



Hochschule für Angewandte  
Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*



Forschungszentrum Borstel  
Leibniz Lungenzentrum

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Fakultät Life Sciences

Bachelorarbeit  
im Studiengang Biotechnologie

**Untersuchungen zur Expression der *ax21* Orthologe *smlt0387* und  
*smlt0184* in *Stenotrophomonas maltophilia* K279a**

vorgelegt von

**Sabine Petersen**

Matrikel-Nr.: XXXXXXXXXX

Hamburg, 4. Februar 2019

Erstgutachter: Prof. Dr. Stephan Noll HAW Hamburg

Zweitgutachter: Dr. Uwe Mamat Forschungszentrum Borstel

# Inhalt

1. Zusammenfassung.....	6
2. Einleitung.....	7
2.1. Einführung in das Thema.....	7
2.2. Grundlagen der Reporter-Stamm-Erzeugung .....	10
3. Material .....	16
3.1. Chemikalien und Reagenzien .....	16
3.2. Plasmide .....	17
3.3. Primer .....	17
3.4. Geräte.....	17
4. Methoden.....	18
4.1. Kultivierung und Konservierung von Bakterien.....	18
4.2. Triparentales Mating .....	19
4.2.1. Erstes triparentales Mating .....	19
4.2.2. Zweites triparentales Mating .....	20
4.2.3. Plasmidentfernung .....	21
4.3. PCR.....	22
4.4. Agarose-Gelelektrophorese .....	23
4.5. $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsassay .....	23
5. Ergebnisse.....	25
5.1. Erzeugung der Reporterstämmen .....	25
5.2. Wachstumskurven und $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätsassays .....	28
6. Diskussion.....	32
6.1. Erzeugung der Reporterstämmen .....	32
6.2. Wachstumskurven und $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätsassays .....	34
7. Literaturverzeichnis.....	40

## Abkürzungen

A. bidest	bidestilliertes Wasser
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Ax21	<i>engl. activator of XA21-mediated immunity</i>
cDNA	<i>engl. complementary deoxyribonucleic acid</i> ; komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	<i>engl. deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
I-SceI-ES	I-SceI-Erkennungssequenz
LB	<i>engl. lysogeny broth</i>
ME	Marker
ME	Mosaik-Enden
mRNA	<i>engl. messenger ribonucleic acid</i> ; Messenger-Ribonukleinsäure
OD	optische Dichte
OE-PCR	<i>engl. overlap extension polymerase chain reaction</i> ; Überhang-Extensions-PCR
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
<i>oriT</i>	<i>engl. origin of transfer</i> ; Transferursprung
PBS	<i>engl. phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>engl. polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
RNA	<i>engl. ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RT-qPCR	<i>engl. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> ; quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
UpM	Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>engl. sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SOB	<i>engl. super optimal broth</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich der primären Aminosäuresequenzen der Proteine PXO_3968, Smlt0387 und Smlt0184 mit Kennzeichnung der identischen Sequenzen .....	8
Abbildung 2: Graphische Darstellung der von Aubert DF et al. (2014) beschriebenen Methode zur genetischen Manipulation von Gram-negativen Bakterien .....	10
Abbildung 3: Karte des Plasmids pUDK049 .....	11
Abbildung 4: Karte des Plasmids pUDK051 .....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines triparentalen Matings .....	12
Abbildung 6: Genetische Organisation der $\Delta$ smlt0387/pUDK049 Cointegrate .....	13
Abbildung 7: Genetische Organisation der $\Delta$ smlt0184/pUDK051 Cointegrate .....	13
Abbildung 8: Karte des Plasmids pDAI-SceI-SacB .....	14
Abbildung 9: Blau-Weiß-Screening zur Identifizierung der <i>S. maltophilia</i> K279a $\Delta$ smlt0387/pUDK049 Cointegrate auf X-Gal LB Agar mit 60 µg/ml Chloramphenicol und 5 µg/ml Norfloxacin .....	25
Abbildung 10: Ausstriche der Klone 3 bis 10 des Matings 2.1 auf X-Gal LB Agar mit 50 µg/ml Tetracyclin und LB Agar mit 60 µg/ml Chloramphenicol .....	26
Abbildung 11: 0,8 %iges Agarosegel mit Amplifikaten der Kontroll-PCR-Ansätze der Chloramphenicol-sensitiven und blau gefärbten Klone des Matings 2.1 .....	27
Abbildung 12: Ausstriche der auf Saccharose-Agar gewachsenen Einzelkolonien des Klons 7 aus dem Mating 2.1 auf LB Agar und LB Agar mit 50 µg/ml Tetracyclin .....	27
Abbildung 13: Optische Dichte (OD <sub>600</sub> ) der Bakteriensuspension und β-Galactosidase-Aktivität (Miller Units) im Verlaufe der Kultivierung von <i>S. maltophilia</i> K279a $P_{smlt0387}::lacZ$ .....	30
Abbildung 14: Optische Dichte (OD <sub>600</sub> ) der Bakteriensuspension und β-Galactosidase-Aktivität (Miller Units) im Verlaufe der Kultivierung von <i>S. maltophilia</i> K279a $P_{smlt0184}::lacZ$ .....	30
Abbildung 15: Optische Dichte (OD <sub>600</sub> ) der Bakteriensuspension und β-Galactosidase-Aktivität (Miller Units) im Verlaufe der Kultivierung von <i>S. maltophilia</i> K279a $P_{smlt0387}::lacZ \Delta$ smlt0184 .....	31
Abbildung 16: Optische Dichte (OD <sub>600</sub> ) der Bakteriensuspension und β-Galactosidase-Aktivität (Miller Units) im Verlaufe der Kultivierung von <i>S. maltophilia</i> K279a $P_{smlt0184}::lacZ \Delta$ smlt0387 .....	31
Abbildung 17: Genetische Organisation der $P_{smlt0387}::lacZ$ Fusion im Genom von <i>S. maltophilia</i> K279a mit Angabe der Primer-Bindungsstellen .....	32

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie deren Hersteller.....	16
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Plasmide .....	17
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primer und deren Sequenzen.....	17
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Geräte sowie deren Hersteller .....	18
Tabelle 5: Übersicht über die mittels des ersten triparentalen Matings hergestellten Bakterienstämme .....	19
Tabelle 6: Übersicht über die für das erste Mating verwendeten Helfer-, Donor- und Rezipientenstämme mit Angabe des Kultivierungsmediums.....	19
Tabelle 7: Übersicht über die mittels des zweiten triparentalen Matings hergestellten Bakterienstämme .....	20
Tabelle 8: Übersicht über die für das zweite Mating verwendeten Helfer-, Donor- und Rezipientenstämme mit Angabe des Kultivierungsmediums.....	21
Tabelle 9: Temperaturprogramme der PCRs.....	22
Tabelle 10: Angabe der spezifischen Wachstumsrate $\mu$ und der Verdopplungszeit $t_d$ der vier Reporterstämme .....	29

# 1. Zusammenfassung

*Stenotrophomonas maltophilia* ist ein Erreger nosokomialer Infektionen. Das Bakterium ist resistent gegen ein breites Spektrum von Antibiotika und entfaltet seine Virulenz unter anderem über die Bildung von Biofilm sowohl auf biotischen als auch abiotischen Oberflächen und die Ausschüttung von verschiedenen Enzymen. In den vergangenen Jahren wurden die homologen Gene *smlt0387* und *smlt0184* als potenzielle Bestandteile des Quorum Sensing, einem interbakteriellen Kommunikationssystem, beschrieben, mit denen *S. maltophilia* in Abhängigkeit von der Zelldichte die Expression seiner Virulenzfaktoren reguliert.

In dieser Arbeit wurde die Expression dieser beiden Gene mithilfe von gentechnisch hergestellten Reporterstämmen untersucht. Hierfür wurden Fusionsprodukte des Promotors von *smlt0387* bzw. *smlt0184* mit dem für die  $\beta$ -Galactosidase kodierenden Reportergen *lacZ* in das Genom entsprechender Rezipientenstämmen integriert. Durch das Messen der optischen Dichte der Bakteriensuspensionen und der zeitgleichen Durchführung von  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätsassays im Verlaufe der Kultivierung der erzeugten Stämme konnte ein Zusammenhang zwischen der Wachstumsphase der Bakterien und der Expression des *lacZ* Gens hergestellt werden. Die Promotoren *P<sub>smlt0387</sub>* bzw. *P<sub>smlt0184</sub>* wurden so reguliert, dass die Expression von *lacZ* erst ab dem Übergang in das stationäre Wachstum stark anstieg und somit auf Genexpressionen in Abhängigkeit von der Zelldichte hingewiesen hat. Diese Ergebnisse sollen die Basis für die Identifizierung und Charakterisierung von Regulatoren der Expression der Gene *smlt0387* und *smlt0184* darstellen.

## 2. Einleitung

### 2.1. Einführung in das Thema

*Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) ist ein Gram-negatives, aerobes, bewegliches Bakterium, das als Erreger nosokomialer Infektionen gilt (Senol E, 2004). Ursprünglich wurde das Bakterium der Gattung *Pseudomonas*, später der Gattung *Xanthomonas* zugeordnet (Swings J *et al.*, 1983), bevor 1993 die neue Gattung *Stenotrophomonas* eingeführt wurde (Palleroni NJ & Bradbury JF, 1993).

Das Bakterium ist geographisch weit verbreitet. Sogar in der Antarktis konnten Stämme von *S. maltophilia* nachgewiesen werden (Vazquez SC *et al.*, 1995). Als ubiquitäres Bakterium ist es in wässriger Umgebung wie Flüssen, Brunnen, Abwässern, aber auch im Erdboden zu finden (Denton M & Kerr KG, 1998). Diese Habitats, besonders die Rhizosphäre im Erdboden, sind sehr nährstoffreich, sodass eine Vielzahl konkurrierender Mikroorganismen über die Ausschüttung antibiotischer Substanzen versucht, diese Lebensräume zu besiedeln. Über horizontalen Gentransfer mit Gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus* konnte *S. maltophilia* hier Resistenzen gegen ein breites Spektrum von Antibiotika erlangen (Berg G *et al.*, 2005; Alonso A *et al.*, 2000).

Durch diese Multiresistenz gelingt es oftmals nicht, *S. maltophilia* in Krankenhäusern mithilfe der gängigen Antibiotika vollständig abzutöten, wodurch es zu Krankenhausinfektionen kommt. Das opportunistische Bakterium wurde in und auf diversen Geräten und Oberflächen wie Dialysegeräten, Blutdruckmessgeräten und den Händen des Krankenhauspersonals gefunden (Denton M & Kerr KG, 1998). Über die Behandlung der Patienten gelangt es in den Körper und kann zu einem breiten Spektrum an Syndromen wie z.B. Bakteriämie, Endokarditis und Atemwegsinfektionen führen. Die höchste Letalität wurde bei stark geschwächten und immunsupprimierten Patienten nachgewiesen (Berg G *et al.*, 2005).

Um Möglichkeiten zu finden, *S. maltophilia* zuverlässig abzutöten, werden seit einiger Zeit die Virulenzfaktoren des Mikroorganismus genauer erforscht. Hierzu gehören unter anderem die Fähigkeit des Bakteriums zur Bildung von Biofilmen, extrazelluläre Enzyme, Flagellen und das sogenannte Quorum Sensing (Adegoke AA *et al.*, 2017).

Bei dem Quorum Sensing handelt es sich um ein interbakterielles Kommunikationssystem. Die Bakterien schütten spezifische Signalmoleküle aus und können über die Konzentration dieser Moleküle auf die Dichte ihrer Population schließen. Ab dem Erreichen einer bestimmten Schwellenkonzentration

werden z.B. die Expression von Virulenzgenen hochreguliert, Antibiotikaresistenzen ausgebildet und die Biofilmbildung eingeleitet (Tay SB & Yew WS, 2013; Waters CM & Bassler BL, 2005).

PXO\_03968, auch bekannt als Ax21 für *Activator of XA21-mediated immunity*, ist ein von *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* (*Xoo*) synthetisiertes Protein (Lee SW *et al.*, 2009). Es wurde festgestellt, dass das 194 Aminosäuren lange Protein als Aktivator des *pattern recognition receptors* (PRR) XA21 der Wildreis-Spezies *Oryza longistaminata* zu einer natürlichen Immunität gegen den von *Xoo* ausgelösten Bakterienbrand verhilft (Park CJ *et al.*, 2010). In *S. maltophilia* konnten die Gene *smlt0184* und *smlt0387* als Orthologe des *ax21* Gens nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 1 ersichtlich ist, besteht eine hohe Homologie zwischen den primären Aminosäuresequenzen von PXO\_03968 (Ax21) aus *Xoo* und den beiden *S. maltophilia* Proteinen Smlt0387 und Smlt0184. Smlt0387 weist eine 60 %ige, Smlt0184 eine 56 %ige Sequenzidentität mit PXO\_03968 auf. Zwischen den beiden Ax21 Orthologen ergibt sich eine Identität von 63 % (Devos S *et al.*, 2015). Daraus ließe sich schließen, dass *smlt0387* und *smlt0184* in *S. maltophilia* vergleichbare Funktionen wie *ax21* in *Xoo* erfüllen könnten.

PXO_03968	1	-----MLALGLLAALPFAASAAENLSYNFVEGDYVRTPTDGRDADGWVKAS YAVAPNFH	55
Smlt0387	1	-MKNSLIALALAAALPFTASAAENLSYNYAEADYAKTDVDGIKADGWVKGS YGFLPNFH	59
Smlt0184	1	MNKNSLLALGLLAALPFAASATDGLSYNYVEGGYVNTDAKGGADGWVKGS VAVHPNFH	60
PXO_03968	56	VFGESYKQNAADDNKNLFKNTNSDFQQWGVGVGFNHEIATS TDFVARVAYRRLLD DSPNIN	115
Smlt0387	60	AFGEYSRQEVDPH-----TNIKVDQWKVGAGYNVEIAPS TDFVARVAYQKFD RK-HGLD	111
Smlt0184	61	IFGDYSAQETDK-----FKNDVDQWRIGAGYNYGIAPNTDLVARVAYQKFD MK-HGLD	112
PXO_03968	116	FDGYSVEAGLRNAGFEHFVYALAGYEDYSKKRCIDAGNDFYGRLLGAQVKLNQNWG INGD	175
Smlt0387	112	FNGYSAEAGIRTAFA GAHAEVYGMVGYEDYAKKHGV DIDDQWYGRLLGGQVKLNQNWGLN GE	171
Smlt0184	113	FNGYSTEVGVRTAFNPYVEGYVMAGYEDYTKKHGINPDGEFYGRV GATAKFNQNWGLS GE	172
PXO_03968	176	IRMDGDNKEWSVGPRFSW	194
Smlt0387	172	LKMNRHGDKEYTVGPRFSW	190
Smlt0184	173	VKLAKAGDREWFVGPRFTW	191

Abbildung 1: Vergleich der primären Aminosäuresequenzen der Proteine PXO\_3968, Smlt0387 und Smlt0184 mit Kennzeichnung der identischen Sequenzen (gelb unterlegt) (Devos S *et al.*, 2015)

Han SW *et al.* (2011) und McCarthy Y *et al.* (2011) beschrieben Ax21 und seine Orthologe als ein Bestandteil des Quorum Sensing. Dabei zeigte eine Mutante des Stammes *S. maltophilia* K279a, bei der das Gen *smlt0387* deletiert wurde, unter anderem eine verminderte Biofilmbildung auf Glasoberflächen und eine stärkere oder abgeschwächte Expression unterschiedlicher Gene (McCarthy Y *et al.*, 2011). Beide Publikationen wurden allerdings wieder zurückgezogen, da Han SW *et al.* (2013) bei späteren Arbeiten feststellten, dass der verwendete Stamm *Xoo* PXO99Δ*ax21* (deletiertes *ax21* Gen) in der Stammsammlung mit einem anderen Bakterienstamm verunreinigt war und McCarthy Y *et al.* (2017) einen Abbildungsfehler in ihrer Publikation und eine damit verbundene Missinterpretation bemerkten. Einige der Ergebnisse konnten allerdings von Qian G *et al.* (2013) in *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* (*Xoc*) reproduziert werden.



Sollten die Ax21 Orthologe tatsächlich als Signalmoleküle bei der Zell-Zell-Kommunikation fungieren, würde dies eventuell eine Möglichkeit bieten, die Virulenz von *S. maltophilia* durch die Unterdrückung der Biofilmbildung und die abgeschwächte Expression von Virulenzgenen herabzusetzen. Dies könnte zum Beispiel durch eine Unterdrückung der Expression der Gene *smlt0387* und *smlt0184* gelingen, sodass die Aufklärung der Regulation der Expression der *ax21* Orthologe von hohem Interesse ist.

Mittels quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (*engl. quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*; RT-qPCR) wurde die Expressionsrate der Gene *smlt0387* und *smlt0184* in *S. maltophilia* K279a in Relation zu der des Housekeepinggens *rpoA* ermittelt. Bei der RT-qPCR wird im ersten Schritt die Umschreibung von Ribonukleinsäure (*engl. ribonucleic acid*; RNA) in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (*engl. complementary deoxyribonucleic acid*; cDNA) vom Enzym Reverse Transkriptase katalysiert. Anschließend folgen die Vervielfältigung der cDNA mittels Polymerase und die Quantifizierung der Amplifikate (Mackey IM, 2007). Dabei kann die quantitative Bestimmung der cDNA-Konzentration relativ zu einem internen Standard z.B. einem Housekeeping-Gen erfolgen. Bei diesen handelt es sich um Gene, die für Proteine oder RNA kodieren, die für grundlegende metabolische Zellvorgänge nötig sind und somit zumindest theoretisch in allen Zellen ähnlich stark exprimiert werden sollten (Lorkowski S & Cullen PM, 2006).

Mithilfe der RT-qPCR zeigte sich, dass die normierte Konzentration der Messenger-RNA (*engl. messenger ribonucleic acid*; mRNA) der beiden *ax21* Orthologe über den Verlauf der exponentiellen Wachstumsphase nur geringfügig zunahm und erst in der stationären Phase auf das Doppelte bis Achtfache anstieg. Des Weiteren war zu erkennen, dass die gemessene mRNA-Konzentration des Gens *smlt0387* weitaus höher lag als die des Gens *smlt0184*. Während die Expression des Gens *smlt0387* das 110- bis 1150-fache der Expression des Housekeeping-Gens *rpoA* betrug, ergaben sich für *smlt0184* Faktoren zwischen 2 und 40 (Mamat U *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse).

Ziel der vorliegenden Bachelorarbeit war es, die Expression der *ax21* Orthologe *smlt0184* und *smlt0387* in *S. maltophilia* K279a zu untersuchen. Da kein Maß zur Bestimmung der Expression der beiden eigentlichen Gene verfügbar war, sollten sogenannte Reporterstämme hergestellt werden, bei denen sich das Reportergen *lacZ*, welches für die Synthese der  $\beta$ -Galactosidase in *Escherichia coli* (*E. coli*) kodiert, unter der Kontrolle der Promotoren der Gene *smlt0184* und *smlt0387* befindet.

## 2.2. Grundlagen der Reporter-Stamm-Erzeugung

Für die Herstellung der Reporter-Stämme muss das Reportergen *lacZ* gezielt in das Genom integriert werden und das Gen *smlt0387* bzw. *smlt0184* ersetzen. Aubert DF *et al.* beschrieben 2014 eine Methode für eine vergleichbare genetische Manipulation in *Burkholderia cenocepacia* (Abb. 2). Demnach soll in einem ersten sogenannten Mating ein Plasmid, auf dem das einzubringende Gen (*insert*) lokalisiert ist, mittels Konjugation von einem Donor in den Rezipienten übertragen werden. Dieses Plasmid muss bestimmte zum Rezipientengenom homologe Sequenzen aufweisen, sodass es nach dem Plasmidtransfer zu einem Enzym-vermittelten Doppelstrangaustausch, der homologen Rekombination, zwischen den homologen Abschnitten des Plasmids und der genomischen Desoxyribonukleinsäure (*engl. deoxyribonucleic acid*; DNA) kommen kann (Casali N, Preston A, 2003). In den erzeugten Cointegraten soll das gesamte Plasmid integriert sein.

In einem anschließenden zweiten Mating soll das Plasmid pDAI-Scel-SacB in diese Cointegrate transferiert werden, sodass ein Genprodukt dieses Plasmids, die Endonuklease I-Scel, im Rezipienten eine Deletion induziert. Es sollen hierdurch alle zuvor durch homologe Rekombination integrierten Plasmid-Sequenzen mit Ausnahme des geplanten Gens deletiert werden, sodass letztendlich im erzeugten Stamm (gentechnisch veränderter Organismus; GVO) lediglich dieses Gen an der geplanten Stelle lokalisiert ist. Diese Methode der genetischen Manipulation soll auf eine Vielzahl von Gram-negativen Bakterien anwendbar sein, sodass sie auch für die Erzeugung der in dieser Arbeit benötigten Stämme von *S. maltophilia* K279a geeignet sein sollte, welche im Folgenden beschrieben wird.

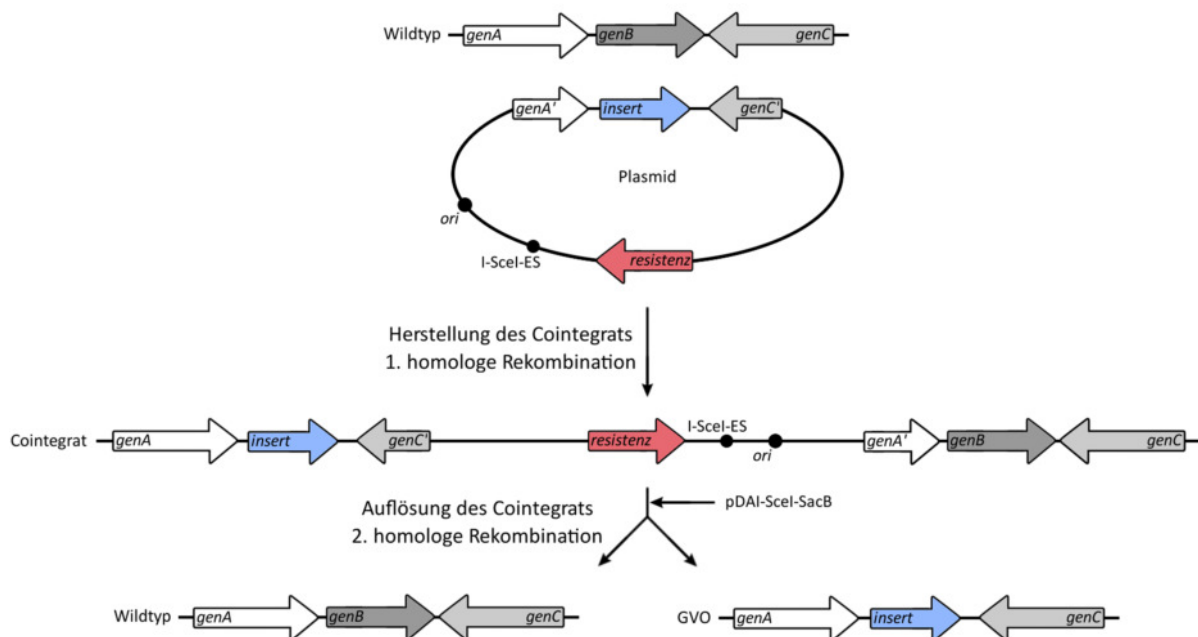


Abbildung 2: Graphische Darstellung der von Aubert DF *et al.* (2014) beschriebenen Methode zur genetischen Manipulation von Gram-negativen Bakterien (I-Scel-ES → I-Scel-Erkennungssequenz)

Im ersten Mating muss das Plasmid pUDK049 bzw. pUDK051 (Abb. 3 und 4) über Konjugation in jeweils eine Einfach- und Doppelmutante transferiert werden. Die Verwendung der Doppelmutante *S. maltophilia* K279a  $\Delta smlt0387 \Delta smlt0184$  ermöglicht die Erzeugung von Stämmen, bei denen eins der *ax21* Orthologe deletiert und das jeweils andere durch das Reportergen *lacZ* ersetzt ist. Sie können im Vergleich mit den aus den Einfachmutanten erzeugbaren Stämmen, bei denen an der Stelle des deletierten Gens das Reportergen eingefügt wird, Aufschluss darüber geben, ob sich *smlt0387* und *smlt0184* gegenseitig beeinflussen.

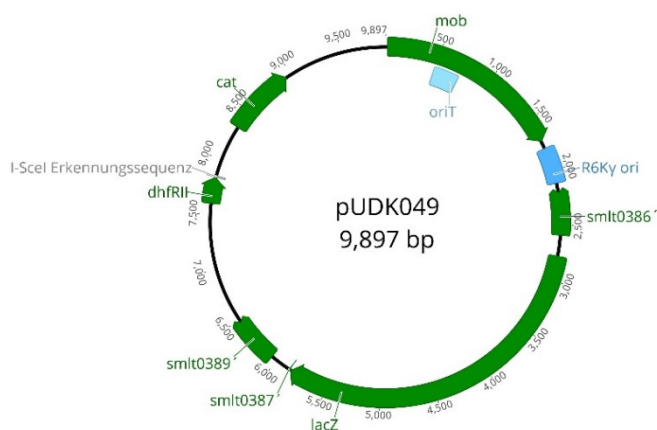


Abbildung 3: Karte des Plasmids pUDK049

Mobilisierungsgene (*mob*),  
 Transferursprung (*oriT*),  
 Replikationsursprung (R6Ky *ori*),  
 $\beta$ -Galactosidase-Gen (*lacZ*),  
 Dihydrofolatreduktase-Gen (*dhfR11*)  
 (kodiert für Trimethoprim-Resistenz),  
 Chloramphenicol-Acetyltransferase (*cat*),  
 Teilsequenzen der Gene von *S. maltophilia*  
 (*smlt0386'*, *smlt0387'*, *smlt0389'*)

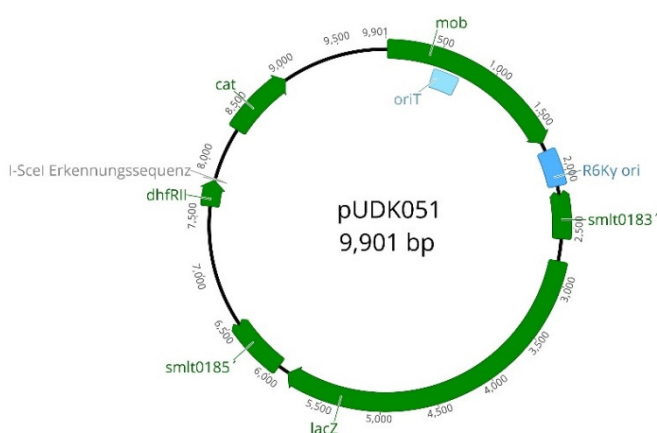


Abbildung 4: Karte des Plasmids pUDK051

Mobilisierungsgene (*mob*),  
 Transferursprung (*oriT*),  
 Replikationsursprung (R6Ky *ori*),  
 $\beta$ -Galactosidase-Gen (*lacZ*),  
 Dihydrofolatreduktase-Gen (*dhfR11*)  
 (kodiert für Trimethoprim-Resistenz),  
 Chloramphenicol-Acetyltransferase (*cat*),  
 Teilsequenzen der Gene von *S. maltophilia*  
 (*smlt0183'*, *smlt0185'*)

Für den horizontalen Gentransfer muss der Donor neben bestimmten Mobilisierungsgenen (*mob*) und einem Transferursprung (*engl. origin of transfer; oriT*) auf dem zu übertragenden Plasmid sogenannte Transferegene (*tra*) besitzen. Während die *mob* Gene zum Beispiel für eine Relaxase, die das Plasmid am Transferursprung schneidet, kodieren, sind die *tra* Gene unter anderem für die Ausbildung der Sexpili verantwortlich (Smith MCM & Sockett E, 1999).

Wie den Plasmidkarten von pUDK049 und pUDK051 zu entnehmen ist, weisen die Plasmide zwar *mob* Gene und einen *oriT* auf, allerdings keine *tra* Gene. Es handelt sich bei ihnen lediglich um mobilisierbare Plasmide, sodass für die Konjugation ein *tra* kodierendes konjugatives Helferplasmid benötigt wird. Das Helferplasmid pRK2013 muss zunächst selbst über Konjugation vom Helferstamm

in den Donor übertragen werden, der dadurch befähigt wird, pUDK049 bzw. pUDK051 in den Rezipienten zu transferieren. Als Donor und Helfer eignen sich z. B. Stämme von *E. coli*, die die jeweiligen Plasmide besitzen. Da an diesem Gentransfer drei Bakterienstämme beteiligt sind, spricht man von einem triparentalen Mating (Abb. 5).

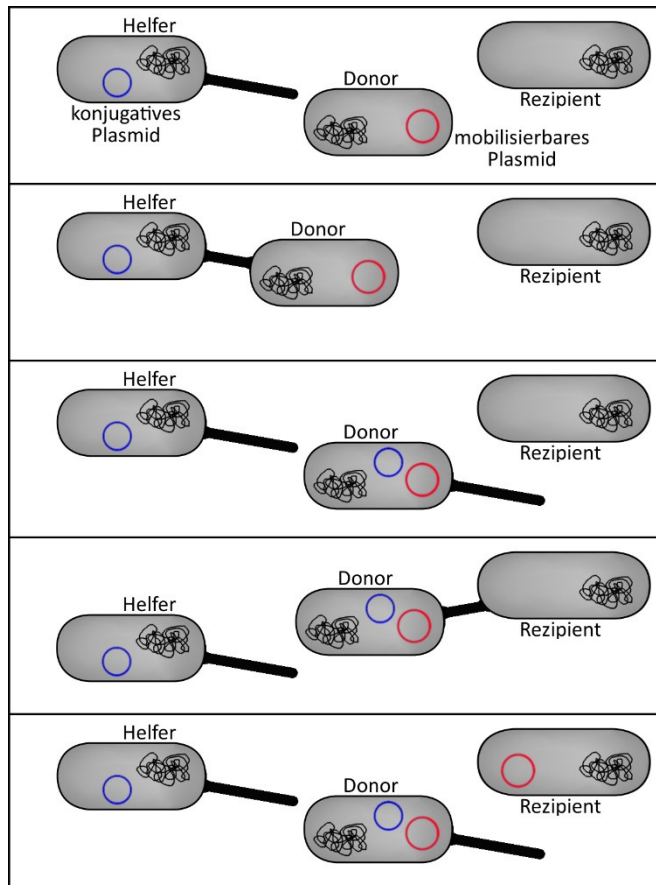


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines triparentalen Matings

Im ersten Schritt wird ein konjugatives Plasmid (blau) vom Helfer auf den Donor transferiert, mithilfe dessen der Donor im zweiten Schritt das mobilisierbare Plasmid (rot) in den Rezipienten transferieren kann.

Nach dem Gentransfer in den Rezipienten kann die gesamte Plasmidsequenz in das Genom integriert werden (Abb. 6 und 7). Der Integrationsort wird dabei über die Sequenzen auf den Plasmiden bestimmt, die homolog zu den flankierenden DNA-Sequenzen des Integrationsorts sind. Das Plasmid pUDK049 wird an die Stelle des deletierten Gens *smlt0387* integriert, pUDK051 an die Stelle des deletierten Gens *smlt0184*.

Die Plasmide pUDK049 und pUDK051 sind sogenannte Suizid-Plasmide. Für die Replikation eines Plasmids mit dem Replikationsursprung *ori<sub>R6KY</sub>* wird das  $\pi$ -Protein benötigt, welches vom *pir*-Gen kodiert wird (Casali N & Preston A, 2003). Dieses Gen befindet sich weder auf den Plasmiden noch im Genom von *S. maltophilia*. Somit sind die Plasmide in den verwendeten Stämmen nicht replikationsfähig und werden im Zuge der Zellteilung lediglich an eine der Tochterzellen weitergegeben. Zellen, bei denen das Gen in das Rezipientengenom integriert wurde, können das *lacZ*, die Chloramphenicol- und Trimethoprimresistenz hingegen an alle Tochterzellen weitergeben, sodass mithilfe dieser Marker die Cointegrate identifiziert werden können.



Abbildung 6: Genetische Organisation der  $\Delta smlt0387/pUDK049$  Cointegrate

Teilsequenzen der Gene von *S. maltophilia* (*smlt0386'*, *smlt0387'*, *smlt0389'*)  
 Dihydrofolatreduktase-Gen (*dhfR11*) (kodiert für Trimethoprim-Resistenz)  
 Chloramphenicol-Acetyltransferase (*cat*) Mobilisierungsgene (*mob*)  
 Transferursprung (*oriT*) Replikationsursprung (R6Ky *ori*)  
 $\beta$ -Galactosidase-Gen (*lacZ*) Gene von *S. maltophilia* (*smlt0386*, *smlt0389*)



Abbildung 7: Genetische Organisation der  $\Delta smlt0184/pUDK051$  Cointegrate

Teilsequenzen der Gene von *S. maltophilia* (*smlt0183'*, *smlt0184'*, *smlt0185'*)  
 Dihydrofolatreduktase-Gen (*dhfR11*) (kodiert für Trimethoprim-Resistenz)  
 Chloramphenicol-Acetyltransferase (*cat*) Mobilisierungsgene (*mob*)  
 Transferursprung (*oriT*) Replikationsursprung (R6Ky *ori*)  
 $\beta$ -Galactosidase-Gen (*lacZ*) Gene von *S. maltophilia* (*smlt0183*, *smlt0185*)

Das integrierte *lacZ* stammt aus *E. coli* und kodiert für eine  $\beta$ -Galactosidase. Dieses Enzym setzt Galactoside wie Lactose, 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) und o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG) um. X-Gal wird von der  $\beta$ -Galactosidase in Galactose und den blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-dichloro-indigo gespalten (Clark DP *et al.*, 2018). Hierdurch können die Cointegrate in Anwesenheit von X-Gal als blau gefärbte Kolonien identifiziert werden.

Das Gen *cat* kodiert für eine Chloramphenicol-Acetyltransferase, welche zwei Acetylgruppen vom Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) auf Chloramphenicol transferiert. Im Gegensatz zum Chloramphenicol kann das entstandene Derivat nicht an die bakteriellen Ribosomen binden, sodass die Translation nicht gehemmt wird (Clark DP *et al.*, 2018). Hierdurch sind die Cointegrate resistent gegenüber Chloramphenicol.

Klone, bei denen durch homologe Rekombination das gesamte Plasmid eingefügt wurde, können folglich auf *lysogeny broth* (LB) Agar mit Chloramphenicol und X-Gal identifiziert werden. Zur Gegenselektion der *E. coli* sollte dem LB Agar zudem noch das Antibiotikum Norfloxacin beigefügt werden (Papich MG, 2010), sodass folgende Cointegrate selektiert werden:

- S. maltophilia* K279a  $\Delta smlt0387/pUDK049$  Cointegrat
- S. maltophilia* K279a  $\Delta smlt0387 \Delta smlt0184/pUDK049$  Cointegrat
- S. maltophilia* K279a  $\Delta smlt0184/pUDK051$  Cointegrat
- S. maltophilia* K279a  $\Delta smlt0387 \Delta smlt0184/pUDK051$  Cointegrat

Mithilfe des zweiten triparentalen Matings soll das Plasmid pDAI-Scel-SacB (Abb. 8) in die hergestellten Cointegratstämme eingebracht werden. Auch dieses Plasmid besitzt wie pUDK049 und pUDK051 lediglich Mobilisierungsgene. Aus diesem Grund wird neben dem Donor und dem Rezipienten erneut ein Helfer mit dem konjugativen Plasmid pRK2013 benötigt.

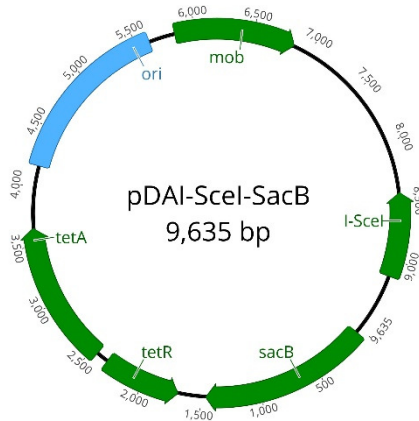


Abbildung 8: Karte des Plasmids pDAI-Scel-SacB

Mobilisierungsgene mit Transferursprung (*mob*),  
 I-Scel-Endonuklease-Gen (*I-Scel*),  
 Levansucrase-Gen (*sacB*),  
 Tetracyclin-Magnesium/H<sup>+</sup>-Antiporter-Gen (*tetA*),  
 Gen für den Repressor des *tetA* (*tetR*),  
 Replikationsursprung (*ori*)

Das Plasmid pDAI-Scel-SacB verfügt über die Gene *tetR* und *tetA*, welche ihrer Wirtszelle zu einer regulierten Tetracyclinresistenz verhelfen. Bei dem Protein TetA handelt es sich um einen Tetracyclin-Magnesium/H<sup>+</sup>-Antiporter in der Cytoplasmamembran. Durch ihn wird das Tetracyclin aus der Zelle befördert, sodass die Translation nicht durch das Binden des Antibiotikums an die Ribosomen gehemmt wird. TetR stellt einen Repressor dar, der die Transkription des *tetA* Gens erst bei Vorhandensein von Tetracyclin vermehrt ablaufen lässt. Durch die Bindung des Antibiotikums an das TetR-Homodimer löst sich der Komplex von der DNA, sodass *tetA* transkribiert werden kann (Nelson M *et al.*, 2012). Mithilfe der Tetracyclinresistenz können diejenigen Zellen selektiert werden, in die das pDAI-Scel-SacB Plasmid transferiert wurde.

Das Plasmid befähigt die Stämme durch das Gen *I-Scel* dazu, die gleichnamige Endonuklease zu synthetisieren. Dieses Enzym erkennt eine 18 bp lange Sequenz und generiert einen Doppelstrangbruch in der DNA (Canthomen T *et al.*, 2016). Die I-Scel-Erkennungssequenz liegt auf den Plasmiden pUDK049 und pUDK051 (Abb. 3 und 4) und wird daher bei der homologen Rekombination ebenfalls in das Genom integriert (Abb. 6 und 7). Hierbei wird die genomische DNA durchtrennt, wodurch es zur Induktion einer weiteren homologen Rekombination kommt.

Aus den Cointegraten können durch die homologe Rekombination zwei unterschiedliche Stämme entstehen. Sofern es zu einem Crossing-Over der integrierten Teilsequenz *smlt0389'* bzw. *smlt0185'* mit dem wirtseigenen Gen *smlt0389* bzw. *smlt0185* kommt, entsteht die ursprünglich verwendete Einfach- bzw. Doppelmutante. Da somit auch die Gene für die  $\beta$ -Galactosidase und die

Chloramphenicol-Acetyltransferase aus dem Genom entfernt werden, sind diese Klone Chloramphenicol-sensitiv und zeigen in Anwesenheit von X-Gal keine Blaufärbung.

Die für die weiteren Arbeiten benötigten Stämme entstehen, sofern ein Crossing-Over zwischen der integrierten Teilsequenz *smlt0386'* bzw. *smlt0183'* und dem wirtseigenen Gen *smlt0386* bzw. *smlt0183* stattfindet, sodass bis auf das *lacZ* keine weiteren Gene des integrierten Plasmids pUDK049 oder pUDK051 im Genom verbleiben. Diese Klone sind dadurch ebenfalls Chloramphenicol-sensitiv, erscheinen jedoch auf X-Gal LB Agar mit einer blauen Färbung.

Zur Herstellung markerloser Stämme muss im letzten Schritt auf Tochterzellen selektiert werden, die während der Zellteilung kein Plasmid erhalten haben. Diese Selektion ist durch das *sacB* Gen auf dem Plasmid möglich, welches für die Levansucrase kodiert. Dieses Enzym hydrolysiert im ersten Schritt Saccharose zu Glucose und Fructose und polymerisiert im zweiten Schritt die Fructose zu Levan, welches letal für Gram-negative Bakterien ist. Aus diesem Grund zählt *sacB* zu den sogenannten Suizidgenen (Howe C, 2007; Aubert DF, 2014). Lediglich diejenigen Klone, bei denen es zu einem Verlust des pDAI-Scel-SacB kommt, synthetisieren kein toxisches Levan und können somit auf 5 %igen Saccharose-Agarplatten Kolonien bilden. Durch das Ausstreichen der auf Saccharose-Agar gewachsenen Einzelkolonien auf LB Agar und LB Agar mit Tetracyclin kann der Verlust des pDAI-Scel-SacB Plasmids bestätigt werden.

Somit lassen sich mit der von Aubert DF *et al.* (2014) beschriebenen Methode folgende Stämme herstellen:

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0387}::lacZ$

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0387}::lacZ \Delta smlt0184$

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0184}::lacZ$

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0184}::lacZ \Delta smlt0387$

### 3. Material

#### 3.1. Chemikalien und Reagenzien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie deren Hersteller sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie deren Hersteller

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Bacto™ Agar	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Agarose, universal (peqGOLD)	VWR, Radnor, USA
β-Mercaptoethanol	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) Mix (10 mM each)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
10x DreamTaq Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder	Fisher Scientific, Hampton, USA
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA-Na <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethidumbromid-Lösung (10 mg/ml in H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerol (Calbiochem)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefe-Extrakt	Fisher Scientific, Hampton, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Alfa Aesar, Haverhill, USA
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Norfloxacin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Saccharose	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
Tetracyclin Hydrochlorid (Calbiochem)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bacto™ Trypton	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland



### 3.2. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Plasmide

Plasmid	Größe [bp]	Eigenschaften	Referenz
pDAI-Scel-SacB	9635	Mobilisierungsgene, I-Scel-Endonuklease-Gen, Tetracyclinresistenz-Gen, Levansucrase-Gen	Hamad MA <i>et al.</i> , 2010
pRK2013	4800	Transferegene	Figurski DH & Helinski DR, 1979
pUDK049	9897	Mobilisierungsgene, $\beta$ -Galactosidase-Gen, $P_{smlt0387}::lacZ$ , Chloramphenicol Acetyltransferase Gen, I-Scel-Erkennungsstelle	Mamat U (unveröffentlicht)
pUDK051	9901	Mobilisierungsgene, $\beta$ -Galactosidase-Gen, $P_{smlt0184}::lacZ$ , Chloramphenicol Acetyltransferase Gen, I-Scel-Erkennungsstelle	Mamat U (unveröffentlicht)

### 3.3. Primer

Die für die Polymerase-Kettenreaktionen (*engl. polymerase chain reaction*; PCR) verwendeten Primer sind in Tabelle 3 aufgeführt. Sie wurden mit dem DNA/Protein-Analyseprogramm Geneious (Biomatters, Auckland, Neuseeland) entworfen und von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Primer und deren Sequenzen

Primer	Sequenz
ECO-lacZ-Seq3	5'- CGCTCCACAAGGTAAACAGTTGA -3'
ECO-lacZ-Seq5	5'- GCACCATCGTCTGCTCATCC -3'
Smlt0184-Ctrl3	5'- AGCAGGGTCTGATAGAGCAGG -3'
Smlt0184-Ctrl4	5'- GAACTGCGACTGGCTGAAACG -3'
Smlt0387ctrl1	5'- CTCCTGTTGCAATCGTCGAAGG -3'
Smlt0387ctrl2	5'- CGTTGCATTCTGCAGGACAG -3'

### 3.4. Geräte

In Tabelle 4 sind die für die jeweilige Versuchsdurchführung kritischen Geräte aufgelistet. Geräte, deren Modell und Hersteller austauschbar sind, wie z.B. Vortexer und Magnetrührer, werden nicht gesondert aufgeführt. Dies gilt ebenso für Verbrauchsmaterialien wie z.B. Drigalskispatel und Impfösen.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Geräte sowie deren Hersteller

Gerät	Gerätename	Hersteller
Autoklav	VX-150	Systec, Linden, Deutschland
Orbitalschüttler	Innova 4230 Refrigerated Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Zentrifugen	Mikro 220R	Hettich, Kirchleingern, Deutschland
	Avanti®J-26 XP	Beckman Coulter, Brea, USA
Thermocycler	T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules, USA
	GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Photometer	UV-1800	Shimadzu, Kyōto, Japan

## 4. Methoden

### 4.1. Kultivierung und Konservierung von Bakterien

Die Anzucht der Bakterienstämme erfolgte in zuvor autoklaviertem LB Flüssigmedium oder auf LB Agarplatten über Nacht. Durch die Zugabe von Antibiotika wurde gegebenenfalls ein Selektionsdruck ausgeübt. Bei der Kultivierung in LB Flüssigmedium wurde mithilfe des Orbitalschüttlers bei 220 oder 250 Umdrehungen pro Minute (UpM) für den nötigen Lufteintrag in das Medium gesorgt. Genauere Angaben sind der Methodenbeschreibung des triparentalen Matings zu entnehmen. Die Rezepturen für die Grundmedien waren wie folgt:

LB Agar	LB Medium
1 % Bacto Trypton (w/v)	1 % Bacto Trypton (w/v)
0,5 % Hefeextrakt (w/v)	0,5 % Hefeextrakt (w/v)
1,5 % Bacto Agar (w/v)	0,17 M NaCl
0,17 M NaCl	in A. bidest
in bidestilliertem Wasser (A. bidest)	

Die Bakterienstämme wurden als Glycerolkulturen bei -80 °C konserviert. Hierfür wurden die in 5 ml LB Medium über Nacht bei 220 UpM und 37 °C auf dem Orbitalschüttler angezüchteten Bakterienkulturen für 10 Minuten bei 4 °C und 5.524 x g abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde das Zellsediment in 1 ml LB Flüssigmedium mit 20 % Glycerol resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

## 4.2. Triparentales Mating

### 4.2.1. Erstes triparentales Mating

Mithilfe des ersten triparentalen Matings wurden die in Tabelle 5 aufgelisteten Cointegrat-Stämme erzeugt.

Tabelle 5: Übersicht über die mittels des ersten triparentalen Matings hergestellten Bakterienstämme

Mating-Nr.	Herstellung von
1.1	<i>S. maltophilia</i> K279a $\Delta$ smlt0387/pUDK049 Cointegrat
1.2	<i>S. maltophilia</i> K279a $\Delta$ smlt0387 $\Delta$ smlt0184/pUDK049 Cointegrat
1.3	<i>S. maltophilia</i> K279a $\Delta$ smlt0184/pUDK051 Cointegrat
1.4	<i>S. maltophilia</i> K279a $\Delta$ smlt0387 $\Delta$ smlt0184/pUDK051 Cointegrat

Die in Tabelle 6 gelisteten Donor-, Helfer- und Rezipientenstämme wurden zunächst in je 5 ml LB Medium mit den nötigen Antibiotika über Nacht bei 37 °C und 220 UpM auf dem Orbitalschüttler angezüchtet und im Volumenverhältnis 3:3:1 (Helfer:Donor:Rezipient) gemischt.

Tabelle 6: Übersicht über die für das erste Mating verwendeten Helfer-, Donor- und Rezipientenstämme mit Angabe des Kultivierungsmediums

Nr.	Helfer	Donor	Rezipient
1.1	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pRK2013 LB Medium + 30 $\mu$ g/ml Kanamycin	<i>E. coli</i> SY327/pUDK049 LB Medium + 30 $\mu$ g/ml Chloramphenicol	<i>S. maltophilia</i> K279a $\Delta$ smlt0387 LB Medium
1.2			<i>S. maltophilia</i> K279a $\Delta$ smlt0387 $\Delta$ smlt0184 LB Medium
1.3		<i>E. coli</i> SY327/pUDK051 LB Medium + 30 $\mu$ g/ml Chloramphenicol	<i>S. maltophilia</i> K279a $\Delta$ smlt0184 LB Medium
1.4			<i>S. maltophilia</i> K279a $\Delta$ smlt0387 $\Delta$ smlt0184 LB Medium

Es wurden 1 ml des Donor-, 1 ml des Helfer- und 330  $\mu$ l des Rezipientenstamms in je ein Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 4 °C und 12.840 x g abzentrifugiert. Nachdem die drei Stämme in 1 ml LB Medium resuspendiert und vereinigt worden waren, wurde erneut bei 4 °C und 12.840 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 100  $\mu$ l *super optimal broth* (SOB) Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf eine SOB Agarplatte pipettiert. Diese wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert.

SOB Agar
1 % Bacto Trypton (w/v)
0,25 % Hefeextrakt (w/v)
1,5 % Bacto Agar (w/v)
5 mM NaCl
1,25 mM KCl
5 mM MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O
5 mM MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
in A. bidest

SOB Medium
1 % Bacto Trypton (w/v)
0,25 % Hefeextrakt (w/v)
5 mM NaCl
1,25 mM KCl
5 mM MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O
5 mM MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O
in A. bidest

Am nächsten Tag wurde die Biomasse von der Agarplatte abgekratzt und in 1 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (*engl. phosphate buffered saline; PBS*) resuspendiert, sodass eine serielle Verdünnungsreihe der Zellsuspension bis  $10^{-4}$  in 1 ml PBS angesetzt werden konnte. Des Weiteren wurden X-Gal LB Agarplatten hergestellt, indem jeweils 50 µl einer 98 mM X-Gal-Lösung (gelöst in Dimethylformamid) auf LB Agarplatten mit den nötigen Antibiotika, in diesem Falle 60 µg/ml Chloramphenicol und 5 µg/ml Norfloxacin, ausgespatelt wurden. Auf diesen wurden anschließend jeweils 100 µl der unverdünnten Zellsuspension bzw. der Verdünnungen mit einem Drigalskispatel ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C für zwei Tage inkubiert.

Blau gefärbte Einzelkolonien wurden mit einer Impföse zur Kontrolle nochmals auf einer LB Agarplatte mit 60 µg/ml Chloramphenicol und einer X-Gal LB Agarplatte ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Die auf diese Weise erzeugten Stämme dienten als Rezipienten für das zweite triparentale Mating.

#### 4.2.2. Zweites triparentales Mating

Mithilfe des zweiten triparentalen Matings wurden die für die späteren Arbeiten benötigten Reporterstämme erzeugt (Tab. 7).

Tabelle 7: Übersicht über die mittels des zweiten triparentalen Matings hergestellten Bakterienstämme

Mating-Nr.	Herstellung von
2.1	<i>S. maltophilia</i> K279a <i>P<sub>smt0387</sub>::lacZ</i>
2.2	<i>S. maltophilia</i> K279a <i>P<sub>smt0387</sub>::lacZ Δsmt0184</i>
2.3	<i>S. maltophilia</i> K279a <i>P<sub>smt0184</sub>::lacZ</i>
2.4	<i>S. maltophilia</i> K279a <i>P<sub>smt0184</sub>::lacZ Δsmt0387</i>

Bei dem zweiten triparentalen Mating wurde anaolg zum ersten Mating vorgegangen. Die in Tabelle 8 aufgelisteten Donor-, Helfer- und Rezipientenstämme wurden jeweils in 5 ml LB Medium mit den nötigen Antibiotika über Nacht bei 37 °C und 220 UpM auf dem Orbitalschüttler angezüchtet. Das Verhältnis Helfer:Donor:Rezipient sollte ebenfalls 3:3:1 betragen.

Tabelle 8: Übersicht über die für das zweite Mating verwendeten Helfer-, Donor- und Rezipientenstämmen mit Angabe des Kultivierungsmediums

Nr.	Helfer	Donor	Rezipient
2.1	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pRK2013 LB Medium + 30 $\mu$ g/ml Kanamycin	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ /pDAI-Scel-SacB LB Medium + 20 $\mu$ g/ml Tetracyclin	<i>S. maltophilia</i> K279a $\Delta$ smlt0387/pUDK049 Cointegrat LB Medium + 60 $\mu$ g/ml Chloramphenicol
2.2			<i>S. maltophilia</i> K279a $\Delta$ smlt0387 $\Delta$ smlt0184/pUDK049 Cointegrat LB Medium + 60 $\mu$ g/ml Chloramphenicol
2.3			<i>S. maltophilia</i> K279a $\Delta$ smlt0184/pUDK051 Cointegrat LB Medium + 60 $\mu$ g/ml Chloramphenicol
2.4			<i>S. maltophilia</i> K279a $\Delta$ smlt0387 $\Delta$ smlt0184/pUDK051 Cointegrat LB Medium + 60 $\mu$ g/ml Chloramphenicol

Es wurden 1 ml des Donor-, 1 ml des Helfer- und 330  $\mu$ l des Rezipientenstamms in je ein Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 4 °C und 12.840 x g abzentrifugiert. Nachdem die drei Stämme in 1 ml LB Medium resuspendiert und vereinigt worden waren, wurde erneut bei 4 °C und 12.840 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 100  $\mu$ l SOB Medium resuspendiert und die Zellsuspension auf eine SOB Agarplatte pipettiert. Diese wurde bei 30 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Biomasse von der Agarplatte abgekratzt und in 1 ml PBS resuspendiert. Die gesamte Zellsuspension wurde in Volumina von 150  $\mu$ l oder 100  $\mu$ l je Platte mit einem Drigalskispatel auf LB Agarplatten mit 50  $\mu$ g/ml Tetracyclin und 5  $\mu$ g/ml Norfloxacin ausplattiert. Die Platten wurden bei 30 °C für zwei Tage inkubiert.

Tetracyclinresistente Einzelkolonien wurden mit einer Impföse jeweils auf einer LB Agarplatte mit 60  $\mu$ g/ml Chloramphenicol und einer X-Gal LB Agarplatte oder einer X-Gal LB Agarplatte mit 50  $\mu$ g/ml Tetracyclin ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert.

#### 4.2.3. Plasmidentfernung

Zur Herstellung der Stämme

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0387}::lacZ$ ,

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0387}::lacZ \Delta$ smlt0184,

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0184}::lacZ$  und

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0184}::lacZ \Delta$ smlt0387,

folgte anschließend eine Selektion auf Klone, welche im Zuge der Zellteilung das Plasmid pDAI-Scel-SacB verloren hatten. Hierfür wurden Verdünnungsausstriche der betreffenden Stämme auf Saccharose-Agarplatten angefertigt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Einzelkolonien wurden zur Kontrolle jeweils auf LB Agar und LB Agar mit 50  $\mu$ g/ml Tetracyclin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Saccharose Agar
1 % Bacto Trypton (w/v)
0,5 % Hefeextrakt (w/v)
1,5 % Bacto Agar (w/v)
14,6 mM Saccharose
in A. bidest

### 4.3. PCR

Zur Validierung der hergestellten Bakterienstämme

- S. maltophilia* K279a  $P_{smt0387}::lacZ$ ,
- S. maltophilia* K279a  $P_{smt0387}::lacZ \Delta smlt0184$ ,
- S. maltophilia* K279a  $P_{smt0184}::lacZ$  und
- S. maltophilia* K279a  $P_{smt0184}::lacZ \Delta smlt0387$

wurden PCR-Ansätze mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Als Template wurde Biomasse der  $\beta$ -Galaktosidase-positiven und Chloramphenicol-sensitiven Klone verwendet. Ein  $\beta$ -Galaktosidase-negativer und Chloramphenicol-sensitiver Wildtyp-Klon des jeweiligen triparentalen Matings wurde als Kontrolle verwendet.

Für die Amplifikation der an die Insertionsstelle grenzenden Sequenzen wurde die *DreamTaq* DNA-Polymerase mit den in Tabelle 3 aufgelisteten Primern verwendet. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze (10  $\mu$ l Gesamtvolumen) ist rechts aufgelistet.

Reagenz	Volumen
A. bidest	7,55 $\mu$ l
10x <i>DreamTaq</i> Puffer (20 mM MgCl <sub>2</sub> )	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M 5'-Primer	0,5 $\mu$ l
10 $\mu$ M 3'-Primer	0,5 $\mu$ l
dNTP Mix (jeweils 10 mM)	0,2 $\mu$ l
<i>DreamTaq</i> DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l

Die PCRs liefen nach den in Tabelle 9 angegebenen Temperaturprogrammen im Thermocycler ab. Sie unterschieden sich lediglich in der Zeit für den Elongationsschritt am Ende jedes Zyklus.

Tabelle 9: Temperaturprogramme der PCRs

Zeitprogramm 1: *S. maltophilia* K279a  $P_{smt0387}::lacZ$ , *S. maltophilia* K279a  $P_{smt0387}::lacZ \Delta smlt0184$   
 Zeitprogramm 2: *S. maltophilia* K279a  $P_{smt0184}::lacZ$ , *S. maltophilia* K279a  $P_{smt0184}::lacZ \Delta smlt0387$

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeitprogramm 1	Zeitprogramm 2
initiale Denaturierung	1	95 °C	2 min	2 min
Amplifikation	40	Denaturierung	20 s	20 s
		Annealing	30 s	30 s
		Elongation	1 min 20 s	2 min
finale Elongation	1	72 °C	10 min	10 min
Kühlung	1	4 °C	$\infty$	$\infty$

#### 4.4. Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse der PCR-Produkte wurden 0,8 %ige Tris-Borat-EDTA-(TBE-)Agarosegele verwendet.

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) (5x)	Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) (1x)
0,45 M Tris(hydroxymethyl)aminomethane	10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane
0,45 M Borsäure	1 mM EDTA-Na <sub>2</sub> (pH 8,0)
10 mM EDTA-Na <sub>2</sub> (pH 8,0)	in A. bidest
in A. bidest	
1x TBE-Puffer: 1:5 (v/v) mit A. bidest verdünnen	GelLoad-Puffer (6x)
	Glycerol
	TE-Puffer
	Bromphenolblau
	in A. bidest

Als Laufpuffer diente ebenfalls der TBE-Puffer. Es wurde jeweils 1 µl der Proben in 4 µl 1x TE-Puffer und 1 µl 6x GelLoad-Puffer aufgenommen und das gesamte Volumen von 6 µl in die Tasche des Gels aufgetragen. Zur Abschätzung der Größe der PCR-Produkte wurde stets ein Größenmarker (*DNA-Ladder 1 kb Plus*) mitgeführt. Für die elektrophoretische Auftrennung der DNA wurde eine Spannung von 110 V angelegt.

Sobald die Lauffront bis ca. 1 cm vor dem unteren Ende des Gels gelaufen war, wurde dieses in einem 6,4 mM Ethidiumbromid-Bad für ca. 20 Minuten angefärbt und für weitere 20 Minuten in einem Wasserbad entfärbt. Durch die Bestrahlung des Agarosegels mit ultraviolettem (UV) Licht wurden die DNA-Banden sichtbar, sodass das Gel fotografiert und mit der AlphaView Software (Bio-Techne [ProteinSimple], Minneapolis, USA) ausgewertet werden konnte.

#### 4.5. β-Galaktosidase-Aktivitätsassay

Um den Verlauf der β-Galaktosidase-Aktivität in den Stämmen

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0387}::lacZ$ ,

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0387}::lacZ \Delta smlt0184$ ,

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0184}::lacZ$  und

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0184}::lacZ \Delta smlt0387$

von der lag-Phase bis zum Eintritt in die stationäre Phase zu ermitteln, wurde neben der Aufnahme einer Wachstumskurve ein β-Galaktosidase-Aktivitätsassay durchgeführt. Hierfür wurden die Stämme dreifach als 20 ml-Kulturen in 100 ml-Erlenmeyerkolben bei 250 UpM auf dem Orbitalschüttler kultiviert und stündlich jeweils eine Probe der Bakteriensuspensionen genommen, deren optische Dichten bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) mit dem Photometer gemessen wurden. Als Leerwert diente LB Medium.

Ab einer OD<sub>600</sub> von mehr als 1,2 (außerhalb des linearen Bereichs) wurde die Bakteriensuspension verdünnt. Anschließend wurde mithilfe des im Folgenden beschriebenen Assays die enzymatische Aktivität in Miller Units bestimmt.

Z-Puffer (pH 7,0)	ONPG-Lösung (pH 7,0)
90 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	90 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O
40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O
10 mM KCl	13,3 mM ONPG
1 mM MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	in A. bidest
50 mM β-Mercaptoethanol	
in A. bidest	

Es wurden je 100 µl der Zellsuspension bzw. der jeweiligen Verdünnung in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß pipettiert, 900 µl Z-Puffer hinzugegeben und gemischt. Anschließend wurden 20 µl einer 10 %igen Natriumdodecylsulfat-(*engl. sodium dodecyl sulfate*; SDS-)Lösung, 20 µl Chloroform und 200 µl ONPG-Lösung hinzupipettiert. Nach Durchmischen mit dem Vortexer wurde der Ansatz für zehn Minuten bei 30 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 500 µl 1 M Natriumcarbonat-Lösung (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) hinzupipettiert und erneut durchgemischt. Nach dem Absetzen des Chloroforms wurde die Absorption bei 420 nm (A<sub>420</sub>) und 550 nm (A<sub>550</sub>) in 1 ml des Ansatzes bestimmt. Als Leerwert wurde der identische Ansatz mit 100 µl LB Medium verwendet. In einigen Fällen, bei denen aufgrund der vorherigen Messwerte bei A<sub>420</sub> ein über 1 liegender Wert erwartet wurde, wurde die Inkubationszeit von 10 Minuten auf 5 Minuten herabgesenkt.

Zum Berechnen der enzymatischen Aktivität wurde die folgende Formel verwendet.

$$\text{Miller Units} = 1000 \cdot \frac{A_{420} - 1,75 \cdot A_{550}}{T \cdot V \cdot \text{OD}_{600}} \quad (1)$$

A<sub>420</sub> Absorption des Reaktionsansatzes bei 420 nm

A<sub>550</sub> Absorption des Reaktionsansatzes bei 550 nm

OD<sub>600</sub> optische Dichte der Zellsuspension bei 600 nm

T Reaktionszeit in Minuten

V Volumen der Zellsuspension bzw. der Verdünnung, das für die Reaktion verwendet wurde



## 5. Ergebnisse

### 5.1. Erzeugung der Reporterstämme

Im ersten Schritt wurde mittels eines ersten triparentalen Matings das Plasmid pUDK049 bzw. pUDK051 jeweils in eine Einfach- und eine Doppelmutante des Stamms *S. maltophilia* K279a eingebracht, wobei die gesamte Plasmidsequenz über homologe Rekombination in das Genom integriert werden sollte. Auf X-Gal LB Agarplatten wurden nach den Klonen gescreent, bei denen die Konjugation erfolgreich ablief. In Abbildung 9 ist das Blau-Weiß-Screening exemplarisch für das Mating 1.1 (Erzeugung des *S. maltophilia* K279a  $\Delta smlt0387$ /pUDK049 Cointegrats) zu sehen.

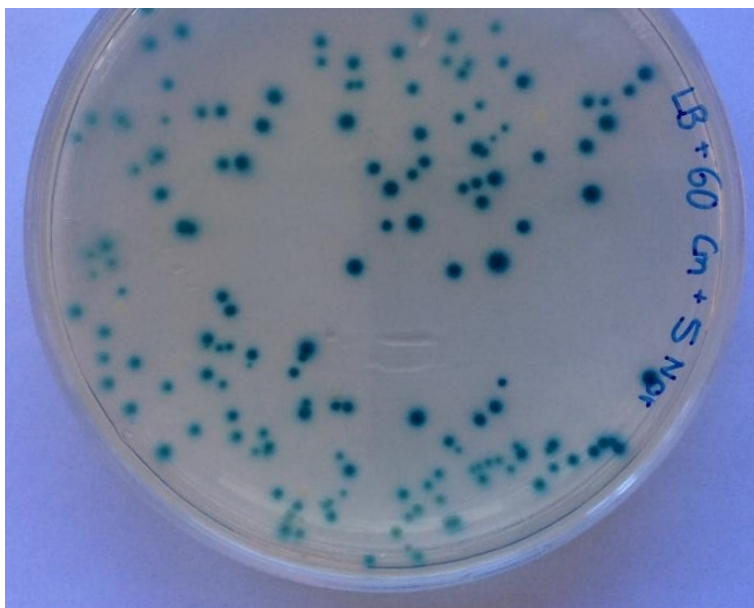


Abbildung 9: Blau-Weiß-Screening zur Identifizierung der *S. maltophilia* K279a  $\Delta smlt0387$ /pUDK049 Cointegrate auf X-Gal LB Agar mit 60 µg/ml Chloramphenicol und 5 µg/ml Norfloxacin

Bei allen vier Matings war die Anzahl der auf den X-Gal Agarplatten gewachsenen Kolonien in der gleichen Größenordnung. Die Ausstriche der 100-fachen Verdünnungen wurden wie folgt ausgezählt:

Mating 1.1	143 Kolonien
Mating 1.2	179 Kolonien
Mating 1.3	151 Kolonien
Mating 1.4	191 Kolonien

Anschließend wurde mittels eines zweiten triparentalen Matings das Plasmid pDAI-Scel-SacB in die Cointegrate eingebracht, sodass das Enzym I-Scel synthetisiert und eine weitere homologe Rekombination induziert werden konnte. In Abbildung 10 sind exemplarisch die Ausstriche der Klone 3 bis 10 des Matings 2.1 (Erzeugung von *S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0387}::lacZ$ ) auf X-Gal LB Agar mit Tetracyclin und LB Agar mit Chloramphenicol abgebildet.

Bei dem Mating 2.1 konnten von 34 ausgestrichenen Einzelkolonien zwölf Klone identifiziert werden, die Chloramphenicol-sensitiv waren und bei denen X-Gal eine Blaufärbung hervorbrachte. Bei dem

Mating 2.3 waren es vier von fünf, bei dem Mating 2.4 vier von zehn ausgestrichenen Einzelkolonien. Da bei dem Mating 2.2 keine Kolonien gewachsen waren, musste das Mating wiederholt werden. Nach erneuter Durchführung konnten auch hier vier Klone von acht ausgestrichenen Einzelkolonien identifiziert werden, die Chloramphenicol-sensitiv waren und die erhoffte Blaufärbung zeigten.

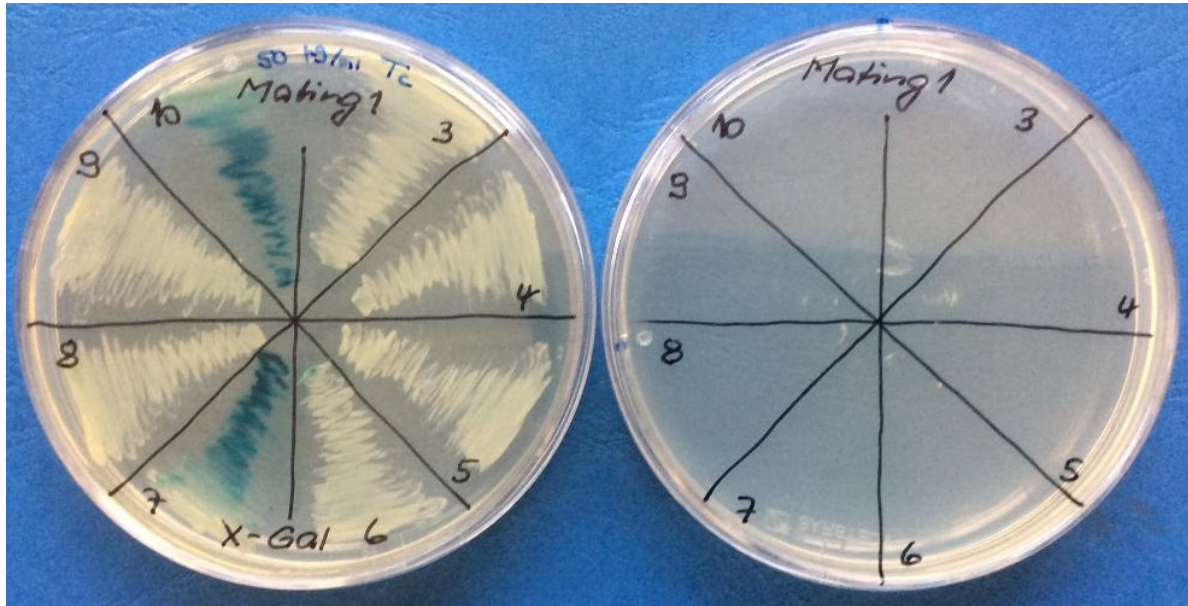


Abbildung 10: Ausstriche der Klone 3 bis 10 des Matings 2.1 (Erzeugung von *S. maltophilia* K279a  $P_{smit0387}::lacZ$ ) auf X-Gal LB Agar mit 50 µg/ml Tetracyclin und LB Agar mit 60 µg/ml Chloramphenicol

Zur Kontrolle der identifizierten Klone wurde eine PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. In Abbildung 11 ist exemplarisch das 0,8 %ige Agarosegel der Klone des Matings 2.1 (Erzeugung von *S. maltophilia* K279a  $P_{smit0387}::lacZ$ ) abgebildet. Ganz links und rechts wurde für die Größenbestimmung der PCR Amplifikate der Marker *DNA-Ladder 1 kb Plus* aufgetragen. Der Klon 5 wurde als Kontrolle mitgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Chloramphenicol-sensitiven Klon, der keine Blaufärbung in Anwesenheit von X-Gal hervorbrachte (Abb. 10).

Alle zwölf Amplifikate der identifizierten Klone wiesen bei der ersten PCR (obere Reihe in Abb. 11) eine ähnliche Größe auf. Es wurden Längen von 1289 kb bis 1368 kb bestimmt. Damit wichen die ermittelten Werte nur geringfügig von der erwarteten Größe von 1324 kb ab. Auch die Amplifikate der zweiten PCR (untere Reihe in Abb. 11) wiesen mit 1145 kb bis 1289 kb ähnliche Basenpaaranzahlen auf. Hier betrug die erwartete Größe 1261 kb, sodass auch hier die Abweichungen gering waren. Die Kontrolle (Klon 5) wies wie erwartet keine Banden im Agarosegel auf.

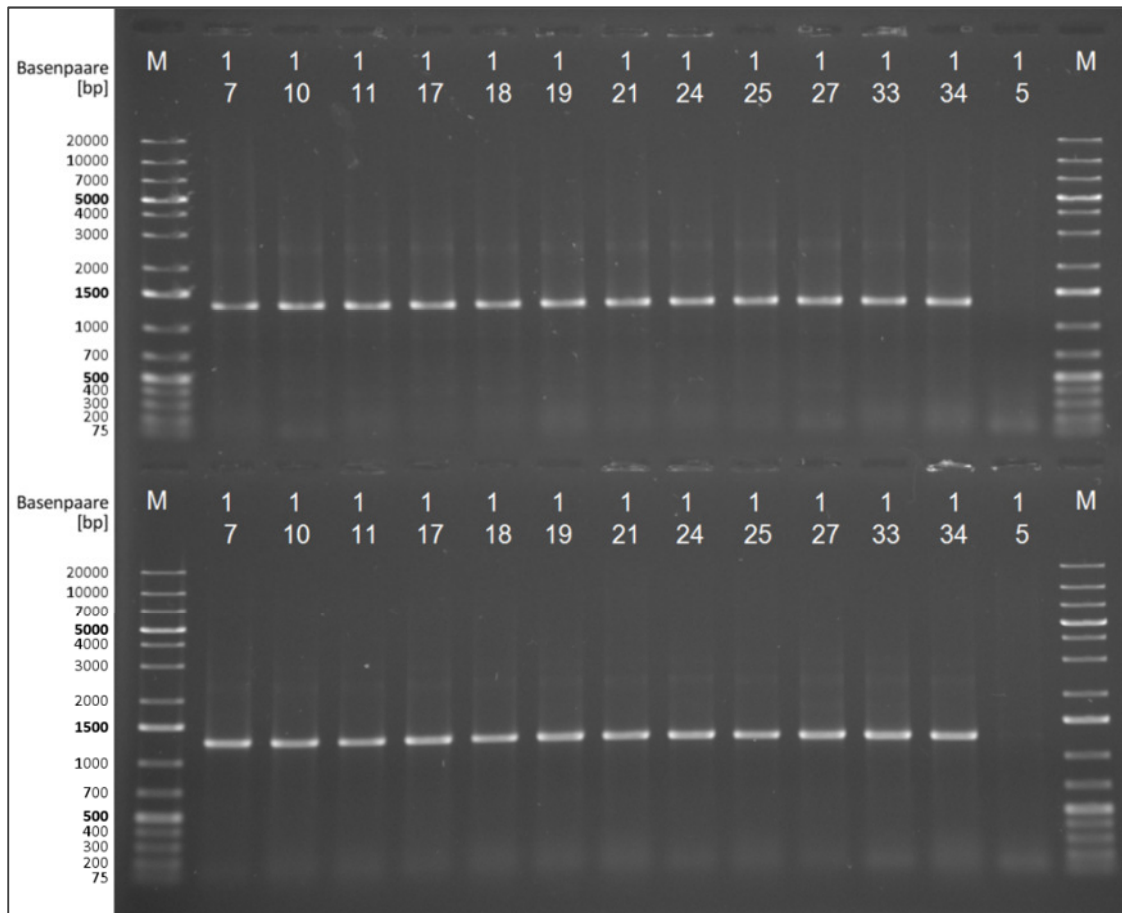


Abbildung 11: 0,8 %iges Agarosegel mit Amplifikaten der Kontroll-PCR-Ansätze der Chloramphenicol-sensitiven und blau gefärbten Klone des Matings 2.1

Für die weiteren Arbeiten wurde je einer der aus dem zweiten Mating hervorgegangenen Klone auf Saccharose-Agar ausgestrichen. In Abbildung 12 sind exemplarisch die Ausstriche (LB Agar, LB Agar mit 50 µg/ml Tetracyclin) der auf Saccharose-Agar gewachsenen Einzelkolonien des Matings 2.1 dargestellt. Alle acht Klone sind auf dem LB Agar gewachsen und waren Tetracyclin sensitiv.

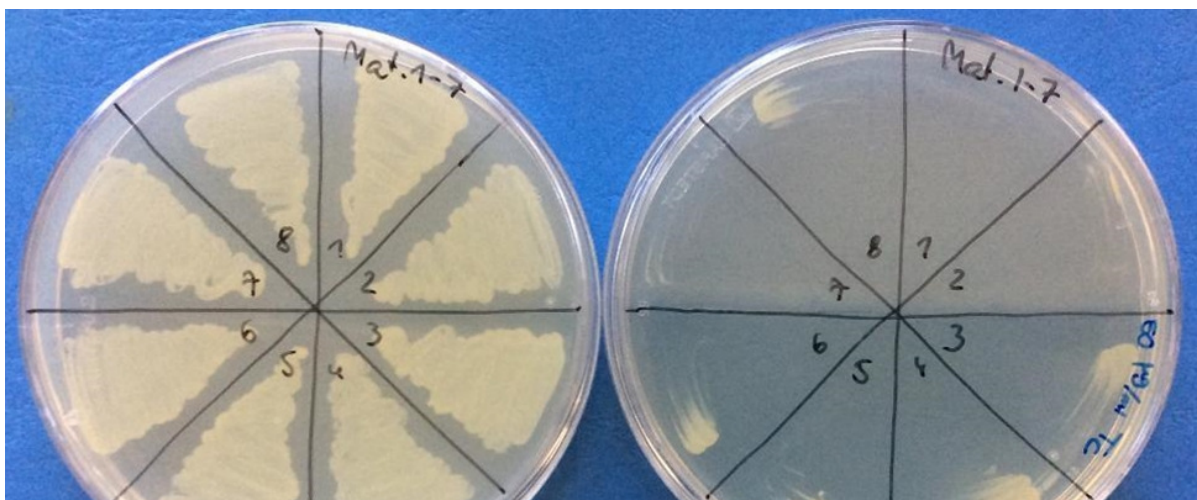


Abbildung 12: Ausstriche der auf Saccharose-Agar gewachsenen Einzelkolonien (Erzeugung von *S. maltophilia* K279a *P<sub>smlt0387</sub>::lacZ*) des Klons 7 aus dem Mating 2.1 auf LB Agar und LB Agar mit 50 µg/ml Tetracyclin

## 5.2. Wachstumskurven und $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätsassays

Mit den vier hergestellten Stämmen von *S. maltophilia* K279a wurden Kultivierungen durchgeführt, bei denen stündlich Proben genommen wurden. Ziel war es, die Abhängigkeit der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität vom Zellwachstum zu untersuchen, wobei hauptsächlich Augenmerk auf die exponentielle Wachstumsphase und den Eintritt in die stationäre Phase gelegt wurde. Das Wachstum wurde über die optische Dichte bei 600 nm der Bakteriensuspension dargestellt, die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Miller Units. Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, wurden alle Kultivierungen in Dreifachbestimmung durchgeführt, sodass je Stamm und Messzeitpunkt das arithmetische Mittel und die Standardabweichung abgeleitet werden konnte.

Alle vier Stämme zeigten ein sehr ähnliches Wachstum bis zum Eintritt in die stationäre Phase (Abb. 13 bis 16), wobei sich der typische Batch-Kultivierungsverlauf bestehend aus lag-Phase, exponentieller Phase und dem Übergang in die stationäre Wachstumsphase erkennen ließ. Dabei stieg die optische Dichte in den zehn Stunden nach dem Animpfen der Kulturen von ca. 0,1 auf einen Wert von knapp unter 7. In der ersten Kultivierungsstunde zeigten alle Stämme nur ein geringes Wachstum mit einem Anstieg der OD<sub>600</sub> von ca. 0,02. Darauffolgend nahm die optische Dichte bis zur fünften bzw. sechsten Stunde exponentiell, anschließend bis zur neunten Stunde annähernd linear zu. In der letzten Kultivierungsstunde wurde mit Ausnahme des Stammes *S. maltophilia* K279a *P<sub>smt0387</sub>::lacZ  $\Delta$ smlt0184* nur noch eine geringe Zunahme der OD<sub>600</sub> gemessen.

Die Standardabweichungen der optischen Dichten lag bis auf wenige Ausnahmen unter 0,08 und ist in den Diagrammen lediglich für die Messpunkte erkennbar, bei denen dieser Wert überschritten wurde.

Über die Auftragung des natürlichen Logarithmus vom Verhältnis der OD<sub>600</sub> zur OD<sub>600,0</sub> (optische Dichte zum Kultivierungsbeginn) gegen die Kultivierungszeit  $t$  lässt sich die spezifische Wachstumsrate  $\mu$  als Steigung der sich in der exponentiellen Phase ergebenden Gerade bestimmen. Die Verdopplungszeit  $t_d$  lässt sich mit folgender Formel aus der spezifischen Wachstumsrate berechnen (Boslaugh S, 2007):

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (2)$$

In Tabelle 10 sind die spezifischen Wachstumsraten und Verdopplungszeiten angegeben. Für die Bestimmung der Größen wurde stets der sich aus den OD<sub>600</sub>-Werten der drei Ansätze ergebende Mittelwert verwendet.

Tabelle 10: Angabe der spezifischen Wachstumsrate  $\mu$  und der Verdopplungszeit  $t_d$  der vier Reporterstämme

Stamm	$\mu$ in $h^{-1}$	$t_d$ in h
<i>S. maltophilia</i> K279a <i>P<sub>smlt0387</sub>::lacZ</i>	0,742	0,93
<i>S. maltophilia</i> K279a <i>P<sub>smlt0387</sub>::lacZ <math>\Delta</math>smlt0184</i>	0,676	1,03
<i>S. maltophilia</i> K279a <i>P<sub>smlt0184</sub>::lacZ</i>	0,787	0,88
<i>S. maltophilia</i> K279a <i>P<sub>smlt0184</sub>::lacZ <math>\Delta</math>smlt0387</i>	0,685	1,01

Zuletzt ist noch zu sehen, dass sich jeweils die Wachstumskurven der Stämme K279a *P<sub>smlt0387</sub>::lacZ* und K279a *P<sub>smlt0184</sub>::lacZ* und die der Stämme mit deletiertem Gen *smlt0387* bzw. *smlt0184* stark ähneln, sodass zum Beispiel bei den Stämmen K279a *P<sub>smlt0387</sub>::lacZ  $\Delta$ smlt0184* und K279a *P<sub>smlt0184</sub>::lacZ  $\Delta$ smlt0387* die Zunahme der optischen Dichte zwischen den Stunden sieben und acht leicht abnahm.

Das arithmetische Mittel der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität nahm Werte von 6943 bis 27665 Miller Units an (K279a *P<sub>smlt0184</sub>::lacZ* zum Zeitpunkt  $t_{min}=4$  h und  $t_{max}=10$  h). Auch hier zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Enzymaktivität bei allen vier Stämmen. Zunächst stieg die Aktivität von einem Wert von ca. 8000 bis 10000 Miller Units nach der ersten Stunde auf einen Wert von 11000 bis 14000 Miller Units nach der zweiten Kultivierungsstunde an. In den nächsten zwei bis vier Stunden sank die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase leicht ab. Die maximale Abnahme von ca. 3500 Miller Units zeigte sich bei dem Stamm K279a *P<sub>smlt0184</sub>::lacZ*. Anschließend nahm die Enzymaktivität allgemein erst leicht und nach der achten bis zur zehnten Stunde stärker zu.

Es ergaben sich bei den vier Stämmen Standardabweichungen von 97 (K279a *P<sub>smlt0184</sub>::lacZ  $\Delta$ smlt0387* zum Zeitpunkt  $t = 1$  h) bis 3467 Miller Units (K279a *P<sub>smlt0184</sub>::lacZ* zum Zeitpunkt  $t = 10$  h).

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0387}::lacZ$

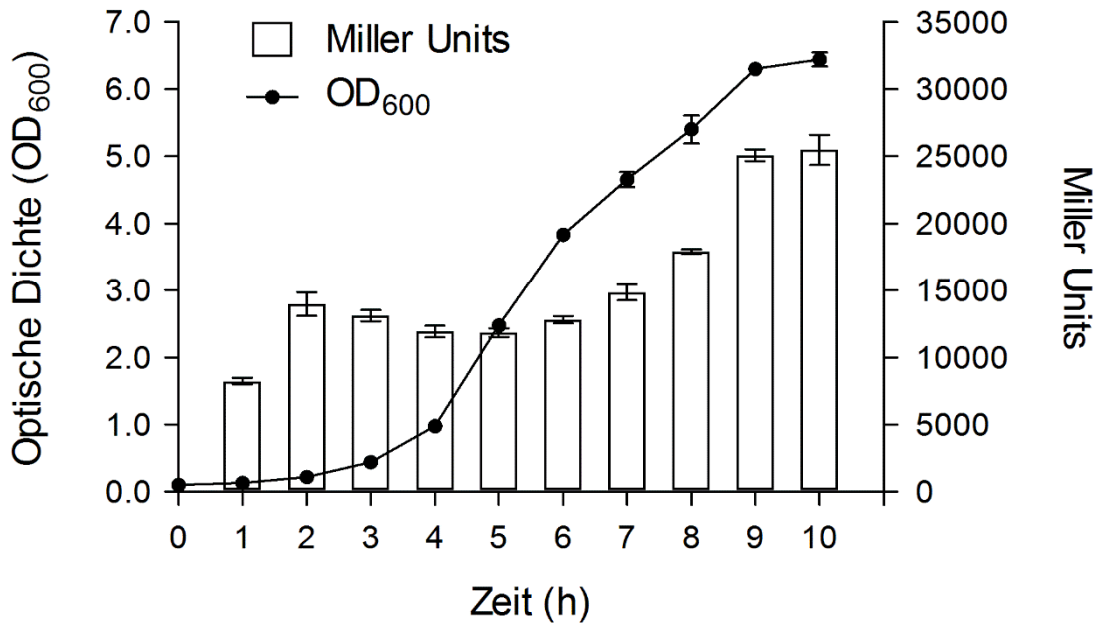


Abbildung 13: Optische Dichte (OD<sub>600</sub>) der Bakteriensuspension und β-Galactosidase-Aktivität (Miller Units) im Verlaufe der Kultivierung von *S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0387}::lacZ$

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0184}::lacZ$

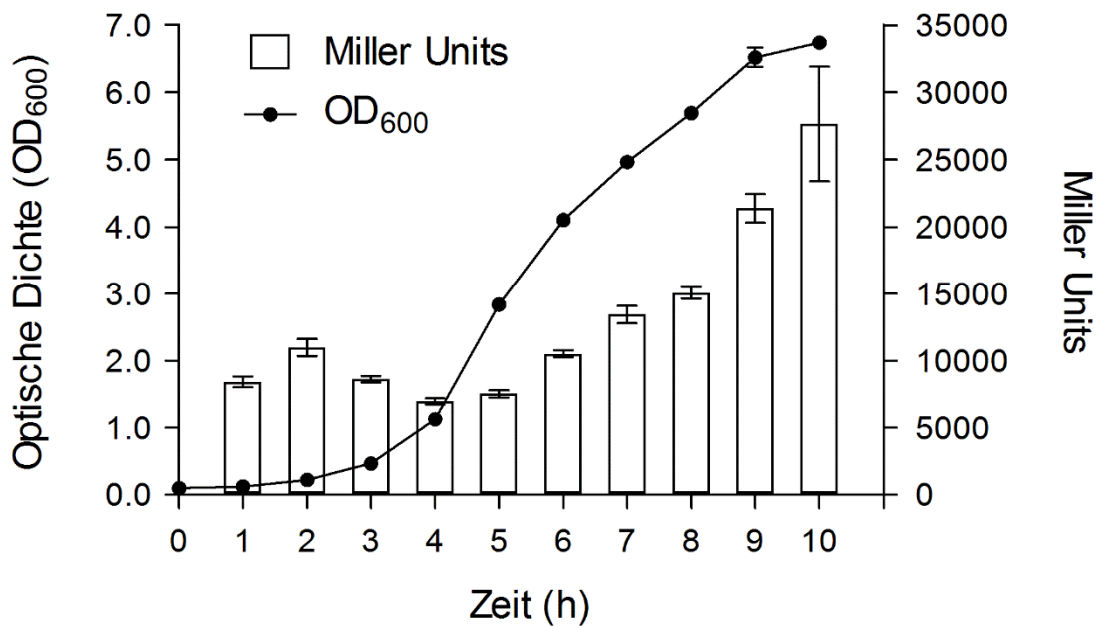


Abbildung 14: Optische Dichte (OD<sub>600</sub>) der Bakteriensuspension und β-Galactosidase-Aktivität (Miller Units) im Verlaufe der Kultivierung von *S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0184}::lacZ$

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0387}::lacZ \Delta smlt0184$

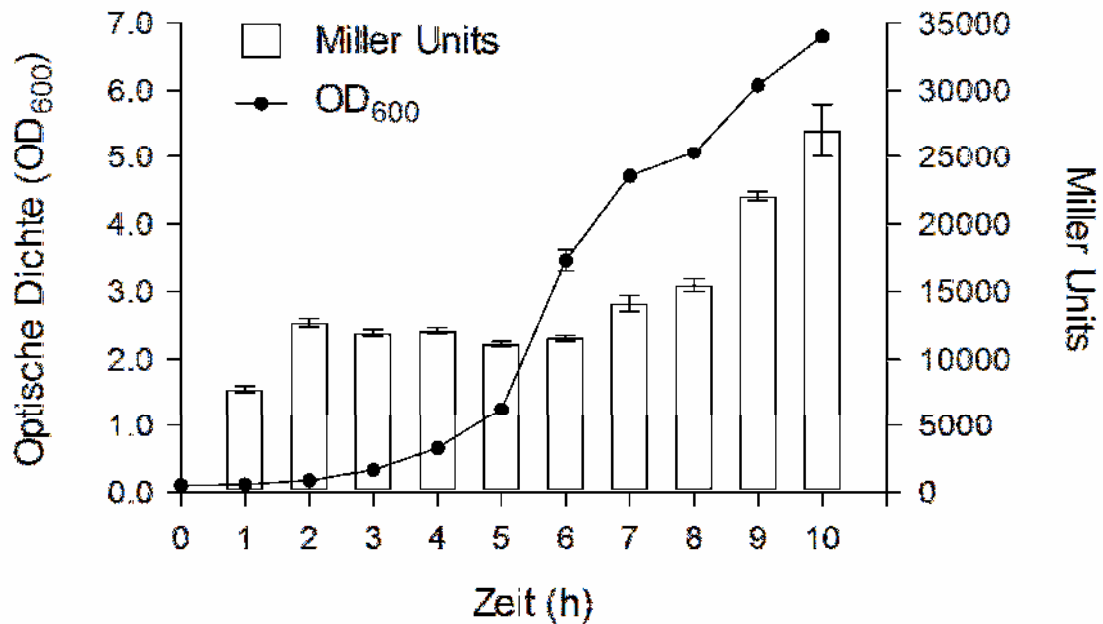


Abbildung 15: Optische Dichte (OD<sub>600</sub>) der Bakteriensuspension und β-Galactosidase-Aktivität (Miller Units) im Verlaufe der Kultivierung von *S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0387}::lacZ \Delta smlt0184$

*S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0184}::lacZ \Delta smlt0387$

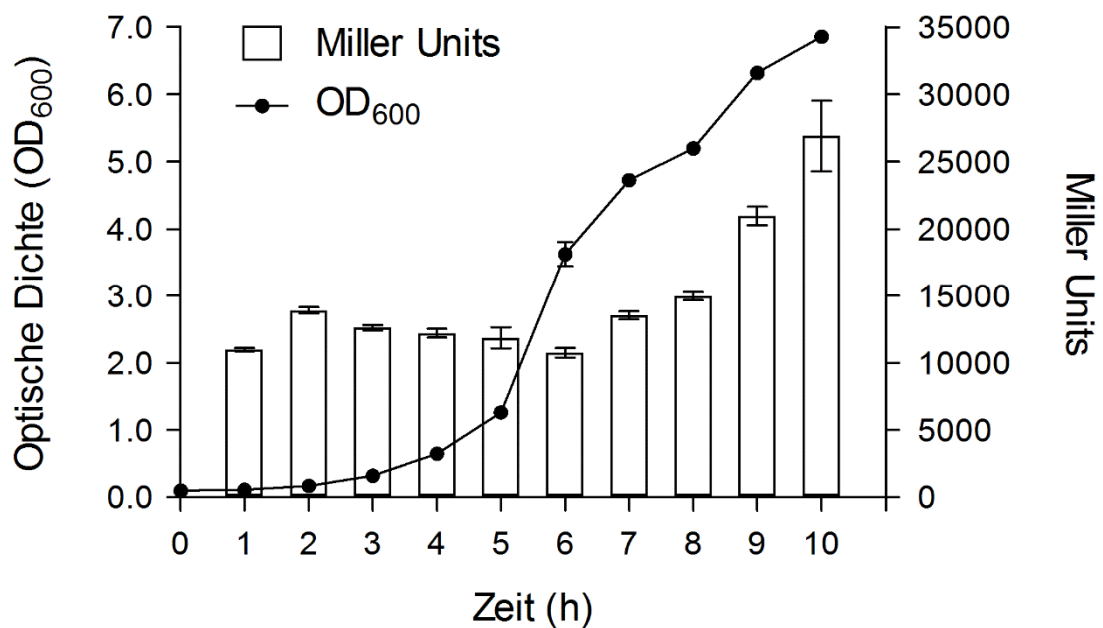


Abbildung 16: Optische Dichte (OD<sub>600</sub>) der Bakteriensuspension und β-Galactosidase-Aktivität (Miller Units) im Verlaufe der Kultivierung von *S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0184}::lacZ \Delta smlt0387$

## 6. Diskussion

### 6.1. Erzeugung der Reporterstämme

Mit der von Aubert DF *et al.* (2014) beschriebenen Methode gelang es erfolgreich, alle vier für die späteren Arbeiten benötigten Stämme herzustellen. Vor der Selektion der pDAI-SceI-SacB-freien Klone auf Saccharose-Agar wurde mithilfe einer PCR und anschließender Gelelektrophorese überprüft, ob in den  $\beta$ -Galaktosidase positiven und Chloramphenicol-sensitiven Klonen das *lacZ* Gen tatsächlich in den Locus des deletierten Gens *smlt0387* bzw. *smlt0184* integriert wurde. Je Stamm wurden zwei PCRs durchgeführt, mit denen beide Enden des Integrationsortes kontrolliert werden konnten. Die Primer wurden so gewählt, dass Sequenzen amplifiziert wurden, die zu einem Teil aus dem integrierten *lacZ* und zum anderen aus den flankierenden genomischen Sequenzen stammten. Hierfür musste pro PCR ein Primer mit der Basenabfolge der integrierten DNA und der jeweils andere mit einer Basensequenz der flankierenden Wirts-DNA hybridisieren.

Bei der Kontroll-PCR des Stamms *S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0387}::lacZ$  wurden für die erste PCR (obere Reihe in Abb. 11) die Primer Smlt0387ctrl1 und ECO-lacZ-Seq5 verwendet. Ersterer weist eine 22 Basenpaare lange Sequenz auf, die komplementär zu einem Abschnitt der genomischen DNA von *S. maltophilia* K279a ist (Abb.17). ECO-lacZ-Seq5 hingegen besteht aus einer Abfolge von 20 Basenpaaren, die komplementär zu einem Abschnitt des *lacZ* ist. Sofern es in den überprüften Klonen nicht zu einer anderen ungeplanten Integration kam, hätten die PCR-Produkte eine Länge von 1324 bp aufweisen müssen. Die geringen Abweichungen der mittels AlphaView Analysesoftware bestimmten Größen (1289 kb bis 1368 kb) sind durch leichte Anomalien im Laufverhalten der DNA Fragmente zu erklären, welche durch Unregelmäßigkeiten im Agarosegel und/oder der Pufferzusammensetzung der PCR Proben resultiert sein könnten.

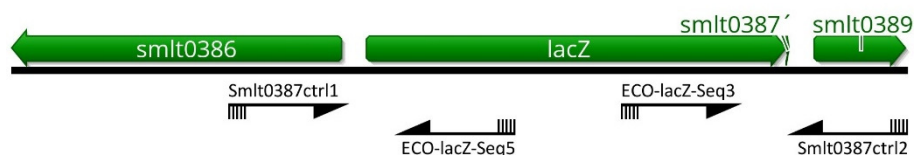


Abbildung 17: Genetische Organisation der  $P_{smlt0387}::lacZ$  Fusion im Genom von *S. maltophilia* K279a mit Angabe der Primer-Bindungsstellen

Für die zweite Validierungs-PCR für den Stamm *S. maltophilia* K279a  $P_{smlt0387}::lacZ$  (untere Reihe in Abb. 11) wurden die Primer Smlt0387ctrl2 und ECO-lacZ-Seq3 verwendet. Smlt0387ctrl2 hybridisierte während der PCR mit der genomischen DNA, während ECO-lacZ-Seq3 an eine Sequenz des *lacZ* Gens band. Die theoretische Größe der erwarteten PCR-Produkte betrug 1261 bp, sodass die tatsächlich



bestimmten Größen von 1145 kb bis 1289 kb aus den zuvor genannten Gründen ebenfalls nur minimal abweichen.

Als Kontrolle wurde bei beiden PCRs immer ein Chloramphenicol-sensitiver Klon mitgeführt, der keine Blaufärbung in Anwesenheit von X-Gal hervorbrachte (Klon 5). Da aller Wahrscheinlichkeit nach eine homologe Rekombination ablief, durch die der ursprünglich verwendete Stamm *S. maltophilia* K279a  $\Delta smlt0387$  entstand, kann davon ausgegangen werden, dass lediglich die Primer Smlt0387ctrl1 und Smlt0387ctrl2 hybridisieren konnten. Da jedoch ohne die Anlagerung der Primer ECO-lacZ-Seq5 und ECO-lacZ-Seq3 nicht der jeweils komplementäre Strang vervielfältigt werden konnte, fand keine Amplifikation der definierten Sequenzen statt, sodass im Agarosegel keine Banden nachgewiesen werden konnten.

Die angewandte Methode stellt ein vielversprechendes Verfahren zur gezielten genetischen Manipulation Gram-negativer Bakterien dar. Durch die gezielte Anpassung der genetischen Organisation des im ersten Mating zu verwendenden Suizid-Plasmids, in diesem Fall pUDK049 bzw. pUDK051, kann zumindest theoretisch in jedes nicht-essenzielle Gen des Genoms des Rezipienten eine Mutation eingefügt werden. Dabei kann es sich bei der Mutation um eine Insertion, einen Austausch oder eine Deletion handeln, sodass z.B. Stämme zur Untersuchung des Effekts einer bestimmten Punktmutation, der Notwendigkeit gewisser Gene oder eben der Regulation von Promotoren erzeugt werden können.

Die Effizienz einer Konjugation ist von vielen Faktoren wie z.B. dem pH-Wert, der Inkubationstemperatur und -zeit, der Zelldichte, dem Verhältnis der Matingpartner und den Organismen selbst abhängig (Rochelle PA *et al.*, 1989). Unter Umständen könnte somit bei den Matings das Problem einer zu geringen Plasmid-Transferrate auftreten. In diesem Fall könnten optimalere Bedingungen ermittelt oder auf andere Methoden des Gentransfers zurückgegriffen werden. Denkbar wäre ebenfalls eine Transformation durch Elektroporation kompetenter Zellen.

## 6.2. Wachstumskurven und $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätsassays

Unter Verwendung der erzeugten *lacZ* Reporterstämme konnten die eigentlichen Untersuchungen zur Wachstumsphasen-abhängigen Expression der *ax21* Orthologe *smlt0387* und *smlt0184* in *S. maltophilia* K279a durchgeführt werden.

Auf der Grundlage der Verläufe der OD<sub>600</sub>-Werte und der für die exponentielle Phase bestimmten spezifischen Wachstumsraten und Verdopplungszeiten (Tab. 10) lässt sich schließen, dass alle vier Stämme ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten aufweisen. Die höchsten Abweichungen ergaben sich für den Vergleich der Stämme *S. maltophilia* K279a *P<sub>smlt0387</sub>::lacZ  $\Delta$ smlt0184* und *S. maltophilia* K279a *P<sub>smlt0184</sub>::lacZ*, bei dem die Abweichung der spezifischen Wachstumsrate 16 % und die der Verdopplungszeit 17 % betrug. Da die Wachstumskurven der beiden Stämme allerdings nicht parallel erstellt wurden, muss es sich hierbei nicht zwingend um grundlegende Unterschiede im Wachstumsverhalten handeln. Es wurden jeweils die Wachstumskurven der aus den Einzelmutanten hervorgegangenen Reporterstämme und die der aus den Doppelmutanten hervorgegangenen Stämme zeitgleich aufgenommen, sodass diese Kurven aufgrund der exakt identischen Bedingungen auch untereinander die stärkere Ähnlichkeit aufwiesen.

In der ersten Stunde nach dem Animpfen der Kolben zeigten alle Kulturen nur eine sehr geringe Zunahme der Trübung. Da die Bakterien sich vor dem Animpfen in der stationären Wachstumsphase befanden, mussten sich diese hier zunächst an das frische Medium anpassen. In dieser sogenannten lag-Phase wurde der Metabolismus hochgefahren und eine Vielzahl an RNA und Proteinen synthetisiert, welche für die Umsetzung des favorisierten Substrats und eine erhöhte Zellteilung benötigt werden (Deepa Parvathi V *et al.*, 2014).

Anschließend wuchsen die Kulturen bis zur fünften bzw. sechsten Stunde exponentiell an. Im Medium lag eine ausreichend hohe Menge des favorisierten Substrats vor, sodass es offensichtlich zu keiner Limitierung des Wachstums kam. Die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase wurde deshalb ab dem Beginn des exponentiellen Wachstums bestimmt. Der Test basiert auf der photometrischen Messung einer durch o-Nitrophenol hervorgebrachten Gelbfärbung. Dieses entsteht neben Galactose bei der von  $\beta$ -Galactosidase katalysierten Spaltung des Galactosids ONPG (Clark DP *et al.*, 2018).

Um mithilfe der Ergebnisse des  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätsassays eindeutige Aussagen über die Expression des Reportergens und übertragend Schlussfolgerungen über die Expression der *ax21* Orthologe in *S. maltophilia* treffen zu können, sind Informationen über die Abbaugeschwindigkeit der  $\beta$ -Galactosidase, *Smlt0387* und *Smlt0184*, aber auch der zugehörigen mRNA im Mikroorganismus nötig.

Varshavsky A beschrieb 1997 in der von ihm benannten *N*-End-Rule, dass die biologische Halbwertszeit von Proteinen unter anderem vom Organismus und der *N*-terminal liegenden Aminosäure abhänge. Sofern die Aminosäure Arginin, Lysin, Phenylalanin, Leucin oder Tryptophan *N*-terminal lokalisiert sei, ergäbe sich eine Halbwertszeit von zwei Minuten in *E. coli* und drei Minuten in Hefezellen. Handle es sich stattdessen um die Aminosäure Cystin, Alanin, Serin, Threonin, Glycin, Valin oder Methionin, würde die Halbwertszeit in *E. coli* über zehn Stunden, in Hefezellen sogar mehr als 30 Stunden betragen.

Das in die Stämme integrierte *lacZ* Gen weist am 5'-Ende die Basensequenz Thymin-Adenin-Cytosin-Thymin-Guanin-Guanin auf, welche für die Aminosäure Methionin und darauffolgend Threonin kodiert. Da im Genom von *S. maltophilia* K279a das Gen *smlt1410* identifiziert werden konnte, welches eine starke Homologie zum Methionin Aminopeptidase kodierenden Gen (*map*) verwandter Bakterienspezies aufweist ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org) >> B2FUE3\_STRMK), ist davon auszugehen, dass auch in diesen eine *N*-terminale Methionin Prozessierung abläuft. Somit würde nach der Abspaltung des Methionins von der naszierenden  $\beta$ -Galactosidase die Aminosäure Threonin den *N*-Terminus des Enzyms bilden. Sofern die *N*-End-Rule auf den Proteinabbau in *S. maltophilia* übertragbar ist, müsste die  $\beta$ -Galactosidase aufgrund des *N*-terminale Threonin einen Halbwertszeit von ca. zehn Stunden aufweisen.

Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, folgt der Start-Aminosäure Methionin (M) im Protein Smlt0387 Lysin (K) und in Smlt0184 Asparagin (N). Nach der *N*-End-Rule würde Smlt0387 daher eine Halbwertszeit von ca. zwei Minuten aufweisen. Für Asparagin wurde von Varshavsky A (1997) in *E. coli* eine Halbwertszeit von mehr als zehn Stunden beschrieben, in *Saccharomyces cerevisiae* soll allerdings schon nach drei Minuten die Hälfte der betreffenden Proteine abgebaut worden sein. Sofern die Ergebnisse von *E. coli* auf *S. maltophilia* übertragen werden können, weist Smlt0184 also eine Halbwertszeit von ca. zehn Stunden auf.

Für die mRNA der  $\beta$ -Galactosidase wurde in *E. coli* eine Halbwertszeit von 1,5 Minuten beschrieben (Khachatourians GG & Tipper DJ, 1974), sodass von einer ähnlichen Halbwertszeit in *S. maltophilia* auszugehen ist. Folglich wird unmittelbar vor und gegebenenfalls auch noch während des Anstiegs der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität *lacZ* exprimiert. Da in Prokaryoten der Großteil der mRNA in wenige Minuten abgebaut wird (Tropp BE, 2012), beträgt die Halbwertszeit der zu *smlt0387* und *smlt0184* komplementären mRNA aller Voraussicht nach ebenfalls nur einige Sekunden bis wenige Minuten.

Da lediglich in der ersten Stunde der exponentiellen Phase die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität anstieg, wurde unter den getroffenen Annahmen nur zu Beginn des exponentiellen Wachstums *lacZ* exprimiert. Die Abnahme der Enzymaktivität in den nächsten zwei bis vier Kultivierungsstunden ist mit dem Abbau der

$\beta$ -Galactosidase erklärbar. Je nachdem, wie stark dieser Abbau tatsächlich war, kann es zu einer sehr geringen Expression des *lacZ* Gens während dieser Zeit gekommen sein, wobei der Abbau der  $\beta$ -Galactosidase jedoch die Synthese überwog. Aus dem Anstieg der Enzymaktivität gegen Ende des exponentiellen Wachstums und in der Übergangsphase zum stationären Wachstum ist abzuleiten, dass hier *lacZ* exprimiert wurde. Kurz vor der stationären Phase stieg die Aktivität über einen Zeitraum von ein bis zwei Stunden stärker an, sodass es zudem zu einer verstärkenden Regulation der *lacZ*-Expression gekommen sein muss.

Überträgt man diese Ergebnisse auf die Expression der *ax21* Orthologe in *S. maltophilia*, so kommt es gegen Anfang der exponentiellen Phase zu einer geringen Expression der Gene. Im weiteren Verlauf des exponentiellen Wachstums verringert sich zunächst die Expression von *smlt0387* und *smlt0184*, bevor die Gene gegen Ende wieder stärker exprimiert werden. Beim Eintritt ins stationäre Wachstum kommt es schließlich zu einer stark erhöhten Expression. Nach der *N*-End-Rule würden sich allerdings durch die stark abweichenden Halbwertszeiten der *Ax21* Orthologe die Konzentrationen dieser in den Zellen unterscheiden. Da das Expressionsprodukt von *smlt0387* demnach innerhalb weniger Minuten abgebaut wird, das Gen allerdings ähnlich stark wie *smlt0184* exprimiert wird, würde die Konzentration von *Smlt0387* immer weit unter der von *Smlt0184* liegen.

Die Ergebnisse des  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätsassays lassen sich teilweise mit jenen vereinbaren, die bei der Expressionsanalyse von *smlt0387* und *smlt0184* mittels RT-qPCR gewonnen wurden. Die Konzentration der mRNA der *ax21* Orthologe nahm über den Verlauf der exponentiellen Phase nur geringfügig zu und stieg erst in der stationären Phase auf das Doppelte bis Achtfache an (Mamat U *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Somit führten beide Experimente zu dem Schluss, dass es ab dem Eintritt in das stationäre Wachstum zu einer Expressions-verstärkenden Regulierung der beiden Gene kommt.

Allerdings ließ sich in dieser Arbeit aufgrund der ähnlich hohen  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in allen vier erzeugten Stämmen nicht bestätigen, dass das Gen *smlt0387* weitaus stärker als *smlt0184* exprimiert wird (Mamat U *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Proteinbiosynthese kann an unterschiedlichen Schritten reguliert werden, wobei in Prokaryonten die Regulation hauptsächlich auf Ebene der Transkription stattfindet. Ein abweichend starker Abbau von mRNA und eine unterschiedlich regulierte Translation haben jedoch ebenfalls einen Effekt auf die spätere Proteinkonzentration (Spirin AS, 2006). Es wäre somit z.B. möglich, dass die Translation des Transkriptionsprodukts von *smlt0387* im Gegensatz zu der des Transkriptionsprodukts von *smlt0184* stark gehemmt wird, sodass es letztendlich zu einer Angleichung der Proteinkonzentrationen kommt.

Mithilfe der Ergebnisse ließ sich ein Zusammenhang zwischen der Regulation der *ax21* Orthologe und der Wachstumsphase herstellen. Um Aussagen darüber treffen zu können, inwieweit *Smlt0387* und *Smlt0184* Bestandteile des Quorum Sensing darstellen könnten, müssten bei erneuter Durchführung des Experiments zudem Virulenzfaktoren wie die Biofilmbildung oder Expression von Virulenzgenen überprüft werden.

Für den Fall, dass es sich bei den beiden *Ax21* Orthologen tatsächlich um Signalmoleküle des Quorum Sensing handeln sollte, wäre es von Interesse, die genaue Regulation der Expression von *smlt0387* und *smlt0184* aufzuklären. Das Abschwächen oder eine gänzliche Hemmung der Expression der beiden Gene könnte somit eventuell eine Möglichkeit bieten, die Virulenz von *S. maltophilia* durch die Unterdrückung der Biofilmbildung und die verringerte Expression von Virulenzgenen herabzusetzen. In der vorliegenden Arbeit gelang es erfolgreich, Stämme als Modellorganismen zu erzeugen, die dazu beitragen können, Gene zu identifizieren, deren Syntheseprodukte an der Regulation der Expression der *ax21* Orthologe beteiligt sind.

Für eine weiterführende Verwendung könnte eine sogenannte Transposonbibliothek der Stämme *S. maltophilia* K279a *P<sub>smlt0387</sub>::lacZ* und *S. maltophilia* K279a *P<sub>smlt0184</sub>::lacZ* hergestellt werden. Bei Transposons, auch als springende Gene bekannt, handelt es sich um mobile DNA-Sequenzen, die innerhalb eines oder zwischen unterschiedlichen DNA-Molekülen (Chromosomen, Plasmide) frei umherspringen können. Dieser Vorgang wird als Transposition bezeichnet (Clark DP *et al.*, 2018). Unter einer Transposonbibliothek wird demnach eine Sammlung von Klonen eines Stamms verstanden, bei der das Transposon in jedem Klon an einer anderen Stelle des Genoms eingefügt wurde. Durch die Integration innerhalb einer Gensequenz kommt es zum Funktionsverlust dieses Gens.

Durch das Ausplattieren der Transposonbibliothek auf X-Gal LB Agar sollte es möglich sein, Kolonien zu identifizieren, bei denen das Transposon durch seine Integration Gene zerstört hat, die in *S. maltophilia* K279a an der Regulation der Expression von *smlt0387* und *smlt0184* beteiligt sind. Da in den beiden hergestellten Stämmen *lacZ* dem Promotor *P<sub>smlt0387</sub>* bzw. *P<sub>smlt0184</sub>* unterstellt ist, hätte eine Zerstörung der regulatorischen Gene einen Einfluss auf die Expression des *lacZ* Gens und somit auf die Synthese der  $\beta$ -Galactosidase. Die jeweiligen Kolonien würden dadurch in Anwesenheit des Substrats X-Gal theoretisch eine stärkere, schwächere oder gar keine Blaufärbung aufweisen, je nachdem ob die zerstörten Gene eine expressionshemmende, -verstärkende oder -aktivierende Funktion haben. Klone, bei denen das Transposon in das *lacZ* integriert wurde, würden ebenfalls als weiße Kolonien erscheinen.

Es gibt mehrere unterschiedlich effektive Möglichkeiten das Transposon und für die Transposition benötigte Komponenten in die Zellen einzubringen. Für das Erstellen der Transposonbibliothek ist es

nötig, die Klone selektieren zu können, die das Transposon integriert haben. Aus diesem Grund sollte die mobile DNA-Sequenz aus einem Selektionsmarker wie einer Antibiotikaresistenz bestehen, über die *S. maltophilia* nicht bereits verfügt. Eine Möglichkeit wäre z.B. das für eine Gentamicin 3'-N-Acetyltransferase kodierende Gen *aacC1* (Xia W *et al.*, 2016; Lin L *et al.*, 2017). Das Enzym transferiert eine Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf das Antibiotikum Gentamicin, sodass das Produkt nicht mehr an die 30S-Untereinheit der Ribosomen binden kann und der Elongationsschritt der Translation nicht behindert wird (Liu D, 2009).

Für die spätere Identifikation der zerstörten Gene, in die das Transposon integriert wurde, ist es sinnvoll, dem Antibiotikaresistenzgen den Replikationsursprung *ori<sub>R6Ky</sub>* anzufügen. Dieser ermöglicht eine sogenannte Rescue-Plasmid-Klonierung in  $\lambda$ pir Stämmen von *E. coli*, mit welcher nach der Sequenzierung der erzeugten Rescue-Plasmide auf die ursprüngliche Integrationsstelle des Transposons geschlossen werden kann (Kirby JR, 2007). An die Transposonsequenz müssten zudem sogenannte Mosaik-Enden (ME) angefügt werden, bei denen es sich um invertierte Sequenzwiederholungen (*engl. inverted repeats*) an den Strangenden handelt. Diese dienen als Bindungsstelle für die Transposase, wodurch das mobile Element in die Ziel-DNA eingefügt, aber auch herausgetrennt werden kann (Clark DP *et al.*, 2018). Die Herstellung der Transposons könnte über eine Überhang-Extensions-PCR (*engl. overlap extension polymerase chain reaction; OE-PCR*) realisiert werden, bei der die MEs durch überlappende Sequenzen der Primer bei der Amplifikation der Transposonsequenz an diese angefügt werden (Wilson K & Walker J, 2000).

Das Transposon könnte z.B. integriert in ein Plasmid, das ebenfalls das Gen für die benötigte Transposase trägt, über ein weiteres triparentales Mating in *S. maltophilia* K279a *P<sub>smlt0387</sub>::lacZ* bzw. *S. maltophilia* K279a *P<sub>smlt0184</sub>::lacZ* eingebracht werden. Denkbar wäre jedoch auch das Einbringen des Transposon-Transposase-Komplexes in Form sogenannter Transposome. Kommerziell verfügbar wäre z.B. die EZ-Tn5 Transposase mit dazugehörigen Puffern. Laut Herstellergebrauchsanweisung ([www.lucigen.com](http://www.lucigen.com) >> EZ-Tn5<sup>TM</sup>-Transposase) sollen sich durch das Inkubieren eines Mixes aus EZ-Tn5-Transposase, Glycerol und einer EZ-Tn5 Transposon DNA (Transposon mit EZ-Tn5 ME) in Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup>-Ionen EZ-Tn5 Transposome bilden, die anschließend über Elektroporation in elektrokompetente Zellen von *S. maltophilia* K279a *P<sub>smlt0387</sub>::lacZ* bzw. *S. maltophilia* K279a *P<sub>smlt0184</sub>::lacZ* eingebracht werden können.

Durch Ausplattieren der Elektroporationsansatzes und entsprechender Verdünnungen auf X-Gal LB Agar mit entsprechendem Antibiotikum, dessen Auswahl sich nach der auf dem Transposon kodierten Antibiotikaresistenz richtet, könnten alle Klone selektiert werden, bei denen es zu einer Insertion des Transposons in das Wirtsgenom kam. Nach der Inkubation über Nacht sollten Kolonien identifizierbar

sein, die eine stärkere, schwächere oder gar keine Blaufärbung aufweisen. Mit ihnen sollte eine Rescue-Plasmid-Klonierung durchgeführt werden.

Bei der Rescue-Plasmid-Technik wird im ersten Schritt die genomische DNA isoliert und anschließend mit diversen Endonukleasen verdaut. Durch Zugabe einer Ligase werden die DNA-Fragmente mit sich selbst zu ringförmigen Molekülen ligiert, welche über Elektroporation in  $\lambda$ pir Stämme von *E. coli* eingebracht werden. Idealerweise werden so Rescue-Plasmide geschaffen, die aus dem Transposon mitsamt flankierenden genomischen Sequenzen bestehen. Mithilfe der auf dem Transposon kodierten Antibiotikaresistenz werden diejenigen Klone selektiert, die durch die Transformation ein solches Rescue-Plasmid erhalten haben. Der Replikationsursprung  $ori_{R6K\psi}$  ermöglicht die Replikation der Plasmide, sodass diese anschließend isoliert und sequenziert werden können (Kirby JR, 2007). Durch den Abgleich der Transposon-flankierenden genomischen Sequenzen mit dem Chromosom von *S. maltophilia* K279a können die Gene ausfindig gemacht werden, die an der Regulation der Expression von *smlt0387* und *smlt0184* beteiligt sind.

Sofern bekannt ist, für welche Proteine oder RNA die identifizierten Gene kodieren, könnten Strategien entwickelt werden, die regulierenden Syntheseprodukte zu dezimieren oder deren Konzentration zu erhöhen. Würde dies gelingen, könnte die Expression der *ax21* Orthologe und somit die Synthese der potenziell am Quorum Sensing beteiligten Proteine *Smlt0387* und *Smlt0184* gehemmt werden.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit ein wichtiger Schritt zum weiteren Verständnis der Expression der potentiell am Quorum Sensing beteiligten *ax21* Orthologe in *S. maltophilia* durch die Herstellung von Modellorganismen für die Regulation der Gene *smlt0387* und *smlt0184* geleistet, welche die Grundlagen für vertiefende Untersuchungen zur Aufklärung der Expression von Virulenzfaktoren bilden können.

## 7. Literaturverzeichnis

### Paper und Bücher:

- Adegoke AA, Stenström TA, Okoh AI (2017) *Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy. *Frontiers in Microbiology* **8**:2276. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02276
- Alonso A, Sanchez P, Martínez JL (2000) *Stenotrophomonas maltophilia* D457R Contains a Cluster of Genes from Gram-Positive Bacteria Involved in Antibiotic and Heavy Metal Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44(7)**:1778-1782. DOI: 10.1128/AAC.44.7.1778-1782.2000
- Aubert DF, Hamad MA, Valvano MA (2014) A markerless deletion method for genetic manipulation of *Burkholderia cenocepacia* and other multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Methods in Molecular Biology* **1197**:311-327. DOI: 10.1007/978-1-4939-1261-2\_18
- Berg G, Eberl L, Hartmann A (2005) The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology* **7(11)**: 1673-1685. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x
- Boslaugh S (2007) *Encyclopedia of Epidemiology*. SAGE Publications
- Canthomen T, Hirsch M, Porteus M (2016) *Genome Editing: The Next Step in Gene Therapy*. Springer
- Casali N, Preston A (2003) *E. coli Plasmid Vectors: Methods and Applications*. Humana Press
- Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR (2018) *Molecular Biology: Edition 3*. Elsevier
- Deepa Parvathi V, Sumitha R, Smitha S (2014) *Microbiology for nurses*. Pearson
- Denton M, Kerr KG (1998) Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews* **11(1)**:57-80. DOI: 10.1128/CMR.11.1.57
- Devos S, Van Oudenhove L, Stremersch S, Van Putte W, De Rycke R, Van Driessche G, Vitse J, Raemdonck K, Devreese B (2015) The effect of imipenem and diffusible signaling factors on the secretion of outer membrane vesicles and associated Ax21 proteins in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in Microbiology* **6**:298. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00298
- Figurski DH, Helinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76(4)**:1648-1652. DOI: 10.1073/pnas.76.4.1648
- Hamad MA, Skeldon AM, Valvano MA (2010) Construction of aminoglycoside-sensitive *Burkholderia cenocepacia* strains for use in studies of intracellular bacteria with the gentamicin protection assay. *Applied and Environmental Microbiology* **76(10)**:3170-3176. DOI: 10.1128/AEM.03024-09
- Han SW, Sriariyanun M, Lee SW, Sharma M, Bahar O, Bower Z, Ronald PC (2011) Small Protein-Mediated Quorum Sensing in a Gram-Negative Bacterium. *PLoS ONE* **6(12)**:e29192. DOI: 10.1371/journal.pone.0029192



- Han SW, Sriariyanun M, Lee SW, Sharma M, Bahar O, Bower Z, Ronald PC (2013) Retraction: Small Protein-Mediated Quorum Sensing in a Gram-Negative Bacterium. *PLoS ONE* **8(9)**. DOI: 10.1371/annotation/880a72e1-9cf3-45a9-bf1c-c74ccb73fd35
- Howe C (2007) Gene Cloning and Manipulation: Edition 2. *Cambridge University Press*
- Khachatourians GG, Tipper DJ (1974) Inhibition of Messenger Ribonucleic Acid Synthesis in *Escherichia coli* by Thiolutin. *Journal of Bacteriology* **119(3)**:795-804. PMID: 4604615
- Kirby JR (2007) In vivo mutagenesis using EZ-Tn5. *Methods in Enzymology* **421**:17-21. DOI: 10.1016/S0076-6879(06)21003-6
- Lee SW, Han SW, Sririyanun M, Park CJ, Seo YS, Ronald PC (2009) A Type I-Secreted, Sulfated Peptide Triggers XA21-Mediated Innate Immunity. *Science* **326(5954)**:850-853. DOI: 10.1126/science.1173438
- Lin L, Wang SF, Yang TY, Hung WC, Chan MY, Tseng SP (2017) Antimicrobial resistance and genetic diversity in ceftazidime non-susceptible bacterial pathogens from ready-to-eat street foods in three Taiwanese cities. *Scientific Reports* **7(1)**:15515. DOI: 10.1038/s41598-017-15627-8
- Liu D (2009) Molecular Detection of Foodborne Pathogens. *CRC Press*
- Lorkowski S, Cullen PM (2006) Analysing Gene Expression: A Handbook of Methods, Possibilities, and Pitfalls. *John Wiley & Sons*
- Mackey IM (2007) Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization. *Caister Academic Press*
- McCarthy Y, Dow JM, Ryan RP (2011) The Ax21 Protein Is a Cell-Cell Signal That Regulates Virulence in the Nosocomial Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Bacteriology* **193(22)**:6375-6378. DOI: 10.1128/JB.05949-11
- McCarthy Y, Dow JM, Ryan RP (2017) Retraction for McCarthy et al., "The Ax21 protein is a cell-cell signal that regulates virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*." *Journal of Bacteriology* **199**:e00156-17. DOI: 10.1128/JB.00156-17
- Nelson M, Hillen W, Greenwald RA (2012) Tetracyclines in Biology, Chemistry and Medicine. *Science*
- Palleroni NJ, Bradbury JF (1993) *Stenotrophomonas*, a New Bacterial Genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43(3)**:606-609. DOI: 10.1099/00207713-43-3-606
- Papich MG (2010) Saunders Handbook of Veterinary Drugs - E-Book: Small and Large Animal: Edition 3. *Elsevier Health Sciences*
- Park CJ, Han SW, Chen X, Ronald PC (2010) Elucidation of XA21-mediated innate immunity. *Cellular Microbiology* **12(8)**:1017–1025. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01489.x
- Qian G, Zhou Y, Zhao Y, Song Z, Wang S, Fan J, Hu B, Venturi V, Liu F (2013) Proteomic Analysis Reveals Novel Extracellular Virulence-Associated Proteins and Functions Regulated by the Diffusible Signal Factor (DSF) in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Journal of Proteome Research* **12(7)**:3327-3341. DOI: 10.1021/pr4001543

Rochelle PA, Fry TJC, Day MJ (1989) Factors Affecting Conjugal Transfer of Plasmids Encoding Mercury Resistance from Pure Cultures and Mixed Natural Suspensions of Epilithic Bacteria. *Journal of General Microbiology* **135**:409-424. DOI: 10.1099/00221287-135-2-409

Senol E (2004) *Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen. *Journal of Hospital Infection* **57**:1-7. DOI: 10.1016/j.jhin.2004.01.033

Smith MCM, Sockett E (1999) Genetic Methods for Diverse Prokaryotes. *Academic Press*

Spirin AS (2006) Ribosomes. *Springer Science & Business Media*

Swings J, De Vos P, Van den Mooter M, De Ley J (1983) Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the Genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**(2):409-413

Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami B, Oka M, Imanaka T (1997) Characterization of DNA Polymerase from *Pyrococcus* sp. Strain KOD1 and Its Application to PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(11):4504-4510. PMID: 9361436

Tay SB, Yew SW (2013) Development of Quorum-Based Anti-Virulence Therapeutics Targeting Gram-Negative Bacterial Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* **14**(8):16570-16599. DOI:10.3390/ijms140816570

Tropp BE (2012) Molecular Biology: Genes to Proteins. *Jones & Bartlett Learning*

Vazquez SC, Rios Merino LN, MacCormack WP (1995) Protease-producing psychrotrophic bacteria isolated from Antarctica. *Polar Biology* **15**(2):131-135. DOI: 10.1007/BF00241051

Varshavsky A (1997) The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* **2**:13-28. DOI: 10.1046/j.1365-2443.1997.1020301.x

Waters CM, Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**:319-334. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001

Wilson K, Walker J (2000) Principles and Techniques of Practical Biochemistry: Fifth edition. *Cambridge University Press*

Xia W, Xu T, Qin T, Li P, Liu Y, Kang H, Gu B, Ma P (2016) Characterization of integrons and novel cassette arrays in bacteria from clinical isolates in China, 2000-2014. *Journal of Biomedical Research* **30**(4):292-303. DOI: 10.7555/JBR.30.20150153

#### Internetadressen:

www.lucigen.com >> EZ-Tn5<sup>TM</sup> Transposase. <https://www.lucigen.com/docs/manuals/MA126E-EZ-Tn5-Transposase.pdf>, zuletzt besucht am 03.02.2019

www.uniprot.org >> B2FUE3\_STRMK. <https://www.uniprot.org/uniprot/B2FUE3>, zuletzt besucht am 03.02.2019

## Erklärung

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

Hamburg, den 4. Februar 2019

---

## Danksagung

In besonderem Maße möchte ich mich bei Herrn Dr. Uwe Mamat für die interessante Themenstellung, sein persönliches Engagement und vor allem die großartige Betreuung bedanken, unter der ich Erfahrungen im wissenschaftlichen Arbeiten sammeln konnte.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Dörte Grella und Herrn Manuel Hein für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und den wertvollen Austausch.

Auch Herrn Prof. Dr. Stefan Noll danke ich, da er mir im Rahmen der externen Betreuung meiner Arbeit mit wertvollen Ratschlägen weiterhalf.

Anschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und das Korrekturlesen bedanken.

