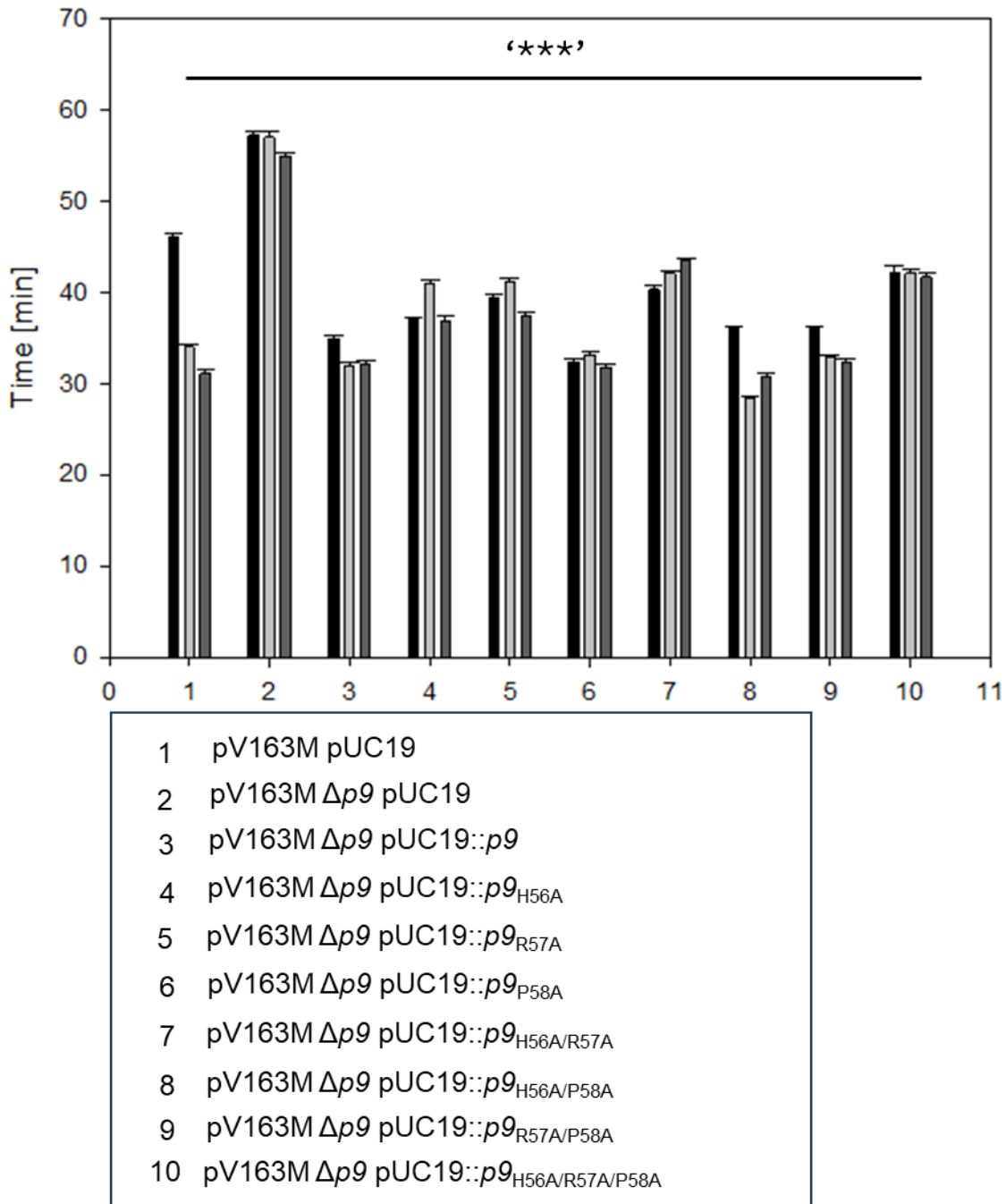
**Abb. 47: Wachstumsanalyse der Mutanten.** Das Wachstum erfolgte in LB-Medium mit den Antibiotika Kanamycin und Ampicillin bei 37°C für 20 Stunden im Spektralphotometer. Die OD<sub>600</sub> wurde alle fünf Minuten gemessen. (A) Die Wachstumskurven der Einzelmutanten *p*<sub>9</sub><sup>H56A</sup>, *p*<sub>9</sub><sup>R57A</sup> und *p*<sub>9</sub><sup>P58A</sup> wurden im Vergleich zum WT pV163M pUC19, der Komplementante pV163M Δ*p*<sub>9</sub> pUC19::*p*<sub>9</sub> und der pV163M Δ*p*<sub>9</sub> pUC19 Mutante aufgetragen. (B) Die Wachstumskurven der Doppelmутanten *p*<sub>9</sub><sup>H56A/R57A</sup>, *p*<sub>9</sub><sup>H56A/P58A</sup> und *p*<sub>9</sub><sup>R57A/H58A</sup> sowie der Dreifachmutante wurden ebenfalls mit denen des WT pV163M pUC19, der Komplementante und der pV163M Δ*p*<sub>9</sub> verglichen.

Es konnte beobachtet werden, dass die Einzelmutante *p*<sub>9</sub><sup>P58A</sup> und die Doppelmутante *p*<sub>9</sub><sup>H56A/P58A</sup> ein ähnliches Wachstum zeigten, wie die Komplementante pV163M Δ*p*<sub>9</sub> pUC19, was darauf hinweisen könnte, dass die Aminosäure Arginin an der Position 58 keinen Einfluss auf die Funktionalität von *p*<sub>9</sub> hat. Die Einzelmutanten *p*<sub>9</sub><sup>H56A</sup> sowie *p*<sub>9</sub><sup>R57A</sup> zeigten eine Ähnlichkeit im Wachstum, wie die Doppelmутanten *p*<sub>9</sub><sup>H56/R57A</sup>, *p*<sub>9</sub><sup>R57A/P58A</sup> und der Dreifachmutante (*H56A/R57A/P58A*). Diese wuchsen deutlich schlechter als der WT und die Komplementante und konnten nur eine maximale OD<sub>600</sub> zwischen 0,52 (*p*<sub>9</sub><sup>R57A</sup>) und 0,32 (*p*<sub>9</sub><sup>H56A/R57A/P58A</sup>) erreichen. Die pV163M Δ*p*<sub>9</sub> Mutante zeigte im Vergleich zum WT pV163M pUC19 (zwei Stunden) und den Site-directed Mutanten (zwei bis drei Stunden) eine deutlich längeren lag-Phase von sieben Stunden und ging erst nach 18 Stunden in die stationäre Phase über. Die Site-directed Mutanten/Komplementanten waren nach 18 Stunden teilweise bereits in der Absterbe-Phase angekommen.

### 4.2.3.2 Bestimmung der Verdopplungsraten

Die Verdopplungsraten wurden anhand der Wachstumskurven bestimmt. Die Analyse erfolgte mit dem Programm GrowthRates 6.2, wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben. Die Wachstumsanalysen wurden jeweils dreimal wiederholt. Die Verdopplungsraten werden immer mit der Standardabweichung angegeben (Abb. 48).

## Ergebnisse



**Abb. 48:** Verdopplungsraten der Site-directed Mutanten von *p9* in pUC19 im Vergleich mit dem WT pV163M pUC19 und der pV163M  $\Delta p9$  pUC19 Mutante. Die Bestimmung der Verdopplungsraten erfolgte anhand der ermittelten OD<sub>600</sub>, im Spektralphotometer. Die Angaben der Verdopplungsraten erfolgen in Minuten mit ihrer Standardabweichung und es werden jeweils drei Versuche verglichen (Signif. codes: \*\*\* $p \leq 0,0001$  Student's t Test) (schwarz, hellgrau, dunkelgrau).

Für den WT pV163M pUC19 liegt diese in Lauf 1 im Vergleich zu den Läufen 2 und 3 um etwa zehn Minuten höher. Aus diesem Grund wurde diese nicht im Vergleich mit den Mutanten berücksichtigt. Wie schon bei den Wachstumsraten zu erkennen war, wurde auch hier bestätigt, dass die Mutante *p9*<sub>P58A</sub> im Vergleich mit der Komplementante pV163M  $\Delta p9$  pUC19::*p9* mit 33 min bzw. 32 min eine durchschnittlich ähnliche Verdopplungsrate hatte. Die Mutanten

## Ergebnisse

$p9_{H56A}$  (38 min),  $p9_{R57A}$  (39 min),  $p9_{H56A/R57A}$  (41 min) und  $p9_{H56A/R57A/P58A}$  (41 min) hatten im Vergleich zum WT pV163M pUC19 (37 min) und der Komplementante pV163M  $\Delta p9$  pUC19:: $p9$  (33 min) eine durchschnittlich langsamere Verdopplungsrate. Für die pV163M  $\Delta p9$  Mutante wurde im Vergleich zu allen Mutanten und zum WT pV163M pUC19 eine deutlich langsamere Verdopplungsrate ermittelt, was sich auch im Wachstum zeigte. Die Unterschiede im Vergleich zum WT waren alle hoch signifikant.

### 4.2.4 Site directed Mutagenese von $p9$ in pV163M

Nachdem die zielgerichtete Mutagenese der drei Aminosäuren Histidin, Arginin und Prolin an den Positionen 56, 57 und 58 von  $p9$  erfolgreich in pUC19 durchgeführt werden konnte und ein Effekt auf die Fitness der Bakterien beobachtet wurde, wurde die Mutagenese im Resistenz-Plasmid pV163M, aus dem  $p9$  stammt, ebenfalls durchgeführt. Da das Site-directed Mutagenese Kit von NEB gute Resultate nur für Plasmide bis 20 kbp bietet, wurde die Mutagenese durch überlappende Primer-paare eingeführt. Hierbei wurden nur für vier Mutanten nach der Transformation Klone erhalten (Tab. 26).

**Tab. 26: Ergebnisse der Site-directed Mutagenese von  $p9$  in pV163M.** Gezeigt werden die Anzahl der Klone, die nach der Transformation insgesamt erhalten wurden für jede Mutante. Außerdem wird die Anzahl der Klone mit der richtigen Mutation gegen die Anzahl der sequenzierten Klone gezeigt.

Mutante	Erhaltene Klone	Anzahl der sequenzierten Klone mit korrekter Mutation
$p9_{H56A}$	1	0/1
$p9_{R57A}$	0	0
$p9_{P58A}$	>16	2/4
$p9_{H56A/R57A}$	0	0
$p9_{H56A/P58A}$	0	0
$p9_{R57A/P58A}$	>16	1/2
$p9_{H56A/R57A/P58A}$	>16	3/6

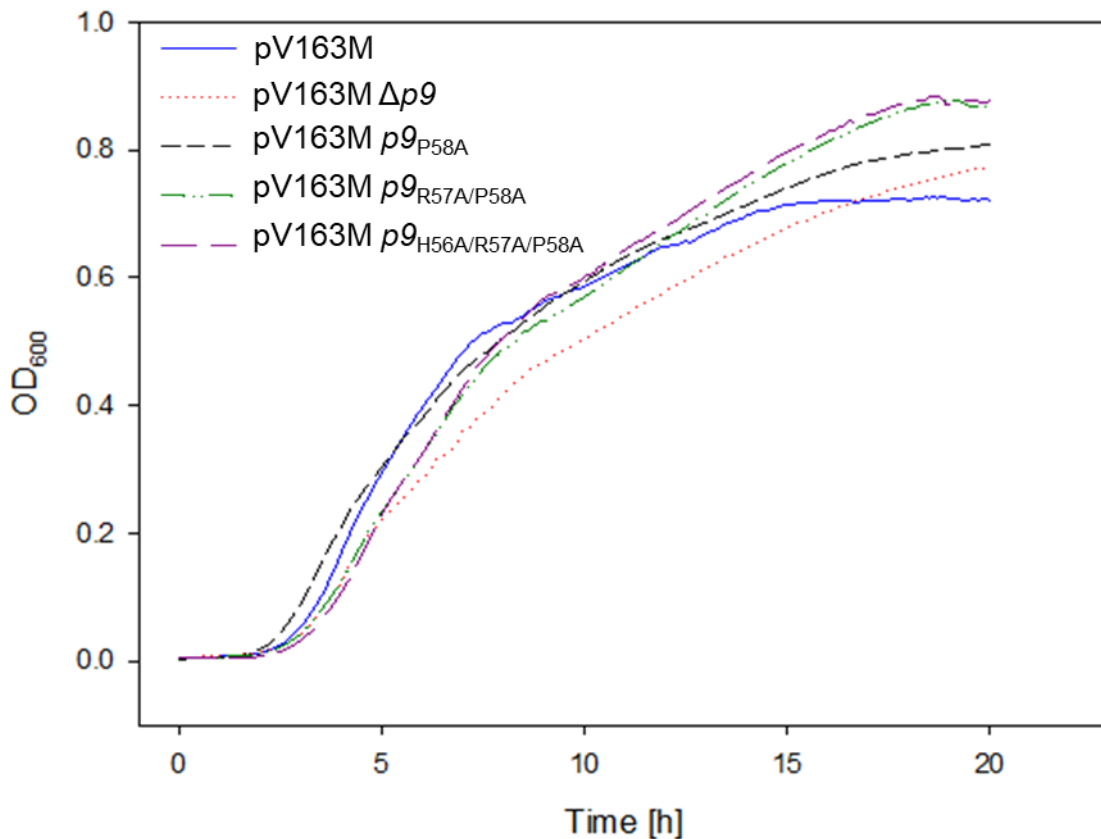
Bei den Mutanten  $p9_{R57A}$ ,  $p9_{H56A/R57A}$  und  $p9_{H56A/P58A}$  konnten entweder keine PCR-Produkte generiert werden, wodurch die Klonierung nicht durchgeführt werden konnte oder die Transformation war, auch nach mehrmaligen Wiederholungen, nicht erfolgreich. Während für die Mutante  $p9_{H56A}$  nur eine Kolonie erhalten wurde, wurden für die Mutanten  $p9_{P58A}$ ,  $p9_{R57A/P58A}$  und  $p9_{H56A/R57A/P58A}$  jeweils mehr als 16 Kolonien erhalten. Für die Kontrolle mittels PCR auf das Vorhandensein des  $p9$  Gens wurden jeweils nur 16 Kolonien verwendet. Anschließend wurden, je nach positiver PCR, Klone für die Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenzierung wurde mit der Next Generation Sequencing Methode von Illumina durchgeführt. Hierbei konnten für

## Ergebnisse

$p9_{P58A}$ ,  $p9_{R57A/P58A}$  und  $p9_{H56A/R57A/P58A}$  Klone mit korrekter Mutation, bzw. mit keinen zusätzlichen Mutationen in den übrigen Abschnitten der mutierten pV163M-Plasmide ermittelt werden. Die Effizienz der Mutagenese kann nur bedingt beurteilt werden, da für jede Mutante eine andere Anzahl an Klonen sequenziert wurden.

### 4.2.4.1 Wachstumsanalyse der $p9$ Mutanten in pV163M

Nachdem drei Mutanten in der Sequenzierung als positiv bestätigt werden konnten, wurde durch eine Wachstumsanalyse untersucht, ob es einen Unterschied in der bakteriellen Fitness zwischen den Mutanten, dem WT pV163M und der pV163M  $\Delta p9$  Mutante gibt (Abb. 49). Die Wachstumsanalyse wurde im Spektralphotometer über einen Zeitraum von 20 Stunden durchgeführt.



**Abb. 49: Wachstumsanalyse der Site-directed Mutanten von  $p9$  in pV163M.** Das Wachstum erfolgte in LB-Medium mit dem Antibiotikum Kanamycin im Spektralphotometer bei 37°C über einen Zeitraum von 20 Stunden. Die OD<sub>600</sub> wurde dabei alle fünf Minuten gemessen. Gemessen wurden drei Ansätze, von denen die Bestimmung der Mittelwerte erfolgte und aufgetragen wurden. Die Wachstumskurven der pV163M-Mutanten  $p9_{P58A}$ ,  $p9_{R57A/P58A}$  und  $p9_{H56A/R57A/P58A}$  wurden mit dem WT und der Deletionsmutante von  $p9$  verglichen.

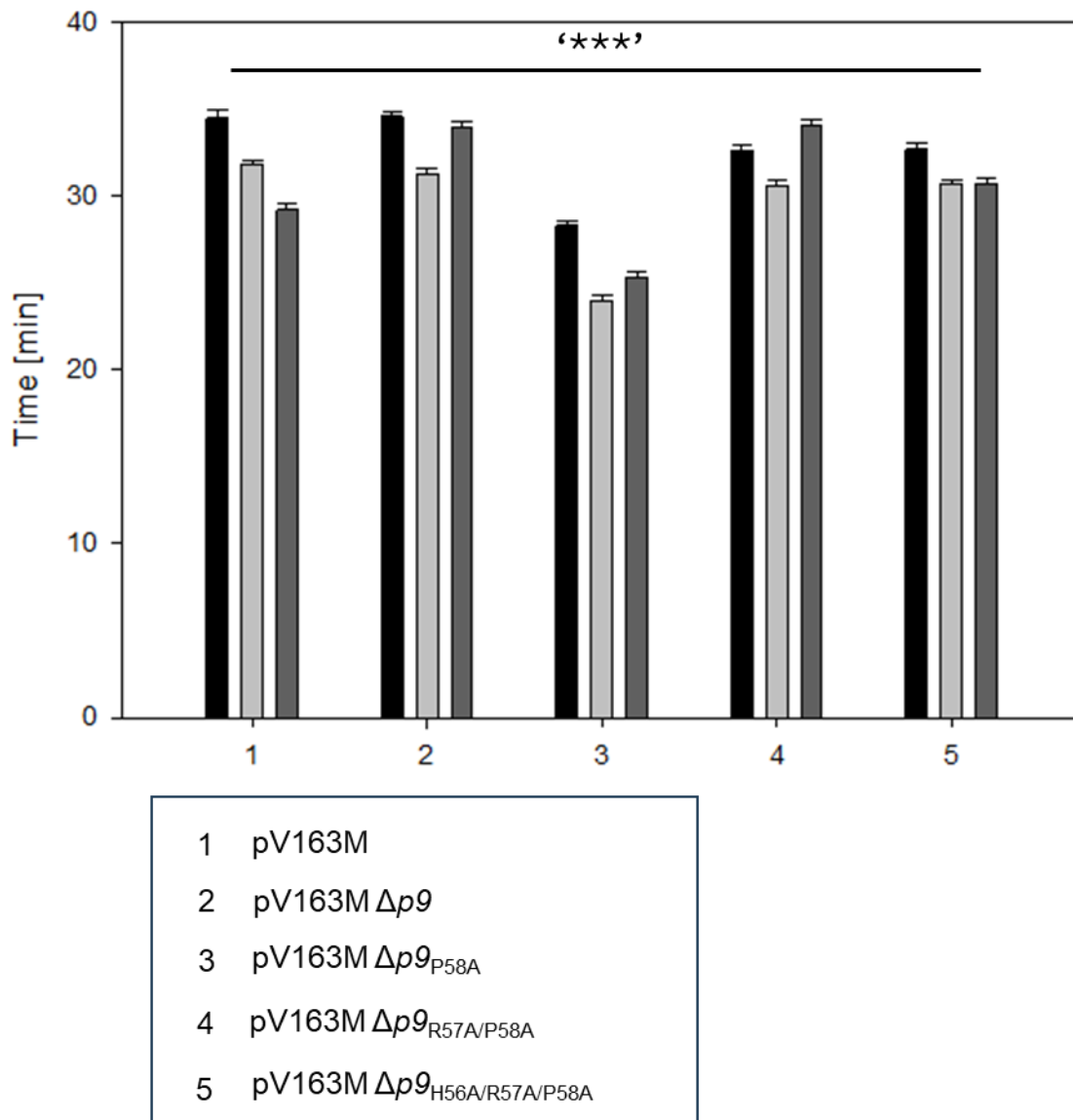
Das Wachstum der pV163M  $\Delta p9$  Mutante ist schlechter als das vom WT pV163M und das der anderen Mutanten. Während die Mutante pV163M  $p9_{P58A}$  ein ähnliches Wachstum wie der WT

## Ergebnisse

pV163M zeigte, wurde für die Mutanten pV163M  $p9_{R57A/P58A}$  und pV163M  $p9_{H56A/R57A/P58A}$  zu Beginn der Messreihe zunächst ein langsames Wachstum beobachtet. Beide Mutanten überholten den WT pV163M nach einem Zeitraum von etwa 12 Stunden und erreichten eine maximale OD<sub>600</sub> von 0,87, während der WT pV163M nur 0,72 erreichte.

### 4.2.4.2 Bestimmung der Verdopplungsraten

Die Verdopplungsraten der Site-directed Mutanten von  $p9$  in pV163M konnten anhand der ermittelten Wachstumsanalysen bestimmt und mit dem WT pV163M und der pV163M  $\Delta p9$  Mutante verglichen werden (Abb. 50). Dafür wurde das Programm GrowthRates 6.2 verwendet und die Bestimmung wie in Kapitel 3.3.4 durchgeführt.



**Abb. 50:** Verdopplungsraten der Site-directed Mutanten von  $p9$  in pV163M im Vergleich mit dem WT und der Deletionsmutante von  $p9$ . Die Bestimmung der Verdopplungsraten erfolgte anhand der ermittelten OD<sub>600</sub>, im Spektralphotometer.

## Ergebnisse

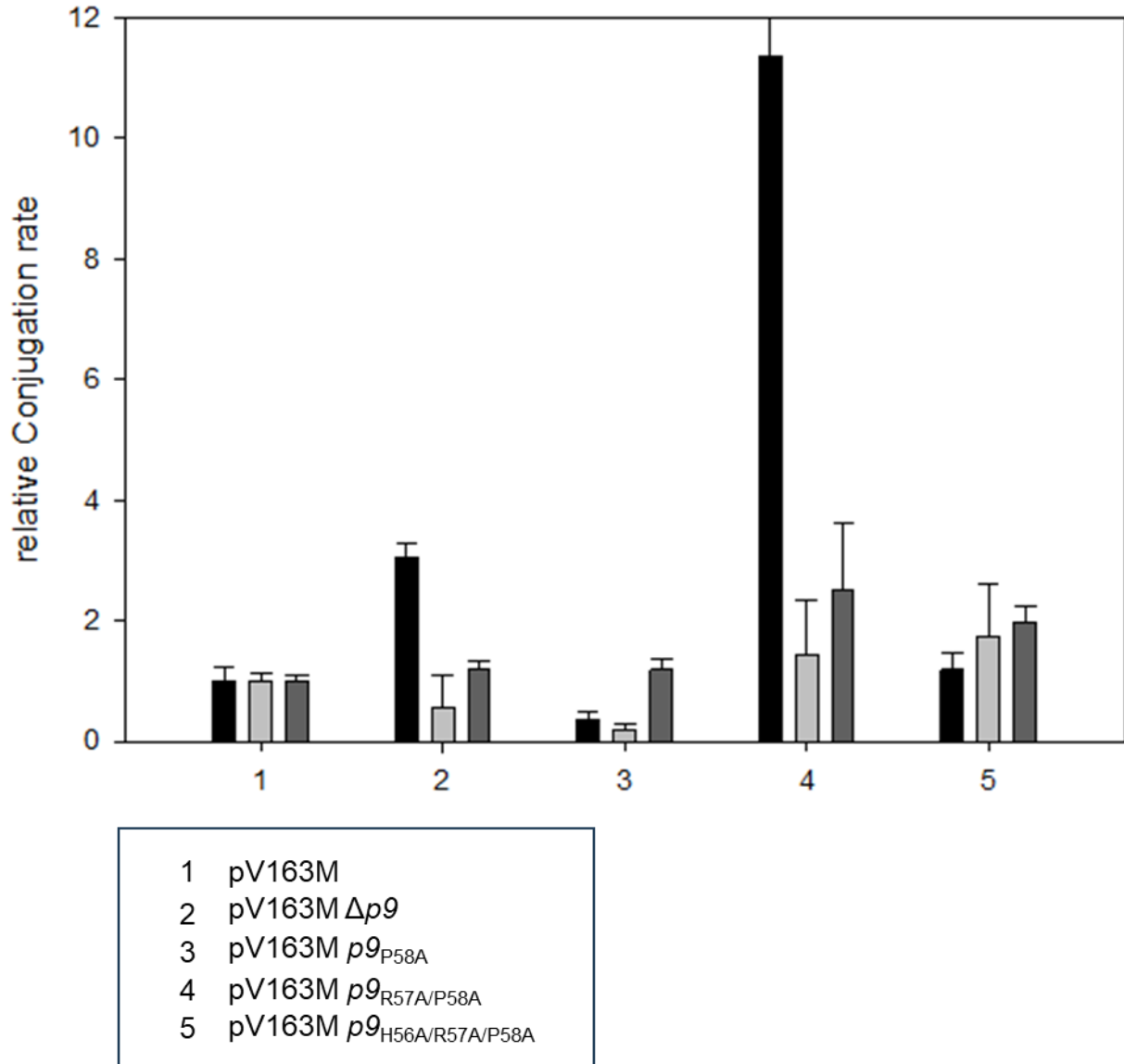
Die Angaben der Verdopplungsraten erfolgen in Minuten mit ihrer Standardabweichung und es werden jeweils drei Versuche verglichen (Signif. codes: \*\*\* $p \leq 0,0001$  Student's t Test) (schwarz, hellgrau, dunkelgrau).

Die Verdopplungsraten werden in Minuten mit ihrer jeweiligen Standardabweichung angegeben. Der Korrelationskoeffizient R liegt bei allen drei Läufen bei 0,99. Die Verdopplungsrate des WT pV163M liegt im Durchschnitt bei 31,8 Minuten. Während bei den Mutanten pV163M  $p9_{R57A/P58A}$  und pV163M  $p9_{H56A/R57A/P58A}$  ein Effekt im Gegensatz zur Mutante pV163M  $p9_{P58A}$  im Vergleich mit dem WT pV163M erkennbar war, ist dies in den Verdopplungsraten nicht erkennbar. Die beiden Mutanten hatten im Schnitt eine ähnliche Verdopplungsrate wie der WT pV163M. Die Mutante pV163M  $p9_{H58A}$  hatte in allen drei Läufen eine durchschnittliche Verdopplungsrate von 26 Minuten und war damit um etwa sechs Minuten schneller als der WT pV163M. Die Unterschiede im Wachstum im Vergleich zum WT waren alle hoch signifikant.

### 4.2.4.3 Konjugationseffizienzen der Mutanten von $p9$ in pV163M

Die Konjugation wurde durchgeführt, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben. Die Konjugationseffizienzen ergeben sich aus dem Verhältnis der Transkonjuganten zu den Donoren. Die durchschnittliche Konjugationseffizienz des WT wird auf 1,0 gesetzt. Dies ist notwendig, um genau bestimmen zu können, ob die Effizienz der Mutanten höher oder niedriger ist als die des WT. Die relativen Konjugationseffizienzen der einzelnen Mutanten wurden zusammen mit der des WT aufgetragen (Abb. 51). Der Versuch wurde dreimal wiederholt.

## Ergebnisse



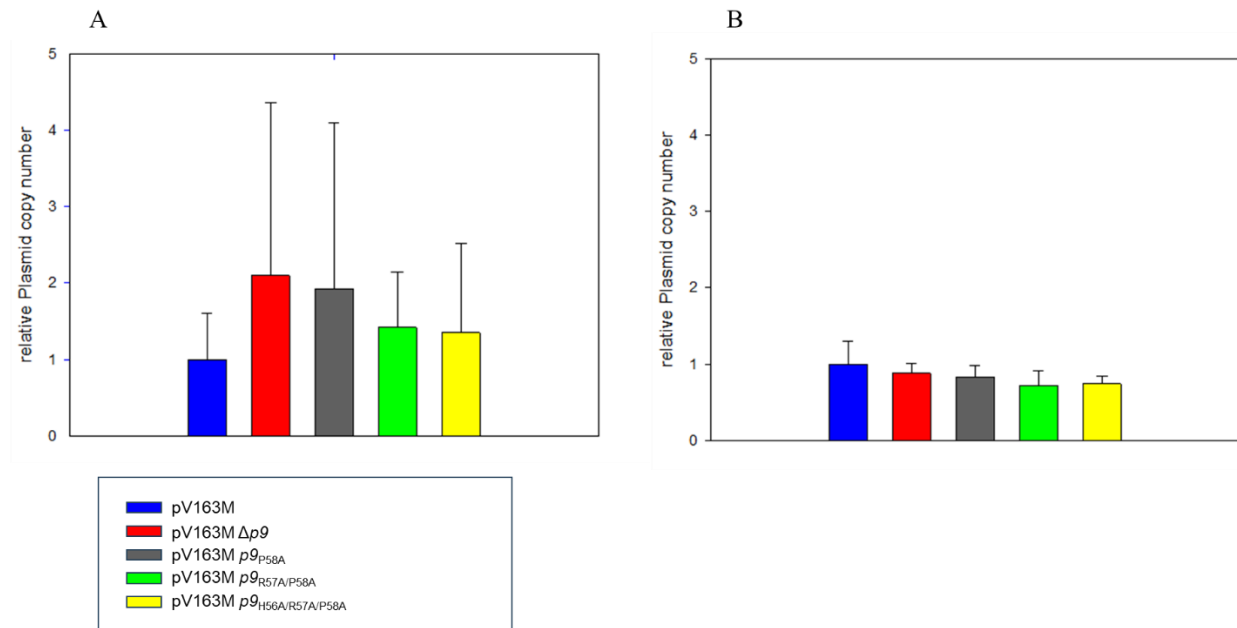
**Abb. 51: Relative Konjugationseffizienz der Mutanten im Vergleich mit dem WT und der pV163M  $\Delta p9$  Mutante.** Als Rezipient diente J53 und als Donor pV163M sowie die Mutanten. Die unterschiedlich gefärbten Balken stellen die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen mit ihrer Standardabweichung dar.

Dabei konnte für die Mutante pV163M  $p9_{P58A}$  eine geringere relative Konjugationseffizienz im Vergleich zum WT pV163M und der pV163M  $\Delta p9$  Mutante ermittelt werden. Die beiden Mutanten pV163M  $p9_{R57A/P58A}$  und pV163M  $p9_{H56A/R57A/P58A}$  hatten hingegen eine deutlich höhere relative Konjugationseffizienz als der WT pV163M und die pV163M  $\Delta p9$  Mutante. Eine Ausnahme ist dabei im ersten Lauf bei der Mutante pV163M  $p9_{H56A/R57A/P58A}$  zu beobachten, da die Konjugationseffizienz hier etwas geringer ist im Vergleich zur pV163M  $\Delta p9$  Mutante.

## Ergebnisse

### 4.2.4.4 Bestimmung der Plasmidkopienzahl

Die relative Plasmidkopienzahl wurde bestimmt, wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben. Um die Kopienzahl der Mutanten besser vergleichen zu können, wurde diese ins Verhältnis zu pV163M gesetzt. Zur Bestimmung der Kopienzahl wurde genomische DNA zum einen direkt aus den ÜNK aufgereinigt, zum anderen wurden die ÜNK verdünnt und anschließend bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,0 inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 dargestellt.



**Abb. 52: Relative Plasmidkopienzahl der Mutanten im Vergleich mit pV163M und der pV163M  $\Delta p9$  Mutante.** Es werden die Mittelwerte von drei Replikaten mit ihrer Standardabweichung dargestellt. (A) Die Plasmidpräparation erfolgte direkt aus der ÜNK. (B) Die Proben sind bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,0 gewachsen.

Dabei wurde festgestellt, dass die relative Plasmidkopienzahl der Mutanten höher ist als beim WT pV163M, wenn genomische DNA aus den ÜNK isoliert wurde. Wurden die ÜNK-Proben verdünnt und bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,0 inkubiert, lag die relative Plasmidkopienzahl der Mutanten um etwa 12% bis 28% niedriger als beim WT pV163M. Die allgemeine Plasmidkopienzahl, aus welcher die relative berechnet wurde, lag im Vergleich zum Chromosomen in allen drei Läufen unter 1,0 bei pV163M, der pV163M  $\Delta p9$  Mutante und den Site-directed Mutanten. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass die beiden Mutanten pV163M  $p9_{R57A/P58A}$  und  $p9_{H56A/R57A/P58A}$  in beiden Ansätzen eine ähnliche Kopienzahl hatten. Die Mutante pV163M  $p9_{P58A}$  dagegen hatte in beiden Ansätzen eine höhere relative Plasmidkopienzahl im Vergleich mit den beiden anderen Mutanten, war aber ähnlich zur pV163M  $\Delta p9$  Mutante.

### 5. Diskussion

Die Resistenz gegen Antibiotika ist eine weltweite Herausforderung, die mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergeht. Multiresistenzen bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien haben dazu geführt, dass Infektionen mit herkömmlichen Antibiotika nur noch schwer oder gar nicht mehr zu behandeln sind. Da die frühzeitige Identifizierung der ursächlichen Mikroorganismen und ihrer Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika in einigen Gesundheitssystemen meist nicht möglich sind, werden Breitbandantibiotika großzügig und meist unnötig eingesetzt (Frieri et al., 2017). Dies führte in den letzten Jahren zu einem dramatischen Anstieg der Resistenzentwicklung (ECDC, 2018, 2022) und es werden dringend neue Wege gesucht, diese Bedrohung zu bekämpfen. Plasmide mit einem breiten Wirtsspektrum, die Resistenzgene gegen solche Breitbandantibiotika kodieren, sind aufgrund ihrer Fähigkeit, sich in einer Vielzahl klinisch relevanter Bakterienarten und Umgebung zu replizieren besonders wichtig für die Verbreitung der Resistenzen (Humphrey et al., 2012). Daher war das Ziel dieser Arbeit die Plasmide der Inkompatibilitätsgruppen N und X4 zu untersuchen und zu charakterisieren, da sie in *Enterobacteriaceae* weit verbreitet sind und Resistenzgene tragen, die für eine Resistenz gegen Colistin oder Carbapenemasen kodieren. Um die Hypothese beweisen zu können, dass diese Plasmide den Zellen einen gewissen Vorteil verschaffen können, wurden die beiden Modell-Plasmide pCF13069 (IncN) und pV163M (IncX4) analysiert.

#### 5.1 IncN

Um das IncN Plasmid pCF13069 charakterisieren zu können, sollten zunächst Deletionsmutanten mit dem Lambda Red-Rekombinase Verfahren erstellt werden. Dafür musste das zu verwendende Plasmid pKD3/4 zunächst umklont werden, da diese eine Resistenz gegen Chloramphenicol und Kanamycin besitzen, die für das Lambda Red-Verfahren im IncN Plasmid nicht genutzt werden konnte, da dieses ebenfalls Resistenzgene gegen diese Antibiotika trägt. Aus verschiedenen Antibiotika, die getestet wurden, wurde das Hygromycin ausgewählt, weil eine Resistenz nachweislich nicht auf dem Plasmid vorhanden war. Dies konnte sowohl durch eine Analyse der Resistenzgene als auch durch ein Konjugationsversuch bestätigt werden, da bei den Transkonjuganten kein Wachstum nachgewiesen werden konnte.

### 5.1.1 Einbringen des Hygromycin-Gens in pKD3/4

Das Hygromycin Resistenzgen wurde zunächst durch die AQUA-Cloning Methode in die Plasmide pKD3 und pKD4 eingebracht. Dies konnte durch eine Kontroll-PCR, bei der das Resistenzgen amplifiziert wurde, bestätigt werden. Jedoch zeigte sich bei der Kontroll-Restriktion, dass das Plasmid insgesamt bzw. einzelne Fragmente zu groß waren. Dies deutet darauf hin, dass die Restriktionsschnittstellen in einem Bereich lagen, der etwa doppelt so groß war, wie erwartet. Eine Ursache dafür könnten die flankierenden FRT-Stellen im Genom von pKD3 und pKD4 sein, durch die das Backbone (pKD3/4) mehrfach eingebaut wurde und das Plasmid insgesamt zu groß wird. Die Rekombinasereaktion funktioniert, indem das FLP-Protein an die FRT-Sequenzen bindet und sie rekombiniert. Das FLP-Protein ist in der Lage sowohl intermolekulare als auch intramolekulare Rekombinationen durchzuführen und funktioniert nachweislich in einer großen Anzahl an Organismen, zu denen auch zahlreiche Bakterienarten gehören (Cox, 1983; Ellermeier et al., 2002). Für diese Theorie spricht, dass ein Einbringen des Hygromycin-Gens ins Genom von pKD3 und pKD4 erst durch die klassische Methode über Restriktionsverdau möglich war.

### 5.1.2 Etablierung der Lambda-Red-Mutagenese

Um die Lambda-Red-Mutagenese erfolgreich anwenden zu können, musste diese zunächst im Labor etabliert werden. Dafür wurde das *lacZ*-Gen auf dem *E. coli* K-12 Stamm MG1655 erfolgreich deletiert. Die Deletion ließ sich durch die Anwendung von X-Gal und IPTG auf der Agarplatte visuell durch die Unterscheidung von blauen und weißen Kolonien nachweisen. Das Ergebnis bestätigte damit die erfolgreiche Deletion des *lacZ*-Gens innerhalb chromosomaler DNA. Die erfolgreiche Anwendung bei Plasmiden konnte damit allerdings noch nicht bestätigt werden.

Auf dem IncN Plasmid pCF13069 sollten insgesamt drei Genabschnitte deletiert werden, die nur auf diesem, im Vergleich mit den anderen MLST 15 Plasmiden vorkommt. Dazu mussten zunächst, wie in Kapitel 4.1.3 erläutert, PCR-Produkte hergestellt werden. Die Amplifizierung war nur für die Bereiche *tnpA*-IS4 family und *secA* bis *KPC 0008* möglich, jedoch nicht für den Bereich der Resistenzgene. Eine mögliche Ursache könnte die homologe Sequenz für das zu deletierende Gen im Primer sein, da die PCR für die anderen Abschnitte funktioniert hatte. Nachdem das PCR-Produkt in die Zelle durch Elektroporation eingebracht wurde, wurden zunächst Klone auf einer Agarplatte erhalten. In einer Kontroll-PCR zeigten sich allerdings Doppelbanden, die im Bereich des WT und der Mutante mit Resistenzkassette lagen. Vermutlich

wurde das ursprüngliche Plasmid mit dem Zielgen und dem deletierten Gen mit der Resistenzkassette verschleppt. Die Bakterien können dann beide Plasmide beibehalten. Dafür kann es verschiedene Ursachen geben. Wie bereits von Datsenko & Wanner in der ursprünglichen Publikation aus dem Jahr 2000 beschrieben wurde, kann der Verdau mit DpnI nicht ausreichend sein, so dass der Verdau nicht vollständig ist und die superspiralisierte Form mit der amplifizierten Sequenz co-migriert und dann nicht mehr zu unterscheiden ist. Allerdings konnten auch nach mehrmaligem Überstreichen auf frische Agarplatten keine Reinkulturen erhalten werden. Um eine eindeutige Aussage treffen zu können, hätten die vermeintlichen Banden der Mutanten aus dem Gel extrahiert und gereinigt werden müssen und anschließend sequenziert. Eine weitere Ursache könnte die Antibiotikakonzentration in der Platte sein. Es wäre möglich, dass das Antibiotikum abgebaut wurde und die Konzentration dadurch geringer war als erwartet, wodurch auch WT-Kolonien wachsen konnten.

Da mit dem Lambda-Red Rekombinase Verfahren für das IncN Plasmid pCF13069 keine reinen Deletionsmutanten erhalten wurden, hatte die Methode in der Anwendung auf diesem Plasmid nicht funktioniert. Dies könnte entweder ein Hinweis darauf sein, dass eine andere Methode verwendet werden müsste oder dass die zu deletierenden Bereiche essenzielle Bereiche für das Plasmid darstellen.

### 5.2 IncX4

Die Gene des IncX4 Plasmid pV163M wurden in früheren Arbeiten deletiert und charakterisiert (Azarderakhsh, 2017 (unv. Masterarbeit), Keitmann, 2023). Es besitzt 52 Gene von denen 22 eine unbekannt Funktion haben. Von diesen 22 Genen wurde das *p9* Gen ausgewählt, da seine Mutante eine Veränderung im Wachstum sowie in der Konjugation im Vergleich zu pV163M zeigte. Im Verlauf der Arbeit wurde das *p9* Gen weiter charakterisiert, da die Ergebnisse darauf hindeuten, dass *p9* die bakterielle Fitness beeinflussen bzw. senken könnte, mit dem Ziel neue mögliche Targets zur Entwicklung neuer Antibiotika zu finden.

#### 5.2.1 Komplementation von *p9* in pUC19 und pACYC184

Zur weiteren Analyse von *p9* wurde eine Komplementante erzeugt. Diese dient dazu, durch die Einführung des mutierten Gens mittels eines Plasmids in die pV163M  $\Delta p9$  Mutante zu beobachten, ob der funktionelle Defekt ausgeglichen werden kann (Fincham, 1968). Die Komplementation war in dem high copy Plasmid pUC19 erfolgreich, im low copy Plasmid

pACYC184 jedoch nicht. Dies konnte mittels Wachstumsanalysen bestätigt werden, da das geringere Wachstum der pV163M  $\Delta p9$  Mutante in der Komplementante (pUC19::*p9*) ausgeglichen werden konnte. In pACYC184 konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse der Wachstumsanalysen konnten auch anhand der Verdopplungsraten bestätigt werden.

### 5.2.1.1 Wachstumseffekt von pUC19::*p9*

Im Verlauf der Arbeit konnte über einen Zeitraum von etwa sechs bis acht Wochen eine Verkürzung der lag-Phase sowie eine Änderung der Generationszeit bei pV163M  $\Delta p9$  pUC19::*p9* (siehe Abb. 28, Abb. 29) im Vergleich mit pV163M pUC19 beobachtet werden. Ein Grund dafür könnte in der Kopienzahl des Plasmids oder in einer Mutation im chromosomalen Hintergrund liegen. Ein weiterer Grund für diesen Effekt könnte das Vorhandensein des Toxin-/Antitoxinsystems auf dem Plasmid sein. Hier könnte es durch eine Stressreaktion, wie dem Vorhandensein von Antibiotika, zu einer selektiv durch ATPase gespaltenen Antitoxine kommen. Der proteolytische Angriff würde dann die Freisetzung des Toxins zur Folge haben, wodurch es zur Hemmung des Zellwachstums kommen kann (Chan et al., 2023). Da die Funktion von *p9* unbekannt ist, wurde überprüft, ob dieser Effekt von *p9* verursacht wurde oder durch eine Wechselwirkung mit dem high copy Plasmid pUC19. Dazu wurde in die *E. coli* Stämme MG1655 und BL21 pV163M pUC19, die pV163M  $\Delta p9$  Mutante und die pV163M  $\Delta p9$  pUC19::*p9* sowie in DH 10 $\beta$  mit nur pUC19::*p9* eingebracht. Für die Überprüfung, ob dieser Effekt auch einen Einfluss auf die Konjugationsrate hat, wurde pUC19::*p9* in den Rezipienten J53 eingebracht.

Da das Abflachen des Wachstums bei pV163M pUC19 und pV163M  $\Delta p9$  pUC19::*p9* in allen drei Bakterienstämmen beobachtet werden konnte, nahm das Plasmid keinen Einfluss auf die Fitness der verschiedenen Bakterien.

Die pV163M  $\Delta p9$  Mutante zeigte jedoch, bis auf die verlängerte lag-Phase, im Wachstum keine größere Veränderung. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich die pV163M  $\Delta p9$  Mutante selbst hochregulieren kann und *p9* einen Einfluss auf die Plasmidkopienzahl nimmt.

### 5.2.1.2 Proteinnachweis von P9

In diesem Versuch wurde P9 auf Proteinebene mit verschiedenen Methoden nachgewiesen. Nach der Auftrennung des Proteins auf SDS-Gelen, wurde eine Bande bei ~15 kDa detektiert. Das SDS-Gel wurde zunächst spezifisch mit einem Farbstoff (InVision™ His-tag In-gel Stain) für His-markierte Proteine gefärbt. Nach Herstellerangabe dient dieser Farbstoff zum Nachweis

eines mit einem His-Tag markierten Proteins und soll dabei die Anwendung eines Western-Blots ersetzen. Der His-Tag Marker wurde mit diesem Farbstoff jedoch nicht sichtbar gemacht, was ungewöhnlich ist, da es laut Herstellerangaben hätte funktionieren müssen. Es wäre möglich, dass der Marker von den P9-Banden überstrahlt wurde, da für diese, im Gegensatz zum Marker ein starkes Signal detektiert wurde. Ein Abschätzen der Größe der Banden war aus diesem Grund nicht möglich.

Das gleiche Bandenmuster wurde bei der anschließenden Färbung mit Coomassie Brilliant Blue beobachtet. Da P9 eine Größe von 10,4 kDa hat, kann davon ausgegangen werden, dass P9 mit beiden Färbemethoden nachgewiesen wurde. Außerdem wurde mit der His-Tag-Färbung gezeigt, dass der eingefügte His-Tag im Protein intakt ist und funktioniert. Da beim Nachweis von P9 im SDS-Page im Vergleich mit und ohne IPTG keine größeren Unterschiede zu erkennen waren, könnte davon ausgegangen werden, dass keine oder nur eine sehr geringe Stimulation des Promotors stattgefunden hatte.

Eine weitere Methode zum Nachweis von P9 auf Proteinebene, war die Bestimmung der Proteinsequenz mittels MALDI-TOF-MS. Hier wurde bestätigt, dass die Proteinsequenz von P9 nach der Extraktion der Banden aus dem SDS-Gel bestimmt werden konnte. Damit konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden, dass die Komplementation von P9 funktioniert hat. Da die Komplementation erstmal auf Proteinebene bestätigt wurde, wurde an dem *p9* Gen nicht weitergearbeitet.

### 5.2.2 Site-directed Mutagenese von *p9*

In diesem Versuch wurde der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren in *p9* durchgeführt, nachdem in einer *In silico* Analyse eine 68%ige Übereinstimmung mit dem Protein CopG gefunden wurde. Es wurden drei Aminosäurepositionen ausgewählt, die in allen CopG-ähnlichen Proteinen einheitlich waren. Die Positionen sollten für die Funktion des Proteins wichtig sein, und durch eine Mutagenese negativ beeinflusst werden. Für die Substitution wurde Alanin ausgewählt.

Die Mutagenese wurde zunächst in pUC19::*p9* und anschließend im Plasmid pV163M direkt durchgeführt. In Tabelle 27 werden die Ergebnisse der Site-directed Mutagenese zusammengefasst.

## Diskussion

**Tab. 27: Vergleich der Site-directed Mutagenese in pUC19 und pV163M.** Die mit einem + markierten Mutanten wurden erfolgreich erstellt. Die mit einem – markierten Mutanten konnten auch nach mehrmaliger Wiederholung nicht generiert werden.

Mutante	pUC19	pV163M
<i>p9</i> <sub>H56A</sub>	+	-
<i>p9</i> <sub>R57A</sub>	+	-
<i>p9</i> <sub>P58A</sub>	+	+
<i>p9</i> <sub>H56A/R57A</sub>	+	-
<i>p9</i> <sub>H56A/P58A</sub>	+	-
<i>p9</i> <sub>R57A/P58A</sub>	+	+
<i>p9</i> <sub>H56A/R57A/P58A</sub>	+	+

Es wurde bestätigt, dass der Mutagenese-Erfolg in pUC19::*p9* deutlich höher war als in pV163M. Während in pUC19 sieben *p9* Mutanten generiert wurden, waren es in pV163M lediglich drei. Ein genereller Grund dafür könnte die Methode sein. Für pUC19::*p9* konnte das NEB Site-directed Mutagenese Kit verwendet werden, welches eine Polymerase mit einer extrem hohen Genauigkeit verwendet. Es bietet gute Resultate bei Plasmiden bis zu einer Größe von 20 kbp. Da pUC19::*p9* mit einer Größe von 2632 bp relativ klein ist, konnte mit diesem Kit eine gute Mutationsrate erzielt werden.

Die Mutation in pV163M (36502 bp) musste dagegen mit überlappenden Primerpaaren eingebracht werden, mit denen das gesamte Plasmid amplifiziert wurde (zwei Fragmente). Da die zu amplifizierenden Fragmente relativ groß waren, konnte es zu Missense Mutationen kommen. Zur Überprüfung wurde das gesamte Plasmid mittels Next-generation Sequencing sequenziert und die gefundenen mutierten Bereiche analysiert. Da jede Aminosäure durch mehr als ein Codon kodiert wird, war es auch wichtig stille Mutationen, bei denen zwar das Codon verändert war, jedoch nicht die Proteinsequenz betroffen ist, zu berücksichtigen. Auch eine stille Mutation kann die Funktion der Zelle beeinflussen, indem sie die Expression und Regulation des Gens verändert (Zhang et al., 2012). Aus diesem Grund wurden Klone, bei denen sowohl stille Mutationen als auch Veränderte Proteinsequenzen ermittelt wurden nicht berücksichtigt.

### 5.2.2.1 Wachstumsanalyse der Site-directed Mutanten

Das Wachstumsverhalten der Site-directed Mutanten wurde in pUC19 und pV163M untersucht. Die Einzelmutanten H56A und R57A, die Doppelmutanten R57A/P58A und die Dreifachmutante H56A/R57A/P58A unterscheiden sich im Wachstum in pUC19 und pV163M im Vergleich zu pV163M und pV163M pUC19. Nur die Einzelmutante P58A hatte ein ähnliches Wachstum im Vergleich mit pUC19::*p9* und pV163M.

Anhand der Wachstumsanalyse kann davon ausgegangen werden, dass die ausgewählten Aminosäurepositionen einen negativen Einfluss auf die Funktionalität des P9 Proteins nehmen und die Fitness der Bakterien beeinflussen. Dies zeigte sich vor allem an der Dreifachmutante, die ein deutlich schlechteres Wachstum zeigte im Vergleich mit den anderen Mutanten und pV163M. Die Ergebnisse der Wachstumsanalyse zeigen sich auch in denen der Wachstumsraten. Auch hier konnte ein Effekt für die Mutanten H56A/P58A und H56A/R57A/P58A in pUC19 und pV163M beobachtet werden. Die Einzelmutanten H56A und R57A zeigten in pUC19 ebenfalls ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu pV163M pUC19. Für diese Mutanten konnten in pV163M keine Aussagen getroffen werden, da die Generierung nicht möglich war. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass nur die Aminosäuren Histidin und Arginin an den Positionen 56 und 57 einen negativen Effekt haben. Für die Mutante P58A wurde in beiden Plasmiden ein ähnliches Wachstum ermittelt im Vergleich mit pV163M, was darauf hindeutet, dass diese Aminosäureposition keinen negativen Einfluss hat.

### 5.2.2.2 Konjugationseffizienz der Site-directed Mutanten in pV163M

Die Bestimmung der Konjugationseffizienz erfolgte in den Site-directed Mutanten in pV163M. Dabei zeigte die Einzelmutante P58A eine geringere Konjugationseffizienz im Vergleich zur Mutante pV163M  $\Delta p9$ . Für die Doppelmutante R57A/P58A sowie die Dreifachmutante H56A/R57A/P58A wurde eine höhere Konjugationseffizienz im Vergleich mit pV163M und der Mutante pV163M  $\Delta p9$  ermittelt. Insgesamt waren jedoch die Konjugationseffizienzen aller Mutanten im Vergleich zu pV163M erhöht. Dies spricht ebenfalls dafür, dass Histidin und Prolin die Funktionalität negativ beeinflussen könnten. Es würde außerdem für die Theorie sprechen, dass *p9* an der Regulation der Plasmidkopienzahl beteiligt ist, da diese die Konjugationseffizienz beeinflussen kann.

### 5.2.3 Bestimmung der Plasmidkopienzahl

Plasmide selbst üben eine strenge Kontrolle über ihre Erhaltung in der Zelle aus. Die Kontrolle der Replikation stellt sicher, dass Plasmide in definierter Kopienzahl vorliegen (Del Solar et al., 1995). Die Plasmidkopienzahl wurde in den Site-directed Mutanten von *p9* in pV163M im Vergleich mit pV163M und der Mutante pV163M  $\Delta p9$  bestimmt. Es wurde dabei für alle Mutanten eine deutlich höhere Kopienzahl ermittelt im Vergleich mit pV163M, wenn direkt aus der ÜNK isoliert wurde. Wurde verdünnt und bei OD<sub>600</sub> 1,0 isoliert, war die Kopienzahl generell geringer als bei pV163M. Dies liegt vermutlich daran, dass die Zellzahl der isolierten Bakterien deutlich

geringer war im Vergleich mit der ÜNK. Es wäre auch möglich, dass in der ÜNK eine höhere Zahl an Chromosomkopien vorhanden waren. In den Versuchen wurde die relative Kopienzahl des Plasmids auf das Chromosom bezogen berechnet und nicht die absolute Kopienzahl. Die Ermittlung der absoluten Kopienzahl war unter Verwendung der Nanopore-Sequenzierung nicht möglich, es hätte eine absolute Quantifizierung der Genomkopienzahl mit z. B. digitaler PCR stattfinden müssen. Dies wäre eine Aufgabe für nachfolgende Studien.

Aufgrund der Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass *p9* vermutlich einen Einfluss auf die Regulation der Kopienzahl von pV163M nimmt. Auch in Studien zu CopG konnte bei Mutanten, die zur Synthese eines defekten CopG-Proteins führen eine Erhöhung der Kopienzahl ermittelt werden (Del Solar et al., 1995).

In beiden Ansätzen konnte für die Mutante P58A nur eine geringe Abweichung der Kopienzahl im Vergleich mit der Mutante pV163M  $\Delta p9$  ermittelt werden, was mit den Ergebnissen der Wachstumsanalyse und der Konjugationseffizienz übereinstimmt. Anhand aller Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Aminosäure Prolin an Position 58 keinen Einfluss auf die Funktionalität von P9 nimmt, die Aminosäuren Histidin und Arginin an den Positionen 56 und 57 jedoch schon. Allgemein sollte jedoch berücksichtigt werden, dass der Austausch der Aminosäuren zu Unterschieden in der Sekundärstruktur des Proteins und seiner Stabilität führen kann, auch wenn sich generell die meisten Aminosäuren durch Punktmutationen austauschen lassen.

Für Alanin ist bekannt, dass es die Sekundärstrukturpräferenz der meisten kodierten Aminosäuren nachahmt, weshalb es sich zur Analyse der Proteinfunktion besonders gut eignet (Kubyshkin & Budisa, 2019). Aus diesem Grund wurden die oben genannten Positionen zu Alanin mutiert.

### 5.3 Zukunftsaussichten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das P9 Protein des Resistenzplasmids pV163M charakterisiert werden. Es konnten zwei Aminosäurepositionen ermittelt werden, die einen negativen Effekt auf die Funktionalität des Proteins zu haben scheinen. Zur weiteren Analyse sollte zunächst versucht werden, die fehlenden Mutanten in pV163M eventuell mit einer anderen Methode zu generieren. In weiteren Studien sollte dann mit einem Beta-Galaktosidase-Assay die direkte Rolle von *p9* auf den Promotor des Replikationsgens *pir* bestimmt werden, um sagen zu können, ob *p9* mit diesem interagiert oder Einfluss auf diesen nimmt. Weiterhin sollten die DNA-Protein-Interaktionsstellen durch eine Analyse der hypothetischen DNA-Bindestellen von P9

## Diskussion

mittels Chromatin ImmunoPrecipitation DNA-Sequencing (ChIP-Seq) untersucht werden (Myers et al., 2015).

In weiteren Versuchen sollten außerdem weitere Gene von pV163M, dessen Deletionsmutanten in Voruntersuchungen deutliche Unterschiede im Wachstum und der Konjugation zum WT zeigten näher charakterisiert werden.

Da für das Modell-Plasmid pCF13069 aus der IncN-Gruppe generell keine Generierung von Deletionsmutanten möglich war, sollte auch hier nach einer geeigneteren Methode gesucht werden, diese zu erzeugen. Danach sollten diese ebenfalls zunächst mittels Wachstumsanalysen, Konjugationseffizienz, Antibiotikaresistenztestungen und Plasmid-Stabilitäts-Assays untersucht werden.

### 6. Zusammenfassung

Die Resistenz gegen Antibiotika ist eine weltweite Herausforderung und es werden dringend neue Wege gesucht, diese zu bekämpfen. Für die Verbreitung dieser Resistenzen spielen Plasmide eine wichtige Rolle. Sie kodieren Resistenzgene gegen Breitbandantibiotika und besitzen, aufgrund ihrer Fähigkeit sich in einer Vielzahl klinisch relevanter Bakterienarten und Umgebung zu replizieren, ein breites Wirtsspektrum. Daher war das Ziel dieser Arbeit zwei Modellplasmide der Inkompatibilitätsgruppen N und X4, die Resistenzgene gegen Colistin und Carbapenemasen kodieren, zu untersuchen, mit dem Ziel beweisen zu können, dass diese Plasmide ihrem Wirt einen gewissen Vorteil verschaffen können und neue mögliche Targets zur Entwicklung neuer Antibiotika auf Plasmidebene zu finden.

Dazu sollten vom Modellplasmid pCF13069 (IncN) Deletionsmutanten mittels des Lambda-Red-Rekombinase Verfahren erzeugt werden, wozu, aufgrund seiner vielen Resistenzen, zunächst das pKD4 Plasmid umklont wurde. Die Generierung der Mutanten war anschließend nicht erfolgreich. Vermutlich wurde hier das ursprüngliche Plasmid mit dem Zielgen und dem deletierten Gen verschleppt, sodass keine reinen Deletionsmutanten erzeugt werden konnten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die zu deletierenden Bereiche essenziell für das Plasmid sein könnten.

Im Modellplasmid pV163M (IncX4) wurde das hypothetische Protein P9 untersucht. Dazu wurde zunächst die Komplementation von *p9* in pUC19 und pACYC184 durchgeführt, welche jedoch nur in pUC19 erfolgreich, aber instabil war. Das Protein P9 konnte anschließend auch auf Proteinebene mittels MALDI-TOF-MS und SDS-PAGE nachgewiesen werden. Für die Durchführung einer Site-directed-Mutagenese wurde eine *In silico* Analyse durchgeführt, um geeignete Stellen im *p9* Gen zu finden. Es konnte eine 68%ige Übereinstimmung mit dem, in Gram-positiven Bakterien vorkommenden, CopG Protein gefunden werden. Da dieses ein Kopienzahl-Regulator ist, kann davon ausgegangen werden, dass *p9* ebenfalls für die Kontrolle der Plasmid-Kopienzahl in pV163M verantwortlich ist. Nach einem Vergleich der Proteinsequenzen wurden Einfach-, Doppel- und Dreifachmutanten in pUC19 und pV163M erzeugt. Die Aminosäuren Histidin, Prolin und Arginin wurden an den Positionen 56, 57 und 58 gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Die Charakterisierung der Mutanten wurde mittels Wachstumsanalyse und Konjugationsversuchen durchgeführt. Da die Mutante P58A ein ähnliches Wachstum zeigte wie die Komplementante, kann davon ausgegangen werden, dass die Aminosäure Prolin an der Position 58 keinen Einfluss auf die Funktionalität von *p9* nimmt.

## 7. Summary

Resistance to antibiotics is a global challenge and new ways of combating resistance are urgently being sought. Plasmids play an important role in the spread of this resistance. They encode resistance genes against broad-spectrum antibiotics and have a broad host range due to their ability to replicate in a variety of clinically relevant bacterial species and environments. Therefore, the aim of this work was to investigate two model plasmids of the incompatibility group N and X4, encoding resistance genes against colistin and carbapenemases, with the aim to prove that these plasmids can confer a certain advantage to their host and to find new potential targets for the development of new antibiotics at plasmid level. For this purpose, deletion mutants were to be generated from the model plasmid pCF13069 (IncN) using the lambda red recombinase method, for which the pKD4 plasmid was modified to carry hygromycin resistance due to the many resistances pCF13069 carries. The generation of pCF13069 mutants was unsuccessful. Presumably, the original plasmid was carried over with the target gene and the deleted gene, so that no pure deletion mutants could be generated. This might be a hint that the regions that had to be deleted are essential regions for the maintenance of the plasmid.

The hypothetical protein P9 was examined in the model plasmid pV163M (IncX4). First, the complementation of *p9* in pUC19 and pACYC184 was performed, which was only successful in pUC19, but unstable. Complementation was then also detected at the protein level using MALDI-TOF-MS and SDS-PAGE. For site-directed mutagenesis, an *in silico* analysis was performed to find suitable sites in the *p9* gene. A 68% match was found with the CopG protein found in Gram-positive bacteria. As this is a copy number regulator, it can be assumed that *p9* is also responsible for controlling the plasmid copy number in pV163M. After comparing the protein sequences, single, double, and triple mutants were generated in pUC19 and pV163M. The amino acids histidine, proline and arginine were exchanged for the amino acid alanine at positions 56, 57 and 58. The characterization of the mutants was carried out by means of growth analysis and conjugation experiments. Since the mutant P58A showed similar growth to the complementant, it can be assumed that the amino acid proline at position 58 has no influence on the functionality of *p9*.

**8. Literaturverzeichnis**

- Acebo, P., Alda, M. T., Espinosa, M. & Del Solar, G. (1996). Isolation and characterization of pLS 1 plasmid mutants with increased copy numbers. *FEMS Microbiology Letters*, *140*(1), 85–91. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(96\)00165-6](https://doi.org/10.1016/0378-1097(96)00165-6)
- Acebo, P., García de Lacoba, M., Rivas, G., Andreu, J. M., Espinosa, M. & Del Solar, G. (1998). Structural features of the plasmid pMV158-encoded transcriptional repressor CopG, a protein sharing similarities with both helix-turn-helix and  $\beta$ -sheet DNA binding proteins. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, *32*(2), 248–261. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19980801\)32:2<248::AID-PROT11>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19980801)32:2<248::AID-PROT11>3.0.CO;2-D)
- Aparicio-Blanco, J., Vishwakarma, N., Lehr, C.-M., Prestidge, C. A., Thomas, N., Roberts, R. J., Thorn, C. R. & Melero, A. (2024). Antibiotic resistance and tolerance: What can drug delivery do against this global threat? *Drug delivery and translational research*, *14*(6), 1725–1734. <https://doi.org/10.1007/s13346-023-01513-6>
- Azarderakhsh, Saina (2017). Analyse der Erfolgsmechanismen von *mcr-1*-kodierenden IncX4-Plasmiden (unveröffentlichte Masterarbeit, Biologie). Universität Marburg, Marburg
- Bachmann, B. J. (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriological reviews*, *36*(4), 525–557. <https://doi.org/10.1128/br.36.4.525-557.1972>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A. & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, *19*(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Berger-Bächli, B. (2001). Mechanismen der Antibiotika-Resistenzbildung in Bakterien. *Mitteilungen Aus Lebensmitteluntersuchungen Und Hygiene*. <https://doi.org/10.5167/UZH-61964>
- Beyer, H. M., Gonschorek, P., Samodelov, S. L., Meier, M., Weber, W. & Zurbriggen, M. D. (2015). AQUA Cloning: A Versatile and Simple Enzyme-Free Cloning Approach. *PLoS one*, *10*(9), e0137652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137652>
- Bielak, E. M. (2012). Diversity and epidemiology of plasmids from Enterobacteriaceae from human and non-human reservoirs, 2012.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology*, *13*(1), 42–51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Bru, C., Courcelle, E., Carrère, S., Beausse, Y., Dalmar, S. & Kahn, D. (2005). The ProDom database of protein domain families: more emphasis on 3D. *Nucleic acids research*, *33*(Database issue), D212–5. <https://doi.org/10.1093/nar/gki034>
- Bush, K. & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *53*(6), 2227–2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>

## Literaturverzeichnis

- Carattoli, A. (2011). Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 301(8), 654–658. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.003>
- Casadaban, M. J. & Cohen, S. N. (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 138(2), 179–207. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(80\)90283-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90283-1)
- Cox, M. M. (1983). The FLP protein of the yeast 2-microns plasmid: expression of a eukaryotic genetic recombination system in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(14), 4223–4227. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.14.4223>
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- Datta, N. & Hedges, R. W. (1971). Compatibility Groups among fi- R Factors. *Nature*, 234(5326), 222–223.
- D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N. & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- D'Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W. & Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5759), 374–377. <https://doi.org/10.1126/science.1120800>
- Del Solar, G., Acebo, P. & Espinosa, M. (1995). Replication control of plasmid pLS1: efficient regulation of plasmid copy number is exerted by the combined action of two plasmid components, CopG and RNA II. *Molecular microbiology*, 18(5), 913–924. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.18050913.x>
- Del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M. & Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(2), 434–464. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.434-464.1998>
- Del Solar, G., Hernández-Arriaga, A. M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M. & Espinosa, M. (2002). A genetically economical family of plasmid-encoded transcriptional repressors involved in control of plasmid copy number. *Journal of bacteriology*, 184(18), 4943–4951. <https://doi.org/10.1128/JB.184.18.4943-4951.2002>
- Dolejska, M., Villa, L., Hasman, H., Hansen, L. & Carattoli, A. (2013). Characterization of IncN plasmids carrying bla CTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(2), 333–339. <https://doi.org/10.1093/jac/dks387>
- ECDC (2018). Antimicrobial consumption - Annual Epidemiological Report for 2018.
- ECDC (2022). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual epidemiological report for 2022.
- Eikmeyer, F., Hadiati, A., Szczepanowski, R., Wibberg, D., Schneiker-Bekel, S., Rogers, L. M., Brown, C. J., Top, E. M., Pühler, A. & Schlüter, A. (2012). The complete genome sequences of four new IncN plasmids from wastewater treatment plant effluent provide new insights into IncN plasmid diversity and evolution. *Plasmid*, 68(1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.01.011>

## Literaturverzeichnis

- Ellermeier, C. D., Janakiraman, A. & Slauch, J. M. (2002). Construction of targeted single copy lac fusions using lambda Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. *Gene*, 290(1-2), 153–161. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(02\)00551-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(02)00551-6)
- Emmerich, I. U. & Drees, M. (2016). Neubewertung von Colistin durch übertragbares Resistenzgen. *Deutsches Tierärzteblatt*, 11, 1644-1648
- Falgenhauer, L., Waezsada, S.-E., Yao, Y., Imirzalioglu, C., Käsbohrer, A., Roesler, U., Michael, G. B., Schwarz, S., Werner, G., Kreienbrock, L. & Chakraborty, T. (2016). Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(3), 282–283. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00009-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00009-8)
- Fincham, J. R. (1968). Genetic complementation. *Science progress*, 56(222), 165–177.
- Fogarty, L. R., Haack, S. K., Johnson, H. E., Brennan, A. K., Isaacs, N. M. & Spencer, C. (2015). *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) at ambient freshwater beaches. *Journal of water and health*, 13(3), 680–692. <https://doi.org/10.2166/wh.2014.278>
- Frieri, M., Kumar, K. & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*, 10(4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- Gao, R., Hu, Y., Li, Z., Sun, J., Wang, Q., Lin, J., Ye, H., Liu, F., Srinivas, S., Li, D., Zhu, B., Liu, Y.-H., Tian, G.-B. & Feng, Y. (2016). Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. *PLoS pathogens*, 12(11), e1005957. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005957>
- García-Fernández, A., Villa, L., Moodley, A., Hasman, H., Miriagou, V., Guardabassi, L. & Caratoli, A. (2011). Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(9), 1987–1991. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr225>
- Gastmeier, P. & Geffers, C. (2008). Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Wie viele gibt es wirklich? [Nosocomial infections in Germany. What are the numbers, based on the estimates for 2006?]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*, 133(21), 1111–1115. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1077224>
- Hall, B. G., Acar, H., Nandipati, A. & Barlow, M. (2014). Growth rates made easy. *Molecular biology and evolution*, 31(1), 232-238 <https://doi.org/10.1093/molbev/mst187>
- Hanahan, D. (1985). DNA Cloning: A Practical Approach. *IRL Press, Vol. 1*, S. 109.
- Helinski, D. R. (2004). Introduction to Plasmids: a Selective View of Their History. In B. E. Funnell & G. J. Phillips (Hrsg.), *Plasmid Biology* (S. 1–21). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1128/9781555817732.ch1>
- Hinchliffe, P., Yang, Q. E., Portal, E., Young, T., Li, H., Tooke, C. L., Carvalho, M. J., Paterson, N. G., Brem, J., Niumsup, P. R., Tansawai, U., Lei, L., Li, M., Shen, Z., Wang, Y., Schofield, C. J., Mulholland, A. J., Shen, J., Fey, N., . . . Spencer, J. (2017). Insights into the Mechanistic Basis of Plasmid-Mediated Colistin Resistance from Crystal Structures of the Catalytic Domain of MCR-1. *Scientific reports*, 7, 39392. <https://doi.org/10.1038/srep39392>
- Humphrey, B., Thomson, N. R., Thomas, C. M., Brooks, K., Sanders, M., Delsol, A. A., Roe, J. M., Bennett, P. M. & Enne, V. I. (2012). Fitness of *Escherichia coli* strains carrying expressed and partially silent IncN and IncP1 plasmids. *BMC microbiology*, 12, 53. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-53>

## Literaturverzeichnis

- Jacoby, G. A [G. A.] & Han, P. (1996). Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, 34(4), 908–911. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.4.908-911.1996>
- Jeon, J. H., Lee, J. H., Lee, J. J., Park, K. S., Karim, A. M., Lee, C.-R., Jeong, B. C. & Lee, S. H. (2015). Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *International journal of molecular sciences*, 16(5), 9654–9692. <https://doi.org/10.3390/ijms16059654>
- Johnson, T. J., Bielak, E. M., Fortini, D., Hansen, L. H., Hasman, H., Debroy, C., Nolan, L. K. & Carattoli, A. (2012). Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. *Plasmid*, 68(1), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.03.001>
- Keitmann, N. (2023). Hochdurchsatz-Mutagenese von natürlichen Plasmiden mittels Recombineering. <http://dx.doi.org/10.22029/jlupub-17904>
- Köhler, W., Eggers, H. J. & Ansorg, R. (Hrsg.). (2001). *Medizinische Mikrobiologie: 197 Tab* (8., völlig neu bearb. Aufl.). G.Fischer.
- Koskiniemi, S., Pránting, M., Gullberg, E., Näsval, J. & Andersson, D. I. (2011). Activation of cryptic aminoglycoside resistance in *Salmonella enterica*. *Molecular microbiology*, 80(6), 1464–1478. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07657.x>
- Krey, A. (2004). Molekularbiologische Resistenzmechanismen und Therapieoptionen bei europäischen *Staphylococcus aureus* Isolaten. <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=2924>
- Kubyschkin, V. & Budisa, N. (2019). The Alanine World Model for the Development of the Amino Acid Repertoire in Protein Biosynthesis. *International journal of molecular sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215507>
- Lilly, J. & Camps, M. (2015). Mechanisms of Theta Plasmid Replication. *Microbiology spectrum*, 3(1), PLAS-0029-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0029-2014>
- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H. & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Livermore, D. M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(1), 11–23. [https://academic.oup.com/cid/article/36/Supplement\\_1/S11/301524](https://academic.oup.com/cid/article/36/Supplement_1/S11/301524)
- Lutgring, J. D. & Limbago, B. M. (2016). The Problem of Carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant-Enterobacteriaceae Detection. *Journal of clinical microbiology*, 54(3), 529–534. <https://doi.org/10.1128/JCM.02771-15>
- Martinez, E., Bartolomé, B. & La Cruz, F. (1988). pACYC184-derived cloning vectors containing the multiple cloning site and *lacZ* alpha reporter gene of pUC8/9 and pUC18/19 plasmids. *Gene*, 68(1), 159–162. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90608-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90608-7)
- Myers, K. S., Park, D. M., Beauchene, N. A. & Kiley, P. J. (2015). Defining bacterial regulons using ChIP-seq. *Methods (San Diego, Calif.)*, 86, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.05.022>

## Literaturverzeichnis

- Nordmann, P., Poirel, L. & Dortet, L. (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging infectious diseases*, 18(9), 1503–1507. <https://doi.org/10.3201/eid1809.120355>
- Norrander, J., Kempe, T. & Messing, J. (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*, 26(1), 101–106. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90040-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90040-9)
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiological reviews*, 51(4), 381–395. <https://doi.org/10.1128/mr.51.4.381-395.1987>
- Ruiz-Masó, J. A., Machón, C., Bordanaba-Ruiseco, L., Espinosa, M., Coll, M. & Del Solar, G. (2015). Plasmid Rolling-Circle Replication. *Microbiology spectrum*, 3(1), PLAS-0035-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0035-2014>
- Schaufler, K. (2017). Functional plasmid analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* of pandemic sequence types ST131 and ST648. <https://doi.org/10.17169/REFUBIUM-17773>
- Schumann, W. (1990). Biologie Bakterieller Plasmide. *Vieweg+Teubner Verlag*; Imprint. <https://e-bookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=6693697>
- Schwengers, O., Hoek, A., Fritzenwanker, M., Falgenhauer, L., Hain, T., Chakraborty, T. & Goesmann, A. (2020). ASA3P: An automatic and scalable pipeline for the assembly, annotation and higher-level analysis of closely related bacterial isolates. *PLoS computational biology*, 16(3), e1007134. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007134>
- Sievers, F. & Higgins, D. G. (2018). Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 27(1), 135–145. <https://doi.org/10.1002/pro.3290>
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C. & La Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 74(3), 434–452. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- Snyder, L. & Champness, W. (1997). Molecular genetics of bacteria. *ASM Press*.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of molecular biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Summers, D. K. (1997). The biology of plasmids [Repr.]. *Blackwell Science*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781444313741> <https://doi.org/10.1002/9781444313741>
- Sun, J., Fang, L.-X., Wu, Z., Deng, H., Yang, R.-S., Li, X.-P., Li, S.-M., Liao, X.-P., Feng, Y. & Liu, Y.-H. (2017). Genetic Analysis of the IncX4 Plasmids: Implications for a Unique Pattern in the *mcr-1* Acquisition. *Scientific reports*, 7(1), 424. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00095-x>
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, 119(6 Suppl 1), S3-10; discussion S62-70. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>
- Wallmann, J. (1999). Antibakterielle Chemotherapie unter dem Aspekt der Antibiotikaresistenz. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 42(1), 58-61.
- Westphal-Settele, K., Konradi, S., Balzer, F., Schönfeld, J. & Schmithausen, R. (2018). Die Umwelt als Reservoir für Antibiotikaresistenzen : Ein wachsendes Problem für die öffentliche Gesundheit? [The environment as a reservoir for antimicrobial resistance : A growing problem for

## Literaturverzeichnis

- public health?]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 61(5), 533–542. <https://doi.org/10.1007/s00103-018-2729-8>
- White, A. R. (2011). Effective antibacterials: at what cost? The economics of antibacterial resistance and its control. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(9), 1948–1953. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr260>
- Wright, G. D. (2011). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 47(14), 4055–4061. <https://doi.org/10.1039/c0cc05111j>
- Wu, R., Yi, L.-X., Yu, L.-F., Wang, J., Liu, Y., Chen, X., Lv, L., Yang, J. & Liu, J.-H. (2018). Fitness Advantage of *mcr-1*-Bearing IncI2 and IncX4 Plasmids in Vitro. *Frontiers in microbiology*, 9, 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00331>
- Xia, J., Gao, J. & Tang, W. (2016). Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Bioscience trends*, 10(1), 14–21. <https://doi.org/10.5582/bst.2016.01020>
- Yao, Y., Falgenhauer, L., Rezazadeh, Y., Falgenhauer, J., Imirzalioglu, C. & Chakraborty, T. (2024). Predominant transmission of KPC-2 carbapenemase in Germany by a unique IncN plasmid variant harboring a novel non-transposable element (NTE KPC -Y). *Microbiology spectrum*, 12(1), e0256423. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02564-23>
- Zhang, Z., Miteva, M. A., Wang, L. & Alexov, E. (2012). Analyzing effects of naturally occurring missense mutations. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2012, 805827. <https://doi.org/10.1155/2012/805827>
- Zhgun, A. A. (2024). Pharmaceutical Fermentation: Antibiotic Production and Processing. *Fermentation*, 10(8), 419. <https://doi.org/10.3390/fermentation10080419>
- Zhu, X. D. & Sadowski, P. D. (1995). Cleavage-dependent ligation by the FLP recombinase. Characterization of a mutant FLP protein with an alteration in a catalytic amino acid. *The Journal of biological chemistry*, 270(39), 23044–23054. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.39.23044>

## Abkürzungsverzeichnis

### 9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AmpC	AmpC Beta-Laktamasen
AMR	Antimicrobial Resistance
Ap	Ampicillin
Ap <sup>R</sup>	Ampicillin Resistenz
Aqua a.i.	Aqua ad injectabilia
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid Dihydrat
cfu	colony forming units
Cm	Chloramphenicol
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol Resistenz
Col	Colistin
CTX	Cefotaxim
ddH <sub>2</sub> O	Reinstwasser
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP's	Deoxynucleotide Solution Mix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	Extended-Spectrum Beta-Laktamasen
EtOH	Ethanol
FB	Flush Buffer
Flp	Flippase
FLT	Flush Tether
GOI	gene of interest
HCl	Salzsäure
Hyg	Hygromycin B
Inc	Inkompatibilität
IPTG	Isoprpyl-β-D-thiogalactopyranosid
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
Km	Kanamycin
Km <sup>R</sup>	Kanamycin Resistenz
LB	Lysogenie Broth, Loading Beads

## Abkürzungsverzeichnis

<i>mcr-1</i>	mobile colistin resistance gene
MDR	multidrug resistant
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid Hexahydrat
MHB-Medium	Müller-Hinton-Bouillon
min	Minute
MLST	Multilocus Sequenz Typ
MnCl <sub>2</sub>	Mangan(II)-chlorid, Monohydrat
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NaZ	Natriumazid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
NGS	Next Generation Sequencing
OD	optische Dichte
P9	hypothetisches Protein 9
PCR	Polymerase chain reaction
pRNA	Primer-ribonucleic acid
RC	Rolling Circle
RNA	Ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SOC	Super Optimal Broth
SQB	Sequencing Buffer
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc <sup>R</sup>	Tetrazyklin Resistenz
Tet	Tetrazyklin
TRIS	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
ÜNK	Übernachtkultur
VE-H <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

**10. Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Angriffspunkte für Antibiotika in der Bakterienzelle. .... 1

Abb. 2: Molekulare Mechanismen von Antibiotika Resistenzen. .... 4

Abb. 3: Allgemeiner Aufbau eines Plasmids. .... 6

Abb. 4: Inkompatibilität zweier Plasmide mit demselben Replikon. .... 8

Abb. 5: Chemischer Mechanismus für die MCR-1 katalysierende Reaktion in *E. coli*. .... 10

Abb. 6: Plasmidkarte von pV163M. .... 11

Abb. 7: Schematische Darstellung der AQUA-Klonierung. .... 34

Abb. 8: Mutagenese mittels 2-Fragment Methode. .... 34

Abb. 9: Schematische Darstellung des Lambda-Red-Rekombinase Verfahrens. .... 35

Abb. 10: Primerdesign am Beispiel von pKD4. .... 36

Abb. 11: Plasmidkarte des pSIM5-Tet. .... 37

Abb. 12: Primerdesign für die Site-directed Mutagenese. .... 37

Abb. 13: Beispiel einer BSA-Standardkurve mit sechs Punkten in Excel. .... 40

Abb. 14: Ausschnitt einer verwendeten Standardtabelle. .... 43

Abb. 15: Ausschnitt einer results-Datei. .... 43

Abb. 16: Ausschnitt einer summary-Datei. .... 43

Abb. 17: Plasmidkarte des Resistenzplasmids pCF13069 (in Referenz: pCP13069-KPC2) (Yao et al., 2024). .... 48

Abb. 18: Plasmidkarte von pKD4 und pKD4-Hyg. .... 50

Abb. 19: PCR zur Identifizierung positiver Klone von pKD4::*hyg*. .... 51

Abb. 20: Schematische Darstellung der Um-Klonierung der Resistenzkassette in pKD4 durch Restriktionsverdau. .... 52

Abb. 21: Blau-Weiß-Selektion nach Deletion des *lacZ*-Gen. .... 54

Abb. 22: BRIG-Grafik der IncN Plasmide unterschiedlicher MLST. .... 55

Abb. 23: Darstellung des PCR-Ergebnisses zur Identifizierung von möglichen pCF13069  $\Delta$ secA-KPC 0008 Mutanten. .... 56

Abb. 24: Plasmidkarte von pUC19 und pUC19 mit *p9*. .... 57

Abb. 25: Restriktionsverdau zur Kontrolle der Klonierung von pUC19::*p9*. .... 58

Abb. 26: Plasmidkarte von pACYC184 und pACYC184 mit *p9*. .... 59

Abb. 27: Restriktionsverdau zur Kontrolle der Klonierung von pACYC184::*p9*. .... 59

Abb. 28: Wachstumsanalyse der Komplementante im Vergleich mit dem WT und der Mutante von pV163M. .... 61

Abb. 29: Wachstumseffekt der Komplementation von *p9* in pUC19 nach acht Wochen. .... 62

Abb. 30: Wachstumsanalyse der Komplementation von *p9* in pACYC184 im Vergleich mit der Mutante und dem WT. .... 63

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 31: Verdopplungsraten der Komplementation von <i>p9</i> in pUC19 im Vergleich mit dem WT (pV163 pUC19) und der Deletionsmutante von <i>p9</i> (pV163M $\Delta$ <i>p9</i> pUC19).....	64
Abb. 32: Verdopplungsraten der Komplementation von <i>p9</i> in pACYC184 im Vergleich mit dem WT und der Deletionsmutanten von <i>p9</i> .....	65
Abb. 33: Relative Konjugationsrate der Komplementation in pUC19.....	66
Abb. 34: Wachstumsanalyse von pUC19:: <i>p9</i> in <i>E. coli</i> DH10 $\beta$ mit Zeiteffekt.....	68
Abb. 35: Verdopplungsraten von pUC19:: <i>p9</i> in <i>E. coli</i> DH10 $\beta$ mit Zeiteffekt.....	69
Abb. 36: Relative Konjugationsrate von pV163M und pV163M $\Delta$ <i>p9</i> mit zeitlichem Expressionseffekt von <i>p9</i> (pUC19:: <i>p9</i> ).....	70
Abb. 37: Wachstumsanalysen von MG1655 mit zeitlichem Expressionseffekt von <i>p9</i> . ....	71
Abb. 38: Verdopplungsraten von pUC19:: <i>p9</i> in <i>E. coli</i> MG1655 mit Zeiteffekt. ....	72
Abb. 39: Wachstumsanalyse von BL21 mit dem zeitlichem Expressionseffekt von <i>p9</i> . ....	73
Abb. 40: Verdopplungsraten von pUC19:: <i>p9</i> in <i>E. coli</i> BL21 mit Zeiteffekt.....	74
Abb. 41: Wachstumsanalyse von pUC19:: <i>p9</i> mit His-tag.....	75
Abb. 42: Verdopplungsraten von pUC19:: <i>p9</i> mit His-tag. ....	76
Abb. 43: SDS-PAGE zum Nachweis von P9. ....	77
Abb. 44: SDS-PAGE als Kontrolle zum Nachweis von <i>p9</i> . ....	77
Abb. 45: MALDI-TOF-MS Nachweis des P9 Proteins.....	78
Abb. 46: Alignment vom P9 Protein im Vergleich mit CopG Proteinen, von RC replizierenden Plasmiden der pMV158 Familie.....	79
Abb. 47: Wachstumsanalyse der Mutanten. ....	81
Abb. 48: Verdopplungsraten der Site-directed Mutanten von <i>p9</i> in pUC19 im Vergleich mit dem WT pV163M pUC19 und der pV163M $\Delta$ <i>p9</i> pUC19 Mutante. ....	82
Abb. 49: Wachstumsanalyse der Site-directed Mutanten von <i>p9</i> in pV163M.....	84
Abb. 50: Verdopplungsraten der Site-directed Mutanten von <i>p9</i> in pV163M im Vergleich mit dem WT und der Deletionsmutante von <i>p9</i> .....	85
Abb. 51: Relative Konjugationseffizienz der Mutanten im Vergleich mit dem WT und der pV163M $\Delta$ <i>p9</i> Mutante.....	87
Abb. 52: Relative Plasmidkopienzahl der Mutanten im Vergleich mit pV163M und der pV163M $\Delta$ <i>p9</i> Mutante.....	88

**11. Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Auflistung aller verwendeten Geräte mit Herstellerangaben. .... 14

Tab. 2: Auflistung aller verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben..... 15

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien mit Abkürzung und Herstellerangaben. .... 16

Tab. 4: Angaben der verwendeten Konzentrationen von X-Gal und IPTG..... 17

Tab. 5: Auflistung der verwendeten Antibiotika in den Nährmedien. .... 18

Tab. 6: Angaben der Komponenten der verwendeten Puffer. .... 18

Tab. 7: Angaben der Komponenten der verwendeten Lösungen..... 19

Tab. 8: Auflistung aller verwendeten Enzyme mit ihren dazugehörigen Puffern..... 20

Tab. 9: Verwendete *E. coli* Bakterienstämme und ihre jeweiligen Genotypen mit Referenzangabe..... 20

Tab. 10: Verwendeten Plasmide und ihre jeweiligen Charakteristika mit Referenzangabe. .... 21

Tab. 11: Primer zur Um-Klonierung der Resistenzkassette der Plasmide pKD3 und pKD4. .... 22

Tab. 12: Primer zum Nachweis der IncN Deletionsmutanten und der durch Aqua cloning umklonierten Plasmide pKD3 und pKD4..... 23

Tab. 13: Primer zur Generierung der IncN Mutanten mit dem Lambda-Red-Mutagenese Verfahren... 23

Tab. 14: Primer zur Generierung der Komplementanten von  $\Delta p9$ ..... 24

Tab. 15: Primer zur Generierung der *p9* Deletionsmutanten von pV163M mit der Lambda-Red-Mutagenese..... 24

Tab. 16: Primer zur Generierung der Site-directed Mutanten von *p9* in pUC19..... 24

Tab. 17: Primer zur Generierung der Site-directed Mutanten von *p9* in pV163M..... 25

Tab. 18: Primer zur Überprüfung der Aqua-cloning Mutanten. .... 26

Tab. 19: Auflistung der verwendeten Kits..... 26

Tab. 20: Reaktionsansatz des analytischen Restriktionsverdau..... 31

Tab. 21: Reaktionsansatz der präparativen Restriktionsanalyse..... 31

Tab. 22: Reaktionsansatz der Dephosphorylierung. .... 32

Tab. 23: Reaktionsansatz der Ligation. .... 32

Tab. 24: Auflistung der Antibiotikaklassen gegen die pCF13069 eine Resistenz besitzt mit den dazugehörigen Antibiotika. .... 49

Tab. 25: Ergebnis der Site-directed Mutagenese von *p9* in pUC19..... 80

Tab. 26: Ergebnisse der Site-directed Mutagenese von *p9* in pV163M.. .... 83

Tab. 27: Vergleich der Site-directed Mutagenese in pUC19 und pV163M. .... 94

## 12. Lizenzvereinbarungen

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

<b>Abbildung</b>	<b>Lizenz</b>
Abbildung 2: Molekulare Mechanismen von Antibiotika Resistenzen	CC BY 4.0
Abbildung 4: Inkompatibilität zweier Plasmide mit demselben Replikon	CC BY 4.0
Abbildung 5: Chemischer Mechanismus für die MCR-1 katalysierende Reaktion in <i>E. coli</i>	CC-BY-SA 4.0

### 13. Poster und Tagungsbeiträge

#### Posterbeiträge:

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

Wille, M, Falgenhauer L. Site-directed mutagenesis of epidemic antibiotic-resistance plasmids to understand their success strategies, 14<sup>th</sup> GGL Conference on Life Sciences, Gießen, Deutschland, 2021

Wille, M, Falgenhauer L. Site-directed mutagenesis of epidemic antibiotic-resistance plasmids to understand their success strategies, 15<sup>th</sup> GGL Conference on Life Sciences, Gießen, Deutschland, 2022

Wille, M, Falgenhauer L. Site-directed mutagenesis of epidemic antibiotic-resistance plasmids to understand their success strategies, 16<sup>th</sup> GGL Conference on Life Sciences, Gießen, Deutschland, 2023

#### Publikationen:

Frantz, R., Gwozdzinski, K., Gisch, N., Doijad, S. P., Hudel, M., Wille, M., Abu Mraheil, M., Schwudke, D., Imirzalioglu, C., Falgenahuer, L., Ehrmann, M. & Chakraborty, T. (2023). A single residue within the MCR-1 protein confers anticipatory resilience. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e03592-22.

**14. Erklärung zur Dissertation**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.“

Ort, Datum

Unterschrift

### 15. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Linda Falgenhauer für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit. Insbesondere die regelmäßigen Gespräche waren eine große Hilfe für mich.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Eugen Domann bedanken, der die Betreuung meiner Arbeit, nach Auslaufen der Verträge, übernommen hat.

Ein weiterer Dank gilt Frau Christina Gerstmann und Dr. Jane Falgenhauer, für die Durchführung der Illumina Sequenzierung und die anschließende Datenverarbeitung.

Für die Durchführung und Bereitstellung der Ergebnisse des MALDI-TOF-MS bedanke ich mich bei Frau Martina Hudel und Prof. Dr. Günter Lochnit (Biochemisches Institut, Justus-Liebig-Universität Gießen) sowie seiner Arbeitsgruppe.

Bei den restlichen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie möchte ich mich für die Bereitstellung der Plasmide und einiger Bakterienstämme sowie die nette kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Als letztes möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinem Freund Arthur Händler und meinen Eltern bedanken, die mich während dieser Zeit, insbesondere bei der Betreuung unseres Sohnes Alexander, immer unterstützt haben.

**16. tabellarischer Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt.