

Aus dem

Department für Diagnostische Labormedizin

Der Universität Tübingen

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**YgfB – ein potentieller Regulator der  $\beta$ -Laktamresistenz  
in einem multiresistenten Stamm von *P. aeruginosa***

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Walter, Elias Johannes**

**2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1.Berichterstatter: Privatdozent Dr. E. Bohn

2.Berichterstatter: Professor C. Stein-Thoeringer

Tag der Disputation: 19.04.2024

# 1 Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis .....	9
2 Einleitung.....	11
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> – ein kurzer Steckbrief.....	11
2.2 Virulenzfaktoren von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	13
2.2.1 Eisenresorptionssysteme.....	13
2.2.2 Exotoxin A .....	14
2.2.3 Typ III Sekretionssystem (T3SS).....	14
2.2.4 Phospholipase C.....	15
2.2.5 Proteasen .....	15
2.2.6 Pyocyanin .....	15
2.2.7 Rhamnolipide.....	16
2.2.8 Typ IV Pili .....	16
2.2.9 Flagellen .....	16
2.3 Zellaufbau und Struktur .....	16
2.4 Epidemiologie.....	17
2.5 Resistenzproblematik.....	18
2.6 Therapiemöglichkeiten .....	18
2.7 Resistenzmechanismen .....	19
2.7.1 Außenmembranpermeabilität von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
2.7.2 Transportsysteme und Effluxpumpen .....	19
2.7.3 Mutationen von Zielstrukturen und beta-Laktamasen .....	20
2.8 YgfB – Stand der Forschung .....	23
2.9 Zielsetzung dieser Arbeit.....	24

3	Material und Methoden .....	25
3.1	Verwendete Materialien.....	25
3.1.1	Geräte.....	25
3.1.2	Verwendete Kits.....	26
3.1.3	Enzyme und Reagenzien.....	27
3.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	28
3.1.5	Chemikalien.....	29
3.1.6	Nährmedien .....	29
3.1.7	Antibiotika .....	30
3.1.8	Puffer .....	30
3.1.9	Verwendete Bakterienstämme.....	31
3.1.10	Verwendete Plasmide.....	34
3.1.11	Oligonukleotide .....	35
3.2	Methoden .....	41
3.2.1	Bakterielle Kultivierungsbedingungen.....	41
3.2.2	Extraktion von Plasmid-DNA.....	41
3.2.3	Extraktion genomischer DNA.....	42
3.2.4	DNA Agarose-Gelelektrophorese .....	42
3.2.5	PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Gibson Assembly 42	
3.2.6	Mango Mix PCR.....	44
3.2.7	Gibson Assembly.....	45
3.2.8	Komplementierung bereits deletierter Gene .....	46
3.2.9	Komplementierung von ID40 $\Delta$ <i>ygfB</i> mit <i>ygfB</i> anderer Spezies .....	48
3.2.10	Herstellung von <i>ampDh3</i> -Luciferase Konstrukten.....	53
3.2.11	$\beta$ -Laktamase Aktivitätstestung.....	55

3.2.12	RNA Extraktion .....	56
3.2.13	DNase-Verdau.....	57
3.2.14	RT-qPCR.....	58
3.2.15	Transkriptomanalyse .....	59
4	Ergebnisse.....	60
4.1	Transkriptomanalyse von ID40 $\Delta ygfB$ im Vergleich mit ID40 Wildtyp..	60
4.1.1	Qualitätskontrolle der RNA .....	61
4.1.2	RNA-Seq Ergebnisse.....	63
4.1.3	Bestätigung der Transkriptomanalyse durch RT-qPCR.....	65
4.2	Untersuchung des Zusammenhangs von <i>ygfB</i> mRNA Expression und der mRNA Expression von <i>ampDh3</i> und <i>ampC</i> .....	72
4.2.1	Untersuchung der <i>ampDh3</i> und <i>ampC</i> mRNA Expression im zeitlichen Verlauf nach Induktion von <i>ygfB</i> mRNA Expression .....	73
4.2.2	Effekte der <i>ampDh3</i> -Deletion in ID40 .....	74
4.3	Charakterisierung der transkriptionellen Regulation von <i>ampDh3</i> .....	77
4.3.1	Generierung von <i>ampDh3</i> -Promotor-Nanoluc Konstrukten unterschiedlicher Länge.....	77
4.3.2	Transformation in <i>Pa</i> ID40 $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB .....	77
4.3.3	Luciferase-Assay zum Nachweis der <i>ampDh3</i> Promotoraktivität in An- und Abwesenheit von YgfB .....	78
4.4	Speziesübergreifender Vergleich von YgfB-Proteinen .....	80
4.4.1	Sequenzhomologie verschiedener YgfB-Proteine in Gram-negativen Bakterien .....	80
4.4.2	Können <i>E. coli</i> und <i>A. baumannii</i> YgfB den Verlust von YgfB in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> komplementieren?.....	80
5	Diskussion .....	82
5.1	Regulation der <i>ampC</i> Expression.....	82

5.2	Die YgfB-AmpDh3-AmpC Achse .....	84
5.3	Tanskriptionelle Regulation des <i>ampDh3</i> Promotors .....	86
5.4	Das <i>alpBCDE</i> cluster.....	89
6	Zusammenfassung .....	90
7	Literaturverzeichnis.....	92
8	Erklärungen zum Eigenanteil .....	99
9	Veröffentlichungen.....	100
10	Danksagung .....	100

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Nachweise von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> am UKT im Jahr 2020 in absoluten Zahlen in unterschiedlichen Materialgruppen.....	17
Abbildung 2 Gibson Assembly.....	45
Abbildung 3 PCR auf <i>A. baumannii</i> und <i>E. coli ygfB</i> .....	47
Abbildung 4 Schematische Darstellung der Komplementierung von ID40 $\Delta ygfB$ mit <i>ygfB</i> mit dem mini-Tn7 System. ....	51
Abbildung 5 RT-qPCR auf <i>gyrB</i> und <i>ygfB</i> der RNA-Proben für die Transkriptomanalyse. ....	62
Abbildung 6 Validierung der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für <i>ygfB</i> , <i>ampC</i> , <i>ampDh3</i> und TUE_ID40_01954 durch RT-qPCR. ....	67
Abbildung 7 Analyse der <i>alpBCDE</i> -Expression über RT-qPCR.....	69
Abbildung 8 Expression von <i>ampD</i> und <i>ampDh2</i> sowie TUEID40_01945 nach Deletion bzw. Komplementierung von <i>ygfB</i> . ....	72
Abbildung 9 Expressionskinetik von <i>ygfB</i> , <i>ampC</i> und <i>ampDh3</i> . qRT-PCR Expressionsanalyse für die Gene <i>ygfB</i> , <i>ampDh3</i> und <i>ampC</i> . ....	74
Abbildung 10 qRT-PCR auf mRNA von <i>ygfB</i> , <i>ampC</i> , <i>ampDh3</i> und TUE_ID40_01954 für die Stämme ID40 WT, ID40 $\Delta ygfB$ , ID40 $\Delta ampDh3$ , ID40 $\Delta ampDh3\Delta ygfB$ . ....	76
Abbildung 11 Analyse des <i>ampDh3</i> Promotors. ....	79
Abbildung 12 Vergleich der Aminosäuresequenzen von <i>Pa</i> ID40 <i>YgfB</i> , <i>E. coli</i> K12 <i>YgfB</i> und <i>A. baumannii</i> <i>YgfB</i> . ....	80
Abbildung 13 Quantifizierung der $\beta$ -Laktamaseaktivität von ID40 Stämmen komplementiert mit <i>ygfB</i> Genen von <i>E. coli</i> und <i>A. baumannii</i> . ....	81
Abbildung 14 Messung der Expression verschiedener Gene von einem mit <i>E. coli ygfB</i> komplementierten <i>Pa</i> ID40 $\Delta ygfB::Rha$ - <i>YgfB Ec</i> -Stamm. ....	82

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Liste verwendeter Geräte .....	25
Tabelle 2 Liste verwendeter Kits .....	26
Tabelle 3 Liste verwendeter Enzyme und Reagenzien .....	27
Tabelle 4 Liste verwendeter Verbrauchsmaterialien .....	28
Tabelle 5 Liste verwendeter Chemikalien .....	29
Tabelle 6 Liste verwendeter Nährmedien .....	29
Tabelle 7 Liste verwendeter Antibiotika .....	30
Tabelle 8 Liste verwendeter Puffer .....	30
Tabelle 9 Liste verwendeter Bakterienstämme .....	31
Tabelle 10 Liste verwendeter Plasmide .....	34
Tabelle 11 Liste verwendeter Primer für qPCR .....	35
Tabelle 12 Liste verwendeten Primer für Klonierung .....	37
Tabelle 13 Primer für Kontroll-PCRs und Sequenzierung.....	39
Tabelle 14 Kapa-Polymerase PCR Ansatz für 10 Reaktionen.....	43
Tabelle 15 PCR Bedingungen.....	43
Tabelle 16 Mango Mix PCR Ansatz .....	44
Tabelle 17 PCR Bedingungen Mango Mix PCR .....	44
Tabelle 18 Mango Mix Zusammensetzung für <i>E. coli</i> SM10 $\lambda$ pir.....	49
Tabelle 19: Mango Mix PCR Bedingungen für <i>E. coli</i> SM10 $\lambda$ pir.....	49
Tabelle 20 Mango Mix PCR Integration in ID40 $\Delta$ ygfB.....	51
Tabelle 21 PCR Programm Mango Mix PCR PCR Integration in ID40 $\Delta$ ygfB .....	52
Tabelle 22 PCR-Fragmentgrößen und Primer zur Herstellung verschiedener <i>ampDh3</i> -Promotor-Luc Reporter Konstrukte .....	54
Tabelle 23 DNase-Verdau Mastermix .....	57
Tabelle 24 Mastermix RT-qPCR .....	58
Tabelle 25 RT-qPCR .....	59
Tabelle 26 Ergebnisse der Differentialexpressionsanalyse .....	64
Tabelle 27 Vergleich der Transkriptomanalyse und ihrer Validierung über RT-qPCR für die Gene <i>ampC</i> , <i>ampDh3</i> und TUE_ID40_01954 .....	68
Tabelle 28 Vergleich der Transkriptomanalyse und RT-qPCR, <i>alp</i> -Cluster und TUEID40_01945.....	71

## Abkürzungsverzeichnis

<i>Ab ygfB</i>	<i>Acinetobacter baumannii ygfB</i>
ABS	AlpA Bindestelle
ADP	Adenosindiphosphat
Anhyd-MurNAc	Anhydro-N-Acetyl-Beta-D-Muramate
Anhyd-MurNAc-tripeptid	Anhydro-N-Acetyl-Beta-D-Muramate + Tripeptid
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
CDS	Coding Sequence
<i>C. elegans</i>	Caenorhabditis elegans
CF	Cystische Fibrose
Cp	Crossing point
<i>dacB</i>	D-Alanyl-D-Alanine Carboxypeptidase Gen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>Ec ygfB</i>	<i>E. coli ygfB</i>
ECL	Enhancer Chemoluminescence
ESBL	Extended Spectrum $\beta$ -Lactamase
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
Flp	Flippase
FRT	Flippase Recognition Target
GC	Guanosin Cytosin
gDNA	Genomische DNA
Glc-NAc-1,6-anhydro-MurNAc	N-Acetyl-Beta-D-Glucosamine-1,6- Anhydro-N-Acetyl-Beta-D-Muramate
GST	Gluthation-S-Transferase

H2-T6SS	H2-Typ-6-Sekretionssystem
IgG	Immunglobulin G
IMP	Active-on-Imipenem (Carbapenemase)
MB	Megabasenpaare
MDR	Multi-Drug-Resistant
MCS	Multiple Cloning Site
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRGN	Multiresistente Gram-Negative Bakterien
mRNA	Messenger RNA
NCCT	NGS Competence Center Tübingen
NGS	Next Generation Sequencing
OD	Optical Density
OXA	Oxacillinase (Carbapenemase)
<i>Pa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBPx	Penicillinbindeprotein x
PCR	Polymerase Chain Reaction
pFlp2	Plasmid mit Flippase, MCS und Resistenzmarker
pTNS3	Helferplasmid mit Transposasefunktion
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
qPCR	Quantitative PCR
Rha	Rhamnose
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	Ribonukleinsäure-Sequenzierung (Transkriptomanalyse)
RT-qPCR	Reverse Transkriptase-quantitative PCR

<i>sacB</i>	Kodierendes Gen für Levansucrase
SD	Standardabweichung
SOC	Superoptimal Broth With Catabolite Suppression
TBE	Tris-Borate-EDTA
Temp	Temperatur
Tn7	Transposase 7
tR	Terminatorregion
TraDIS	Transposon Directed Insertion Sequencing
T3SS	Typ3 Sekretionssystem
<i>ubiH, ubiI</i>	Koenzym Q Synthese Gene
UDP-MurNAc-pentapeptid	UDP-N-acetylmuramyl- Pentapeptide
VIM	Vereona-Integron-Mediated- Metallo- $\beta$ -Lactamase
WT	Wildtyp

## 2 Einleitung

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa* – ein kurzer Steckbrief

*Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) ist ein Gram-negatives Stäbchenbakterium aus der Klasse der  $\gamma$ -Proteobakterien. Erstmals beschrieben wurde es durch Schröter 1872 als „*Bacterium aeruginosum*“, auch bekannt als „*Pseudomonas pyocyanea*“ [1] oder „*Pseudomonas polycolor*“. Dies ist bereits ein Hinweis auf das variable und vielfarbige koloniemorphologische Erscheinungsbild des Keims sowie die Fähigkeit zur Bildung der Farbpigmente Pyocyanin, Pyoverdin, Pyorubin und Pyomelanin. Diese Farbpigmente haben toxische Eigenschaften, sind wichtige Virulenzfaktoren und spielen eine entscheidende Rolle in der Konkurrenz von *Pa* mit anderen Bakterien, etwa um eine Nische zu besiedeln

[2]. *Pa* ernährt sich überwiegend durch oxidative Verstoffwechslung von Acetat bzw. Fettsäuren sowie Aminosäuren und Phosphatidylcholin durch Spaltung von Surfactant während einer Infektion [3]. Die Aufnahme von Eisen erfolgt bei einer Infektion beispielsweise aus Hämoglobin [4]. Ob der Bedarf an Proteinen und Aminosäuren ebenfalls durch eine Aufnahme aus der Umgebung nach der Lyse anderer Bakterien bzw. aus den Überresten eukaryontischer Zellen z.B. bei Besiedelung oder Infektion gewonnen werden kann, ist unklar. *Pa* bedient sich außerdem der Protease Elastase in Form der Enzyme LasA [5] und LasB [6], welche zur Spaltung von Elastin benötigt werden und der alkalischen Protease [7]. Alle drei spielen eine wichtige Rolle als Virulenzfaktoren bei der Invasion und Besiedelung von Wirtszellgewebe und der Etablierung von Infektionen [8]. Ein Hauptmerkmal von *Pa* sind seine geringen Ansprüche an die Verfügbarkeit von Nährstoffen und seine Robustheit gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen. Bevorzugt wächst der Erreger in feuchten Habitaten, wie z.B. Pfützen, Kanalisationen, Medizinprodukten und den Menschen kolonisierend, z.B. in der Lunge bei cystischer Fibrose (CF) oder im Gastrointestinaltrakt [9-17]. Resistenz gegen Austrocknung wird durch die ausgeprägte Eigenschaft zur Bildung von Biofilmen durch die Produktion von Alginate gewährleistet. Der Biofilm schützt das Bakterium auch vor Zellen des menschlichen Immunsystems [18]. Ein weiteres Merkmal ist der oft als lindenblütenartig bezeichnete Geruch. Bei der Identifikation im mikrobiologischen Labor dient dieser Geruch, sowie der auf Blutagar häufig zu beobachtende, regenbogenartige Glanz durch Reflektion des Lichts und der enzymatische Nachweis von Oxidase als Merkmal. Die Anzucht des Keims ist unter aeroben Bedingungen in Flüssig- und Festnährmedien möglich, häufig verwendet werden bluthaltige Nährmedien, Selektivmedien für Gram-negative Stäbe oder LB Medium.

Im medizinischen Bereich ist *Pseudomonas aeruginosa* v.a. als typischer, oft schwierig zu therapierender Krankenhauskeim bekannt. Gerade in sensiblen Bereichen wie den Intensivstationen stellt er die Behandler und Hygienebeauftragten vor Herausforderungen, da insbesondere beatmete Patienten ein erhöhtes Risiko für eine Infektion aufweisen [19, 20]. Atemwegsinfekte stellen daher eine der häufigsten Infektionen mit *Pseudomonas*

*aeruginosa* dar, im besonderen Fall des UKT im Jahr 2020 zeigten sich eine höhere Anzahl an Keimnachweisen nur im Urin, mutmaßlich bei Harnwegsinfektionen (s. **Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.**). Diese beiden Entitäten haben das Potential in lebensbedrohliche systemische Infektionen überzugehen [21, 22]. Ebenfalls nicht unerheblich ist das Vorkommen von *Pseudomonas aeruginosa* bei nicht intakter Hautbarrierefunktion, z.B. bei Verbrennungspatienten oder chronisch-ulzerierenden Wunden bei Diabetes mellitus [23, 24]. Etwas seltener sind Infektionen im Bereich des Ohrs, auch als Badeotitis bekannt und verursacht durch kontaminierte Wasseranlagen, bzw. bei Diabetikern als Otitis externa maligna oder chronischen Infektionen des Ohrs [25-27]. Als Kontaminant von Kontaktlinsenflüssigkeit kann *Pseudomonas aeruginosa* auch eine Keratitis und tiefergehende okuläre Infektionen hervorrufen [28]. Zwei besondere Patientengruppen stellen zum einen immunsupprimierte Patienten, z.B. aus der Hämatookologie, oder mit rheumatologischen Grunderkrankungen dar, welche ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung lebensbedrohlicher Infektionen tragen [29-31]; sowie Patienten mit zystischer Fibrose, verursacht durch den verminderten Mukustransport im bronchoziliären System. Gerade Stämme mit einer sehr stark ausgeprägten Fähigkeit zur Biofilmbildung sind hierfür prädisponierend [32]. Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* ist bei dieser Patientengruppe lange ein sehr ungünstiger prognostischer Marker gewesen [33-35].

## **2.2 Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa***

*Pa* ist ein sehr erfolgreiches Pathogen, welches verschiedenste Infektionen hervorrufen kann. Dafür ist *Pa* mit zahlreichen zellassozierten und auch sekretierten Faktoren ausgestattet, die z.B. eine Kolonisierung des Wirtes ermöglichen, eine Evasion des Immunsystems des Wirtes vermitteln und *Pa* erlauben, erfolgreich mit anderen Besiedlern von Nischen zu kompetitieren. Im Folgenden sollen einige dieser Virulenzmechanismen kurz beschrieben werden.

### **2.2.1 Eisenresorptionssysteme**

Pyoverdin und Pyochelin dienen *Pa* zur Aufnahme von dreiwertigem Eisen aus der Umgebung. Sie haben unterschiedlich Affinität zu den Eisenionen. Nach

Bindung der Eisenmoleküle werden sie vom Keim wieder aufgenommen [36, 37]. Die Aufnahme von zweiwertigem Eisen erfolgt über den Eisentransporter FeoABC direkt über die äußere Membran in die Zelle [38]. Die Freisetzung von Eisen bewirkt das Bakterium unter anderem auch durch die Hämolyse von Erythrozyten und die Zersetzung des Hämoglobins [4].

### 2.2.2 Exotoxin A

Zur Invasion eukaryontischer Organismen und der Auseinandersetzung mit dem Immunsystem bedient sich *Pa* unterschiedlicher Exotoxine. Das am längsten bekannte ist das Exotoxin A. Dieses wirkt durch Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 mittels ADP, was die Proteinbiosynthese durch Hemmung der Translokation im Ribosom in der Wirtszelle stilllegt. ExoA Sekretion verursacht Zelltod und verringert die Immunantwort [39].

### 2.2.3 Typ III Sekretionssystem (T3SS)

Ein wichtiger Faktor für die Virulenz von *Pa* ist sein Typ3-Sekretionssystem (T3SS). T3SS sind injektionsnadelähnliche Proteinkomplexe, durch die die Effektorproteine ExoY, ExoT, ExoS und ExoU in Wirtszellen injiziert/transloziert werden. Während alle *Pa* Stämme, die ein T3SS System besitzen, ExoY und ExoT sekretieren, unterscheidet man Stämme die entweder ExoU (PA14-Typ) oder ExoS (PAO1-Typ) besitzen. Akute Infektionen in Präsenz des T3SS führen zu einem schlechteren klinischen Verlauf [40, 41]. Es gibt allerdings noch eine dritte Gruppe (PA7-Typ) von *Pa* Stämmen, die anstatt eines T3SSs das Exolysin ExlA besitzen [42].

ExoS und ExoT bestehen aus zwei funktionellen Einheiten. Zum einen aus einer ADP-Ribosylase, welche bei der Verhinderung von Phagozytose durch Granulozyten eine wichtige Rolle für die Virulenz von *Pa* spielt. Zum anderen besitzen die Toxine eine G-Protein aktivierende Domäne, welche direkt das Aktinzytoskelett der Zelle beeinflusst [43]. ExoS verursacht Zytoskelettveränderungen, Zellteilungsarrest und den Verlust des Zell-Zellkontaktes. ExoU wirkt dagegen als Phospholipase. Es wird wie die anderen Enzyme in die Zielzelle transferiert und greift dort die Zellmembran an, was zur Lyse der Zelle führen kann [44].

#### 2.2.4 Phospholipase C

Für die Invasion in Lungengewebe bedient sich *Pa* der Phospholipase C, wahrscheinlich zur Spaltung des Surfactants der Lunge [45]. Phospholipase C dient möglicherweise auch als Virulenzfaktor bei Blutstrominfektionen und Harnwegsinfektionen [46].

#### 2.2.5 Proteasen

*Pa* verwendet mehrere extrazellulär sekretierte Proteasen. So besitzt *Pa* die Enzyme Elastase, eine alkalische Protease und weitere, funktional nicht näher differenzierte Proteasen. Zunächst wurden diese für eine Art „biochemischer Türöffner“ zum befallenen Wirtsorganismus gehalten. Man unterscheidet bei *Pa* die Enzyme LasA und LasB. LasA funktioniert mittels Spaltung der Aminosäuresequenz an einem Serinbaustein. LasB funktioniert als Zink-Metalloprotease. LasB ist auch in der Lage, tierische Eiweiße wie z.B. Casein zu spalten. Zudem können Proteasen Immunglobuline inaktivieren [47]. Letztlich ist die pathogenetische Relevanz der Proteasen bei einer Infektion durch *Pa* nicht endgültig geklärt [6].

#### 2.2.6 Pyocyanin

Pyocyanin wird von *Pa* bei einer Infektion der Lunge freigesetzt und unterstützt die Invasion des Erregers durch Herabsetzung der Zilienfunktion des respiratorischen Epithels und den dadurch verringerten Transport des Alveolarsekrets [48]. Wie in Tiermodellen gezeigt werden konnte, ruft Pyocyanin bei längerer Exposition eine Immunantwort hervor, zudem führt es zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten [49]. Die Zellschädigung durch Pyocyanin erfolgt durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen [50]. Außerdem führt Pyocyanin zur vermehrten Produktion von schleimbildenden Glykoproteinen, welche unter normalen Bedingungen die Infektabwehr unterstützen [51]. Bei Pyocyanin-induzierter Überproduktion können diese allerdings eine Infektion sogar begünstigen [52]. Ein weiterer Effekt ist eine antibakterielle Wirkung auf umgebende Keime, welcher *Pa* unter Umständen bei der interbakteriellen Konkurrenz mit der schützenden Standortflora des Menschen einen Vorteil verschaffen könnte [45].

### 2.2.7 Rhamnolipide

Rhamnolipiden werden die Phagozytose durch Makrophagen inhibierende Eigenschaften zugeschrieben. Bei respiratorischen Infektionen scheinen Sie für den Erreger von enormer Wichtigkeit zu sein, da in Experimenten gezeigt werden konnte, dass Rhamnolipide die Zilienbewegung verringern oder zum Erliegen bringen können [53].

### 2.2.8 Typ IV Pili

Typ IV Pili ermöglichen *Pa* das Anhaften an eukaryontische Zielzellen bei der Infektion des jeweiligen Wirtsorganismus. Durch Synthese und folgende Retraktion erfolgt eine kriechförmige Bewegung in Richtung des Anheftungspunktes. Im angloamerikanischen Sprachraum wird diese Fortbewegungsart auch als „Twitching-motility“ bezeichnet [54].

### 2.2.9 Flagellen

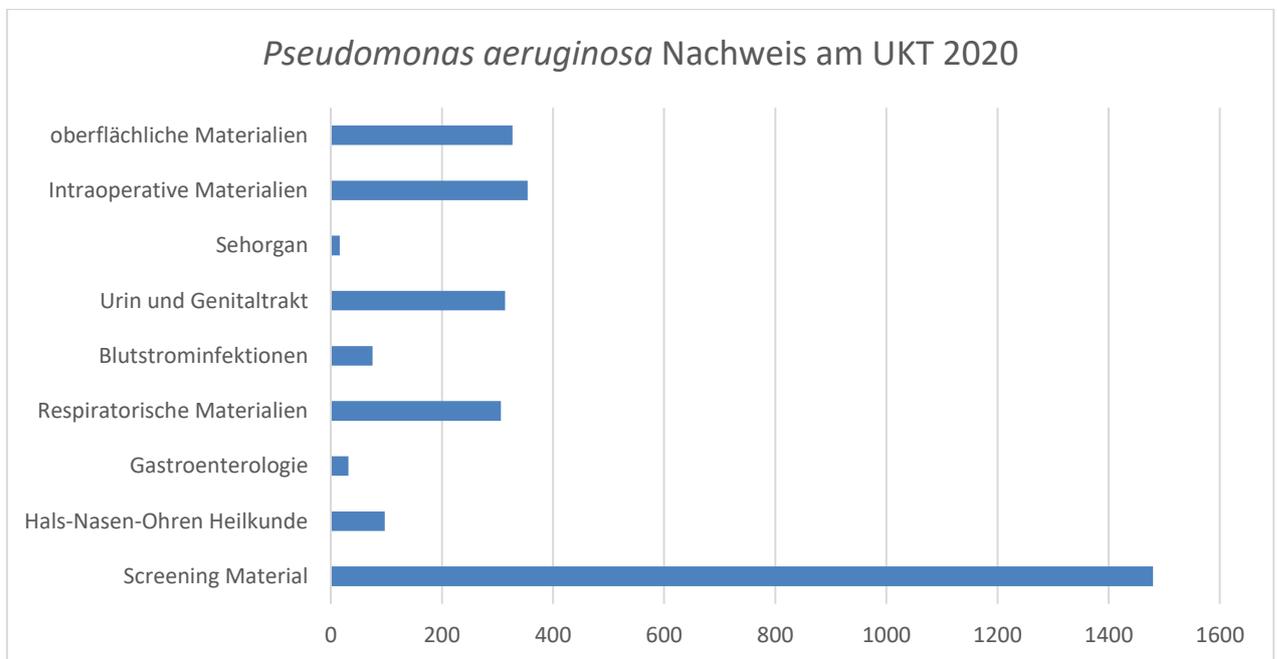
*Pa* ist an einem Zellpol mit Flagellen begeißelt. Diese in der Membran verankerten Proteinstrukturen benutzt *Pa* kreisförmig rotierend, um sich schwimmend fortzubewegen. Zudem scheint die Fortbewegung mit der Expression des Typ VI-Sekretionssystems verbunden zu sein [55].

## 2.3 Zellaufbau und Struktur

*Pa* besitzt als Gram-negatives Bakterium im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien eine dünnere Schicht aus Peptidoglykan und Murein, hat dafür aber noch eine äußere Membran. Diese besteht aus Phospholipiden, darin verankerten Lipopolysacchariden (LPS) und Porinen, sowie Lipoproteinen, welche in ihrer Gesamtheit die Permeabilität der Membran bestimmen [56]. Besonders wichtig für die Durchlässigkeit der Membran und damit die Aufnahme von Nährstoffen oder auch die Permeabilität für Antibiotika sind die so genannten Porine. Beispiele hierfür sind OprF, welches zur Eisenaufnahme dient und auch zu der Strukturhaltung der Zelle, da es quantitativ als häufigster Proteinbestandteil der Außenmembran vorkommt, sowie OprD, OprQ, OprB und OprE. OprE ist für das Überleben gerade auch unter anaeroben Bedingungen extrem wichtig für den Organismus [57].

## 2.4 Epidemiologie

Das Auftreten von Infektionen assoziiert mit *Pa* deutschlandweit beläuft sich laut RKI auf 67.647 Fälle im Jahr 2020 und damit stehen diese immerhin an sechster Stelle der häufigsten bakteriellen Erreger [58]. Zum Vergleich liegt die Anzahl an Nachweisen von *Pa* am Universitätsklinikum Tübingen, einem Krankenhaus der Maximalversorgung im südwestdeutschen Raum bei 3.111 Keimnachweisen in Patientenmaterialien im Jahr 2020 (s. **Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.**). Schaut man sich hierbei die Aufteilung auf die unterschiedlichen Infektionslokalisationen an, wird erkennbar, dass die häufigste Entität Besiedlungsnachweise im Rahmen von Screenings auf MRGN sind. Diese werden gefolgt von intraoperativen Materialien, Materialien des Urogenitaltrakts sowie respiratorischen Materialien und an vierter Stelle Materialien aus dem Fachbereich der Hals-Nasen-Ohren Heilkunde (s. **Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.**). Für die wichtigen Antibiotikaklassen bezüglich der MRGN-Einteilung nach KRINKO zeigen sich die im Zeitraum 2020 untersuchten Isolate resistent für Piperacillin (14 %), Ceftazidim (7 %), Cefepim (6 %), Ciprofloxacin (11 %), Meropenem (5%) und Imipenem (9 %).



**Abbildung 1** Nachweise von *Pseudomonas aeruginosa* am UKT im Jahr 2020 in absoluten Zahlen in unterschiedlichen Materialgruppen. Die Erhebung erfolgte mittels Swisslabstatistik und Excel mit freundlicher Genehmigung von Dr. Marschal (Institut f. Mikrobiologie und Hygiene Tübingen; Abteilung Diagnostik).

Dies unterscheidet sich etwas von den Zahlen im bundesweiten Kontext bzw. der Vereinigten Staaten von Amerika. Hier geht man von 32.600 nosokomialen *Pa* Infektionen pro Jahr mit einem Anteil von ca. 6.000 mehrfach resistenten Keimen gegenüber wichtigen Antibiotikaklassen aus [59]. Im europäischen Kontext gibt es eine Hochrechnung, welche von 9.028 Infektionen mit multiresistenten *Pa* Stämmen pro Jahr ausgeht [60].

## 2.5 Resistenzproblematik

Die schwerwiegendste Problematik entsteht bei *Pa*-Infektionen im Zusammenhang mit dem medizinischen System, den sogenannten „nosokomialen Infektionen“. Bakterien sind in dieser Umgebung durch häufigen Einsatz von Antibiotika oft gegenüber vielen gebräuchlichen Antibiotika resistent. Dies limitiert die Therapierbarkeit stark, sodass Experten der WHO bereits eine „postantibiotische Ära“ prognostizieren [61]. Auf der ebenfalls durch die WHO veröffentlichten Liste der Keime, für die am Dringlichsten neue antibakterielle Therapeutika benötigt werden, stehen Carbapenem-resistente *Pa* mit an oberster Stelle, zusammen mit *Acinetobacter baumannii* und *Enterobacterales*. Neben Carbapenemen ist auch die Resistenz gegenüber der Gruppe der Cephalosporine der 3. Generation bei diesen Keimen ein Problem [62]. Bei einem Aufkommen von 400.000 - 600.000 nosokomialen Infektionen pro Jahr in Deutschland versterben davon zwischen 10.000 und 20.000 Patienten [63].

## 2.6 Therapiemöglichkeiten

Aktuelle Therapieregime zur Behandlung von MDR-Bakterienstämmen beinhalten oft die Kombination von Substanzen aus der Gruppe der Carbapeneme mit dem Reserveantibiotikum Colistin, welche einen über die Wirkung der Einzelsubstanzen hinausgehenden synergistischen Effekt aufweist [64]. Auch ältere Substanzen wie Fosfomycin werden in Kombinationstherapie zur Behandlung von schweren Infektionen mit multiresistenten Erregern eingesetzt, ebenso wie die Gruppe der Aminoglykoside [65, 66]. Aktuelle neuere Substanzen stellen die Kombination der Cephalosporine Ceftazidim mit dem neuen Betalaktamaseinhibitor Avibactam, sowie Ceftolozan mit Tazobactam dar. Die neueste zugelassene Substanz ist das Siderophor-Cephalosporin

Cefiderocol, welches via Siderophorrezeptor in die Bakterienzelle gelangt, um dort die Hemmung von Penicillin Bindeprotein 3 zu bewirken, was den häufigen Resistenzmechanismus der Impermeabilität der Bakterienzelle durch verminderte Expression von Außenmembranproteinen umgehen kann [67].

## **2.7 Resistenzmechanismen**

### **2.7.1 Außenmembranpermeabilität von *Pseudomonas aeruginosa***

Die Permeabilität der äußeren Membran von *Pa* ist wesentlich geringer als bei vielen anderen Bakterien, wie bspw. *Escherichia coli* [68, 69]. Diese Durchlässigkeit wird durch sogenannte Porine, Kanalproteine in der Zellmembran, welche den selektiven Durchtritt unterschiedlicher Moleküle wie z.B. Glucose, Phosphat und verschiedener Aminosäuren regulieren, bestimmt. Die Porine OprD, OpdF, OpdK und OpdO ermöglichen den Antibiotika Imipenem, Meropenem, Cefotaxim und Gentamicin das Eindringen in die Bakterienzelle [70]. OprH bewirkt durch vermehrtes Vorkommen in der äußeren Membran dagegen Resistenz gegenüber Polymyxin B [71]. Eine Veränderung der Permeabilität der äußeren Membran von *Pa* ist verantwortlich für die Resistenzentwicklung gegenüber zahlreichen Antibiotika. So verhindert das Bakterium, dass Antibiotika Ihre Zielstruktur in ausreichender Konzentration erreichen und binden und somit ihre Wirkung entfalten können.

### **2.7.2 Transportsysteme und Effluxpumpen**

Neben den Porinen sorgen zusätzlich aktive Transportsysteme für die Entfernung von Antibiotika und anderen toxischen Substanzen aus dem Bakterium. Dies sind im Wesentlichen Transportsysteme der Klassen ABC, RND und MATE [72]. Die Transportsysteme dienen den Bakterien als Schutz vor toxischen Metaboliten, neben Antibiotika auch Farbstoffen, Lösungsmitteln, Schwermetallen oder Gallensalzen [73, 74]. In *Pa* sind für den Export von Antibiotika die Enzyme der RND-Familie am relevantesten [75, 76]. RND bedeutet „resistance nodulation division“ [77]. Mex-AB-OprM ist ein Transporter aus dieser Familie, welcher zahlreiche Antibiotika als Substrat verwendet. Eine synergistische Wirkung zusammen mit AmpC gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika wird diskutiert [78]. Neben diesem wurden auch die Effluxpumpen MexXY-OprM/A und MexCD-OprJ und

MexEF-OprN als verantwortlich für eine erhöhte Resistenz gegenüber einigen antibakteriellen Substanzen *in vitro* beschrieben [75].

### 2.7.3 Mutationen von Zielstrukturen und beta-Laktamasen

Eine weitere Strategie der Resistenzentwicklung ist die Veränderung des Angriffspunkts der antibakteriellen Substanz. So kann *Pa* beispielsweise durch PBP3-Mutationen eine Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika entwickeln [79]. Des Weiteren wird Resistenz durch das Vorhandensein von antibiotikaspaltenden Enzymen vermittelt. Es existieren hier unterschiedliche Klassen von Enzymen, die nach ihrer Substratspezifität unterschieden werden. Die Gruppe der  $\beta$ -Laktamantibiotika ist Ziel der bakteriellen  $\beta$ -Laktamasen, Enzymen, welche die Spaltung des  $\beta$ -Laktamrings vermitteln und somit die hemmende Wirkung auf das Peptidoglykangerüst unterbinden [80]. Hierbei unterscheidet man mehrere strukturelle Klassen [81]. Die Ambler Klasse B umfasst Zink-Metallo- $\beta$ -Laktamasen wie beispielsweise VIM und IMP, wohingegen die Klassen A, C und D als Serinproteasen ihre enzymatische Aktivität entfalten. Die Klasse A beschreibt Penicillinasen und die Extended Spectrum  $\beta$ -Laktamasen, Klasse D Oxacillinasen und die Klasse C die Cephalosporine spaltende Gruppe der *ampC*  $\beta$ -Laktamasen [82]. Diese können chromosomal oder auf mobilen genetischen Elementen kodiert sein [83].

Die chromosomal kodierte  $\beta$ -Laktamase AmpC wird in relativ geringen basalen Mengen in *Enterobacterales* exprimiert, kann aber durch einen komplexen katabolen Pfad, der eng mit dem Zellwandrecycling verlinkt ist, induziert werden [84]. Der Stimulus für *ampC* Induktion ist die Exposition mit Antibiotika. Die hydrolysierbaren Antibiotika Cefotaxim, Ceftriaxon, Ceftazidim, Piperacillin und Aztreonam sind schwache *ampC* Induktoren. Amoxicillin, Cefoxitin und Imipenem gelten dagegen als starke *ampC* Induktoren [85, 86].

Um die Regulation der *ampC* Expression verstehen zu können, wird hier kurz und vereinfacht auf das Peptidoglykan-Recycling eingegangen. Durch die hohe Zellteilungsrate wird häufig die Zellwand erneuert. Hierbei werden Katabolite wie z.B. Glc-NAC-1,6-anhydro-N-acetylmuramyl-tripeptide (GlcNaC-AnhydMurNAc-Triptide) über die Permease AmpG vom Periplasma in das Zytoplasma

transportiert. GlcNaC-AnhydMurNAc-tripeptid wird durch das Enzym NagZ in AnhydMurNAc-Tripeptid umgewandelt. Im Weiteren kann AnhydMurNAc-Tripeptid durch die Amidase AmpD in AnhydMurNAc und Peptid gespalten werden. Durch viele weitere katabole Schritte entsteht dann als Grundbaustein für die Zellwandsynthese UDP-MurNAc-Pentapeptid. UDP-MurNAc-Pentapeptid wird dann in einem komplexen Prozess wieder in das Periplasma transportiert und zum Einbau in die Zellwand verwendet. Das im Zytoplasma vorliegende Verhältnis zwischen AnhydMurNAc-Peptiden und UDP-MurNAc-Pentapeptid hat einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation von AmpC [87].

AnhydMurNAc-Peptide und UDP-MurNAc-Pentapeptid können kompetitiv an den transkriptionellen Regulator AmpR binden [88]. Während UDP-MurNAc-Pentapeptid die Aktivität von AmpR hemmt und somit die Expression von *ampC*, aber auch anderer Gene, die z.B. mit Virulenz, Fluorchinolonresistenz und Biofilmbildung verknüpft sind, beeinflusst, kann AnhydMurNAc-Peptid kompetitiv UDP-MurNAc-Pentapeptid verdrängen, und so die Aktivität von AmpR steigern [89, 90]. Dies führt dann zur erhöhten *ampC* mRNA Expression [91, 92].

Zudem können Mutationen in AmpR selbst zu vermehrter *ampC*-Aktivität führen [93]. Die häufigsten Mutationen, die zu einer Hyperproduktion von AmpC führen, kommen in den Genen *dacB* und *ampD* vor [94, 95]. Das *dacB* Gen kodiert für das „Low molecular mass (LMM)-Penicillin binding protein (PBP4). PBP4 ist eine Acylserintransferase und D,D-Carboxypeptidase. Die Inaktivierung von PBP4 durch Antibiotika oder *dacB* Punktmutationen führt zum Verlust der Enzymaktivität. Dies führt zu einer Anreicherung von AnhydMurNAc-Pentapeptid im Zytoplasma [89]. AnhydMurNAc-Pentapeptid aktiviert laut Torrens et al. [89] AmpR wesentlich stärker als AnhydMurNAc-Tripeptid. Der hier in der Studie verwendete Stamm ID40 trägt eine Punktmutation im *dacB* Gen, die zur Inaktivität von PBP4 führt und zu AmpC Hyperproduktion und damit zu einem multiresistenten Stamm [94].

Neben *dacB*-Mutationen führen häufig auch Mutationen im *ampD* Gen zu Hyperresistenz [96]. Da AmpD AnhydMurNAc-Peptid in AnhydMurNAc und Peptid spalten, kommt es bei einer *ampD* Deletion zu einer Anreicherung von

AnhydMurNAc-Peptid und somit zu einer erhöhten AmpC Produktion. AmpD besitzt 2 paraloge Enzyme: AmpDh2 und AmpDh3. AmpDh2 und AmpDh3 sind ebenfalls in der Lage AnhydMurNAc-Peptid in AnhydMurNAc und Peptid zu spalten, zeigen aber eine wesentlich höhere Affinität gegenüber langkettigen Peptidoglycanen. [97]. AmpDh2 scheint im Periplasma an der Innenseite der äußeren Membran lokalisiert zu sein [98]. Für AmpDh3 wurde dies auch vermutet [97], aber jüngere Studien zeigen, dass AmpDh3 im Zytoplasma lokalisiert ist [99, 100]. Anreicherung von AnhydMurNAc-Peptiden und AmpC-Hyperproduktion kann durch zusätzlich Deletion von *ampDh2* oder *ampDh3* oder noch mehr durch Deletion aller drei paralogen Gene gesteigert werden [101].

Aufgrund der ansteigenden Multiresistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam Antibiotika werden Strategien gesucht, solche MDR-Stämme wieder sensitiv für die Behandlung mit Antibiotika zu machen. Dies ist im Falle von bestimmten  $\beta$ -Laktamasen mit entsprechenden Enzyminhibitoren wie bspw. Clavulansäure möglich. Ein anderer Weg ist der Versuch, durch Inhibition eines Proteins welches im Peptidoglykan-Recycling von Bedeutung ist, die *ampC* Expression wieder zu reduzieren. Eine Möglichkeit wäre z.B. die Inhibition von AmpG und NagZ. Studien zeigen, dass die Deletion von *ampG* oder *nagZ* tatsächlich zu einer verbesserten Sensitivität für eine Therapie mit  $\beta$ -Laktam Antibiotika führt [102-104].

Um weitere Gene, welche in Zusammenhang mit einer Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam Antibiotika stehen, zu finden, ist ein möglicher Ansatz, durch ein nahezu das gesamte Genom erfassendes „Transposon-Directed-Insertion-Sequencing“ (TraDIS) diese Gene zu identifizieren. Dies wurde für den multiresistenten *Pa* Stamm ID40 durchgeführt [105]. Der Stamm ID40 ist charakterisiert durch Resistenzen für die  $\beta$ -Laktamantibiotika Piperacillin ( $\pm$  Tazobactam), Ceftazidim, Cefepim, Imipenem und Aztreonam. Die MHK für Meropenem ist erhöht, allerdings ist der Stamm nicht resistent nach EUCAST. Für die Fluorchinolone Ciprofloxacin und Levofloxacin liegen ebenfalls Resistenzen vor. Genomisch verankerte Resistenzen finden sich auf dem 6,86 MB umfassenden Chromosom für die  $\beta$ -Laktamasen OXA und AmpC, sowie für Fosfomycin.

Außerdem konnte eine Punktmutation im *dacB* Gen gefunden werden. Dies führt über dysfunktionales PBP4 zu vermehrter *ampC* Expression [94]. Im Gegensatz zu anderen  $\beta$ -Laktamasen besitzt *ampC* die Eigenschaft, nicht auf klassische  $\beta$ -Laktamaseinhibitoren wie beispielsweise Tazobactam oder Clavulansäure anzusprechen [93]. Bei dem von Sonnabend/Klein et al. [105] durchgeführten „Transposon-Directed Insertion Sequencing“ (TraDIS) zeigten sich einige nicht-essentielle Gene, welche für ein Überleben des Stamms ID40 in Anwesenheit der Breakpoint-Konzentrationen (nach EUCAST) der Antibiotika Meropenem und Cefepim benötigt werden. Hier fanden sich Gene wie *ampG*, *nagZ* und *mltG* sowie *ampC*, von denen bekannt war, dass sie zur Resistenz beitragen. Auch weitere, im Recyclingprozess von Peptidoglykan involvierte Enzyme, wie beispielsweise AmgK, oder die Endopeptidase MepM1, von denen eine Beteiligung an der Resistenz bis dato nicht bekannt war, wurden identifiziert [105]. Darüber hinaus wurde ein Protein mit bisher unbekannter Funktion identifiziert, welches von den Autoren als YgfB (TUEID40\_03245) bezeichnet wurde. Eine phänotypische Resistenztestung mittels „Mikro Boullion Dilution“ zeigte eine Resensibilisierung einer *ygfB*-Mutante für Aztreonam und Cefepim. Weitere Experimente mit einer Deletionsmutante für *ygfB* zeigten eine verringerte  $\beta$ -Laktamaseaktivität (Nachweis über Quantifizierung des Nitrocefinumsatzes) sowie eine verringerte Expression von *ampC* (Nachweis über RT-qPCR). Somit muss YgfB eine Funktion ausüben, welche Resistenz gegenüber der Gruppe der  $\beta$ -Laktam Antibiotika vermittelt. Wie dies allerdings genau geschieht, ist bisher völlig ungeklärt, aber aufgrund der Zunahme an Resistenzen gerade gegenüber der eher gut verträglichen Gruppe der  $\beta$ -Laktame von großem Interesse, da neue Zielstrukturen für antibakterielle Substanzen dringend benötigt werden.

## 2.8 YgfB – Stand der Forschung

Das Gen TUEID40\_03245 wurde YgfB benannt, weil es in *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Legionella pneumophila* oder *Haemophilus influenzae* homologe Gene gibt. Es ist zugehörig zur Proteinfamilie UPF0149. Das *ygfB* Gen von *Pa* liegt in einem Operon mit den Genen *pepP*, *ubiH*, TUEID40\_03242 (genannt PA14\_68970 in PA14) und *ubil*. Diese Operonstruktur findet man häufig, aber in

der Regel fehlt TUEID40\_03242. Das Gen *pepP* kodiert hierbei für eine Aminopeptidase. In einem *Pa C. elegans* Infektionsmodell konnte gezeigt werden, dass PepP mit Virulenz assoziiert ist [106]. Ubi H (2-octaprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase) and Ubi I (2-octaprenylphenol hydroxylase) sind Proteine, die an der Ubichinon-Biosynthese beteiligt sind [107]. Ubichinon, auch Coenzym Q genannt, ist am respiratorischen Elektronentransport beteiligt und spielt eine zentrale Rolle in Energie erzeugenden Prozessen [108]. TUEID40\_03242 kodiert für ein hypothetisches Protein mit bisher unbekannter Funktion.

Über die Funktion von YgfB ist weder in *Pa* noch in anderen Bakterien bis dato etwas bekannt. Die einzigen Anhaltspunkte, was dieses Protein bewirkt, sind somit eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam Antibiotika durch eine Erhöhung der *ampC* Expression und erhöhte AmpC- $\beta$ -Laktamase Aktivität. Wie dies funktioniert, war allerdings völlig unklar.

## 2.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, neue Erkenntnisse über die Funktion von YgfB in *Pa* zu erlangen. Hierzu sollte zunächst eine Transkriptomanalyse mittels RNA-Seq des WT Stammes ID40 im Vergleich zu einer *ygfB* Deletionsmutante ID40  $\Delta ygfB$  durchgeführt werden, um herauszufinden, welche Gene für die YgfB-vermittelte Wirkung auf die *ampC* Expression verantwortlich sein könnten. Eine Überprüfung der hierbei gefundenen Gene sollte mittels RT-qPCR erfolgen. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob ein funktionaler Zusammenhang zwischen der veränderten Expression der gefundenen Kandidaten-Gene und der Expression von *ygfB* bzw. *ampC*-Expression besteht. Des Weiteren sollte herausgefunden werden, wie YgfB Einfluss auf die in Ihrer Expression veränderten Gene nimmt. Hierzu sollte eine Charakterisierung der Promotorelemente der in Frage kommenden Gene dienen. Wie bereits erwähnt, wurde YgfB nach homologen Genen in anderen Spezies Gram-negativer Bakterien benannt. In der vorliegenden Arbeit sollte weiterhin untersucht werden, wie homolog die Sequenzen von *E. coli ygfB* und *A. baumannii ygfB* mit *ygfB* von

*Pa* sind und durch Komplementierungsexperimente untersucht werden ob YgfB dieser Spezies das YgfB von *Pa* funktionell ersetzen kann.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Materialien

##### 3.1.1 Geräte

Tabelle 1 Liste verwendeter Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Bench Thermo Heraeus HeraSafe HS18	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)
Bioer MB-102 Thermocell Mischblock	Bioer, Hangzhou(CN)
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg (DE)
Brutschrank Function Line B20	Heraeus Instruments, Hanau (DE)
Eismaschine Scotsman AF 156	ALI Group, Mailand (IT)
Elektroporator BioRad Gene Pulser II mit Pulse Controller Plus	Bio-Rad, Hercules, Californien (US)
FastGene FAS-V Geldokumentation	Nippon Genetics Europe GmbH, Düren (DE)
Feinwaage Sartorius CPA225D semimicro balance	Sartorius, Göttingen (DE)
Gefrierschrank No Frost Premium	Liebherr, Biberach (DE)
Gefriertruhe HFC 586 Basic	Heraeus Instruments, Hanau (DE)
Gelelektrophoresekammer Mini-Sub-Cell GT und Sub-Cell GT	Bio-Rad, Hercules, Californien (US)
Heizplatte/Magnetrührerr MR3001K	Heidolph instruments, Schwabach (DE)
Lightcycler 480 II	Roche, Basel (CH)
Mikrowelle Severin MW 7825	Severin, Sundern (DE)
Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments, Hanau (DE)

Multitubeholder SI-H524 horizontal Aufsatz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)
Nanodrop ONE	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)
Netzteil Power Pack plus	Bio-Rad, Hercules, Californien (US)
Pipetten (10 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (DE)
Schüttelinkubator HAT	Infors HT, Bottmingen (CH)
Tecan Infinite M200 PRO, Multimodemicroplatereader	Tecan, Männerdorf (CH)
Thermocycler C1000 Touch	Bio-Rad, Hercules, Californien (US)
Ultraschallbad Sonorex Super RK510	Bandelin, Berlin (DE)
Vakuumpumpe CVC 2000	Vacuubrand, Wertheim
Vortex Genie 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)
Wage Ohaus Scout Pro	Ohaus, Parsippany, New Jersey (US)
Wasserbad	Memmert, Schwabach (DE)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg (DE)
Zentrifuge mini Spin plus	Eppendorf, Hamburg (DE)

### 3.1.2 Verwendete Kits

Tabelle 2 Liste verwendeter Kits

Bezeichnung	Hersteller
Beta-Lactamase Activity Colorimetric Assay Kit	Biovision, Milpitas Californien (US)
DNase I recombinant, RNase free Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (US)
DNeasy UltraClean Microbial Kit	Qiagen, Venlo (NL)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System	Promega, Fitchburg, Wisconsin (US)
QuantiFast SYBR green RT-PCR Kit	Qiagen, Venlo (NL)
QuantiFast SYBR green PCR Kit	Qiagen, Venlo (NL)
Turbo DNA-free Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)
Wizard SV Gel und PCR Clean-up System	Promega, Fitchburg, Wisconsin (US)
ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit	ZYMO RESEARCH, Irvine, Californien (US)

### 3.1.3 Enzyme und Reagenzien

Tabelle 3 Liste verwendeter Enzyme und Reagenzien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Gibson Mix	<p>Von Andrea Eipper (Tübingen); enthält</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• T5 Exonuclease (10 U/μl); Epicentre, Madison (USA)</li> <li>• Phusion DNA Polymerase; New England Biolabs, Ipswich (UK)</li> <li>• Taq DNA Ligase (40 U/μl); New England Biolabs, Ipswich (UK)</li> </ul> <p>5X isothermal (ISO) Reaktionspuffer (25% PEG-8000, 500 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT, 1 mM each of the 4 dNTPs, and 5 mM NAD)</p>
DpnI Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)

GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)
Invitrogen 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)
MangoMix	Bioline, London (UK)
Kapa PCR Kit	Kapa Biosystems Woburn (US)
RNAasin Ribonuclease Inhibitor recombinant	Promega, Fitchburg, Wisconsin (US)
SYBR Safe DNA Gel Stain	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)
THE RNA Storage Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)
TRIzol Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)

### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4 Liste verwendeter Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen 10 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Nerbe Plus GmbH, Winsen (DE)
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 µl und 2 µl	Eppendorf, Hamburg (DE)
Falcon Zentrifugenröhrchen 7,5 ml und 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes (US)
Falcon Zellkulturröhrchen 14 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)
Ampuwa 1 l	Fresenius Kabi, Bad Homburg (DE)

Nuclease Free Water 50 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)
Filter Steri Top Vacuum Driven Disposable Filtration System	Sigmaalderich, St. Louis (US)
96 Well Lightcycler Platte und Folie	Nerbe Plus GmbH, Winsen (DE)
PCR Reaktionsgefäße single cap 8-er stripes	Biozym Diagnostics, Hessisch Oldendorf (DE)
Petrischalen	Greiner, Kremsmünster (AT)
Elektoporationsküvetten Gene Pulser	Biorad, Hercules (US)

### 3.1.5 Chemikalien

Tabelle 5 Liste verwendeter Chemikalien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Agarose Seakem LE	Lonza, Basel (CH)
Chloroform	AppliChem, Darmstadt (DE)
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt (DE)
Isopropanol	Merck, Darmstadt (DE)
L-Rhamnose	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (US)

### 3.1.6 Nährmedien

Tabelle 6 Liste verwendeter Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lysogeny Broth Agar	15 g Bactoagar LB-Medium ad 1000 ml
Lysogeny Broth Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl Einstellen von pH 7,5 mit NaOH Auffüllen auf 1000 ml mit dest. H <sub>2</sub> O
No-salt Lysogeny Broth agar + 15% Sucrose	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 15 g Bactoagar

Bezeichnung	Zusammensetzung
	Aqua dest. ad 700 ml 300 ml Sucrose (50 % w/v)
Super optimal broth with catabolite repression (SOC-Medium)	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> 10 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> 10 ml 1 M KCl 2 ml 5 M NaCl 20 ml 1 M Glucose Aqua dest. ad 1000 ml

### 3.1.7 Antibiotika

Tabelle 7 Liste verwendeter Antibiotika

Bezeichnung	Hersteller
Carbenicillin	PanReac (Applichem), Darmstadt (DE)
Gentamicin	Biochemica, Billingham (UK)
Irgasan	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri (US)

### 3.1.8 Puffer

Tabelle 8 Liste verwendeter Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	0,2 g CaCl <sub>2</sub> 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8 g NaCl 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Tris-Borat-EDTA Puffer (TBE)	10,8 g TRIS Base 5,5 g Borsäure 0,7 g EDTA-Na <sub>2</sub>
5x Ladepuffer Orange G	0,01 g Orange G 3,0 ml Glycerol 50% 0,6 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

	1,4 ml H <sub>2</sub> O
--	-------------------------

### 3.1.9 Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 9 Liste verwendeter Bakterienstämme

Bezeichnung	Eigenschaft	Plasmid	Herkunft
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Stämme			
ID40 WT	Wildtypstamm, klinisches Patientenisolat	-	Willmann et al. 2019
ID40 $\Delta ampDh3$	ID40 Mutante mit Deletion von <i>ampDh3</i>	-	Eggers et al. 2023
ID40 $\Delta ampDh3/\Delta ygfB$	ID40 Mutante mit Deletion von <i>ampDh3</i> und <i>ygfB</i>	-	Eggers et al. 2023
ID40 $\Delta ygfB$	ID40 Mutante mit Deletion von <i>ygfB</i>		Sonnabend et al. 2020
ID40 $\Delta ygfB::Rha-YgfB$	ID40 Mutante mit Deletion von <i>ygfB</i> und genomischer Integration von <i>ygfB</i> unter Kontrolle eines Rhamnose induzierbaren Promotors	-	Sonnabend et al. 2020

Bezeichnung	Eigenschaft	Plasmid	Herkunft
ID40 $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB <i>Ab</i>	ID40 Mutante mit Deletion von <i>ygfB</i> und genomischer Integration von <i>ygfB</i> aus <i>A. baumannii</i> unter Kontrolle eines Rhamnose induzierbaren Promotors	-	Diese Arbeit
ID40 $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB <i>Ec</i>	ID40 Mutante mit Deletion von <i>ygfB</i> und genomischer Integration von <i>ygfB</i> aus <i>E. coli</i> unter Kontrolle eines Rhamnose induzierbaren Promotors	-	Diese Arbeit
ID40 $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB pBBR_ampDh3_0_luc	ID40 Mutante mit Deletion von <i>ygfB</i> und genomischer Integration von <i>ygfB</i> unter Kontrolle eines Rhamnose	pBBR_ampDh3_0_luc	Diese Arbeit
ID40 $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB pBBR_ampDh3_52_luc		pBBR_ampDh3_52_luc	
ID40 $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB pBBR_ampDh3_122_luc		pBBR_ampDh3_122_luc	

<b>Bezeichnung</b>	<b>Eigenschaft</b>	<b>Plasmid</b>	<b>Herkunft</b>
ID40 $\Delta$ ygfB::Rha-YgfB pBBR_ampDh3_141_I uc	induzierbaren Promotors; transformiert	pBBR_ampDh3_141_I uc	
ID40 $\Delta$ ygfB::Rha-YgfB pBBR_ampDh3_158_I uc	mit den angegebenen pBBR_ampDh	pBBR_ampDh3_158_I uc	
ID40 $\Delta$ ygfB::Rha-YgfB pBBR_ampDh3_180_I uc	3_luc Reporterplasm iden	pBBR_ampDh3_180_I uc	
ID40 $\Delta$ ygfB::Rha-YgfB pBBR_ampDh3_233_I uc		pBBR_ampDh3_233_I uc	
ID40 $\Delta$ ygfB::Rha-YgfB pBBR_ampDh3_283_I uc		pBBR_ampDh3_283_I uc	
ID40 $\Delta$ ygfB::Rha-YgfB pBBR_ampDh3_363_I uc		pBBR_ampDh3_363_I uc	
ID40 $\Delta$ ygfB::Rha-YgfB pBBR_ampDh3_418_I uc		pBBR_ampDh3_418_I uc	
ID40 $\Delta$ ygfB::Rha-YgfB pBBR_ampDh3_430_I uc		pBBR_ampDh3_430_I uc	
ID40 $\Delta$ ygfB::Rha-YgfB pBBR_ampDh3_464_I uc		pBBR_ampDh3_464_I uc	
ID40 $\Delta$ ygfB::Rha-YgfB pBBR_ampDh3_479_I uc		pBBR_ampDh3_479_I uc	

Bezeichnung	Eigenschaft	Plasmid	Herkunft
ID40 $\Delta$ ygfB::Rha-YgfB pBBR_ampDh3_532_I uc		pBBR_ampDh3_532_I uc	
<i>Escherichia coli</i>			
<i>E. coli</i> SM10 $\lambda$ pir	Chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Stamm	-	Hmelo et al. 2015
<i>E. coli</i> One Shot Top10	Chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Stamm	-	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts (US)

### 3.1.10 Verwendete Plasmide

Tabelle 10 Liste verwendeter Plasmide

Bezeichnung	Funktion	Selektionsmarker	Herkunft
pNL1.1.PGK	Expressionsvektor Nanoluc Luciferase	Ampicillin	Promega
pBBR1MCS-5	Klonierungsvektor, breites Rezipientenspektrum	Gentamicin	Kovach et al. 1994
pBBR_ampDh3_0_luc	Konstrukt aus pBBR1MCS-5, des Promotors von ampDh3 mit der jeweiligen Anzahl der Basenpaare und	Gentamicin	Diese Arbeit
pBBR_ampDh3_52_luc			
pBBR_ampDh3_122_luc			
pBBR_ampDh3_141_luc			
pBBR_ampDh3_158_luc			
pBBR_ampDh3_180_luc			
pBBR_ampDh3_233_luc			

pBBR_ampDh3_283_luc	der Luciferase		
pBBR_ampDh3_363_luc	NanoLuc©		
pBBR_ampDh3_418_luc	Luciferase-		
pBBR_ampDh3_430_luc	Reporterplasmide:		
pBBR_ampDh3_464_luc	Luciferase wird unter		
pBBR_ampDh3_479_luc	der Kontrolle		
pBBR_ampDh3_532_luc	verschiedener Teile des ampDh3- Promotors exprimiert		
pFLP2	Exprimiert Flp- Rekombinase	Ampicillin, Carbenicillin	Hoang et al. 1998
pJM220 (pUC18T- miniTn7T-gm-rhaSR- PrhaBAD)		Gentamicin	Meisner et al. 2016
pJM220_ygfB_Ab	Derivat von pJM220 mit CDS von Ab ygfB	Gentamicin	Diese Arbeit
pJM220_ygfB_Ec	Derivat von pJM220 mit CDS von Ec ygfB	Gentamicin	Diese Arbeit
pTNS3	kodiert für Transposase	Ampicillin, Carbenicillin	Choi et al 2008

### 3.1.11 Oligonukleotide

Tabelle 11 Liste verwendeter Primer für qPCR

Bezeichnung	Interne Nummer	Sequenz (5'→3')	Annealing Temperatur [°C]
PA14_gyrB_f	13	CGTAACCTGAACAACACTACATC GAG	60
PA14_gyrB_r	14	AAGTACTTGCCCATCTCCTGT TC	60
ID40_ygfB_f	69	TCCATATAGTCCGTCTCGCC	60

ID40_ygfB_r	70	GGGTTTCCTCGCCGGTTT	60
ID40_ampC neu_f	77	TGCTGCTCCATGAGTCGTTT	60
ID40_ampC neu_r	78	CGCCTCTATTCCAACCCGAG	60
ID40_ampD_f	97	GGAGACGAACTGGGTGATGG	60
ID40_ampD_r	98	GGTAAGGTCCAGGCGTTCTT	60
ID40_ampDh2_f neu	103	CCGAGGTGTAGTCGGTGTTT	60
ID40_ampDh2_r neu	104	GCGTTCGTTTCGTTCTACTGG	60
ID40_ampDH3_f	95	TACCGGCCTCGTAGAGTTCC	60
ID40_ampDH3_r	96	CACTCAAGCAACTGGCGAAG	60
ID40_Ec_ygfB_f	105	ACGCAACCGAAGCTGGATAA	60
ID40_Ec_ygfB_r	106	CGTCTTCGTCGTAACCCAGT	60
TUEID40_01945_f	109	CGCAGGGGTCTGAAGAGAAAC	60
TUEID40_01945_r	110	GATCGAGCCCTACATCCGCT	60
TUEID40_01954_f	107	TGTTGCGGATGCTGACGAA	60
TUEID40_01954_r	108	GAATGGCGACAGCAACCCTT	60
ID40_alpB_f	117	CGTAATAGCCGCCGACCC	60
ID40_alpB_r	118	CGCCATCTTCTTTGTCGTGT	60
ID40_alpC_f	119	TGCTCGGCACGATAACAACC	60
ID40_alpC_r	120	CGATCTGCATGCGCCTGAT	60
ID40_alpD_f	113	TAGTAAGCCGTTCCACCCGT	60
ID40_alpD_r	114	TCGACCTTGTTCCTCGCTCAC	60
ID40_alpE_f	111	GCATGGAAAAGACGGACGAC	60
ID40_alpE_r	112	TTGAGCCTGACCATAACCGC	60

Tabelle 12 Liste verwendeten Primer für Klonierung

Interne Nummer	Beschreibung	Sequenz
780	Linearisierung von pJM220	TCTCCGAACTCACGACCGAAA
781	Linearisierung von pJM220	TGTTCCGGGCAGTTGGTGATG
885	Insert für PJM220 Ab ygfB	CTAGTGCTCTGCAGGAATTCCTCGAGAAGCTTATGC AAGACGATATTTTCAGG
886	Insert für pJM220 Ab ygfB	ATCTGGTTGGCCTGCAAGGCCTTCGCGAGGTATTAA CTTGGGCGATGTGG
887	Insert für pJM220 Ec ygfB	AGTGCTCTGCAGGAATTCCTCGAGAAGCTTATGTCT ATACAGAACGAAATG
888	Insert für pJM220 Ec ygfB	CTGGTTGGCCTGCAAGGCCTTCGCGAGGTATTAGTG TAGAGTCGGTTTTT
946	Linearisierung von pBBR1	GCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCG
947	Linearisierung von pBBR1	GCCTGGGGTGCCTAATGAG
948	Nanoluc	AACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACGCCAG AATGCGTTCCG
949	Nanoluc	CTTTCCATCATCCGAAAAAAGGTGAAAACCATGGTCT TCACACTCGAAGATTTT
950	ampDh3 bp -532 - -1	CCCAACGAAATCTTCGAGTGTGAAGACCATGGTTTT CACCTTTTTTTCGGATGATG
951	ampDh3 bp -532 - -1	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTAGCCG CTCTGTGCGAGGG

<b>Interne Nummer</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Sequenz</b>
968	ampDh3 bp-418 -1-Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTCCCA TGATCACGTTTCCCG
969	ampDh3 bp-233 - -1 -Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTCAGT GGCCTCGGTGAG
970	ampDh3 bp-158 - -1 -Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCCGTGCC GGGCTTTTTTATG
1032	ampDh3 bp 0 - - 1-Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCATGGTC TTCACACTCGAAGATTC
1033	ampDh3 bp-122 - -1 -Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCCGTTTT AGCCGGGGCCC
1034	ampDh3 bp-430 - -1 -Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCCGCGGT AGTTTTTTCCCATGATC
1035	ampDh3 bp-479 - -1 Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCCAAAGT AGAGCGGCCAACG
1041	ampDh3 bp-464 - -1 -Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCAACGGA CGAACGGTGTTG
1042	ampDh3 bp-363 - -1-Nanoluc	GTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTCG TCGTTTCCGCCCG
1043	ampDh3 bp-283 - -1 Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTCCGGC CAACTTAAAGTTCGG
1044	ampDh3 bp-180 - -1 Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCGTGTAT CCCTTTTGCCCGGC
1045	ampDh3 bp-158 - -1 Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTGCCCG GTCTTCTTCCTTC
1049	ampDh3 bp-77 - -1 Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCATCGCT GCATCGACGTCC

**Tabelle 13 Primer für Kontroll-PCRs und Sequenzierung**

<b>Interne Nummer</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Sequenz</b>
697	Kontroll-PCR und Sequenzierung von pBBR1 Derivaten	TCTCCGAACTCACGACCGAAA
698	Kontroll-PCR und Sequenzierung von pBBR1 Derivaten	TGTTCCGGGCAGTTGGTGATG
780	Kontroll-PCR und Sequenzierung von pJM220 Derivaten	TCTCCGAACTCACGACCGAAA
781	Kontroll-PCR und Sequenzierung von pJM220 Derivaten	TGTTCCGGGCAGTTGGTGATG
885	Insert für pJM220 Ab ygfB	CTAGTGCTCTGCAGGAATTCCTCGAGAAGCTTATG CAAGACGATATTTTCAGG
886	Insert für pJM220 Ab ygfB	ATCTGGTTGGCCTGCAAGGCCTTCGCGAGGTATTA ACTTGGGCGATGTGG
887	Insert für pJM220 Ec ygfB	AGTGCTCTGCAGGAATTCCTCGAGAAGCTTATGTC TATACAGAACGAAATG
888	Insert für pJM220 Ec ygfB	CTGGTTGGCCTGCAAGGCCTTCGCGAGGTATTAGT GTAGAGTCGGTTTTT
946	Linearisierung von pBBR1	GCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCG
947	Linearisierung von pBBR1	GCCTGGGGTGCCTAATGAG

<b>Interne Nummer</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Sequenz</b>
948	Nanoluc	AACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACGCCA GAATGCGTTTCG
949	Nanoluc	CTTTCCATCATCCGAAAAAAGGTGAAAACCATGGTC TTCACACTCGAAGATTC
950	ampDh3 bp -532 - -1	CCCAACGAAATCTTCGAGTGTGAAGACCATGGTTT TCACCTTTTTTCGGATGATG
951	ampDh3 bp -532 - -1	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTAGCC GCTCTGTGCGAGGG
968	ampDh3 bp-418 - 1-Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTCCC ATGATCACGTTTCCCG
969	ampDh3 bp-233 - -1 -Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTCAG TGGCCTCGGTGAG
970	ampDh3 bp-158 - -1 -Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCCGTGC CGGGCTTTTTTATG
1032	ampDh3 bp 0 - - 1 -Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCATGGT CTTCACACTCGAAGATTC
1033	ampDh3 bp-122 - -1 -Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCCGGTT TAGCCGGGGCCC
1034	ampDh3 bp-430 - -1 -Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCCGCG GTAGTTTTTTCCCATGATC
1035	ampDh3 bp-479 - -1 Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCCAAAG TAGAGCGGCCAACG
1041	ampDh3 bp-464 - -1 -Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCAACGG ACGAACGGTGTTG
1042	ampDh3 bp-363 - -1-Nanoluc	GTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTC GTCGTTTTCCGCCCG
1043	ampDh3 bp-283 - -1 Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTCCGG CCAACCTAAAGTTCGG

<b>Interne Nummer</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Sequenz</b>
1044	ampDh3 bp-180 - -1 Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCGTGTA TCCCTTTTGCCCGGC
1045	ampDh3 bp-158 - -1 Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTGCCC GGTCTTCTTCCTTC
1049	ampDh3 bp-77 - - 1 Nanoluc	GAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCATCGC TGCATCGACGTCC

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Bakterielle Kultivierungsbedingungen

Für die Durchführung von Experimenten wurden Bakterien in einer Übernachtskultur mit anschließender Subkultur kultiviert. Für die Übernachtskultur wurde LB-Medium mit den erforderlichen Zusätzen versetzt (Antibiotikum, Rhamnose) verwendet. Nach Inokulation mit dem entsprechenden Stamm kryokonservierter Bakterien erfolgte die Inkubation im Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 Umdrehungen pro Minute über Nacht. Die Generierung von Subkulturen für die entsprechenden Experimente erfolgte durch Verdünnung der Übernachtskulturen 1:20 in LB-Medium und Inkubation zu oben beschriebenen Bedingungen für 3 h.

Die Anzucht auf festen Nährmedien erfolgte entweder durch Ausplattieren aus Flüssigkultur mittels Glasspatel oder als Drei-Ösen-Ausstrich kryokonservierter Bakterien mit anschließender Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

### 3.2.2 Extraktion von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte aus 5 ml Übernachtskulturen der Plasmid-tragenden Stämme, die unter Zusatz des jeweiligen antibiotischen Selektionsmarkers kultiviert wurden, mit dem ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit von Zymo Research nach Anweisungen des Herstellers. Die Elution der Plasmid

DNA erfolgte beim letzten Schritt in 25 µl Nuklease freiem Wasser (Ambion). Danach erfolgte eine Konzentrationsbestimmung via Nanodrop ONE (Thermo Fisher Scientific). Die erhaltene DNA wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.2.3 Extraktion genomischer DNA

Für die Extraktion bakterieller genomischer DNA wurde nach Protokoll des DNeasy Ultra Clean Microbial Kit (Qiagen) verfahren. Als Ausgangsmaterial dienten 1,8 ml Übernachtskultur der entsprechenden Bakterienstämme, die Elution erfolgte in 50 µl Nuklease-freiem Wasser (Ambion). Anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung mit dem Nanodrop ONE (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die DNA wurde direkt weiter weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

### 3.2.4 DNA Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Größe der PCR-Produkte wurde eine DNA Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür erfolgte das Gießen der 1 %-Agarose Gele durch Zugabe von 1 mg Agarose (Seakem) zu jeweils 100 ml TBE-Puffer und Erhitzen in einer Mikrowelle, bis sich die Agarose vollständig im Puffer löst. Die handwarme Lösung wurde mit SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) 1 µl pro 10 ml versetzt und in einen Gelschlitten mit Kamm zur Aussparung der Ladetaschen gegossen. Nach vollständiger Abkühlung kann das nun feste Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt werden. Dann erfolgte das Laden der Taschen mit 5 µl PCR-Produkt, welche zuvor mit 3µl Orange G Ladepuffer versetzten wurden und 8 µl Invitrogen 1 kb Plus DNA Ladder. Nun wurde für 60 Minuten eine Spannung von 110 Volt angelegt, sodass die negativ geladenen PCR-Fragmente der Größe nach aufgetrennt wurden. Die Visualisierung erfolgte mit UV-Licht (FastGene FAS-V).

### 3.2.5 PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Gibson Assembly

Für spätere „Gibson Assemblies“ wurden die zu klonierenden Fragmente mit einer Gradienten-PCR amplifiziert. Hierzu wurde die Kapa-Polymerase verwendet (Kapa Biosystems). Da die DNA von *Pa* GC-reich ist, wurde dafür der spezielle GC Puffer verwendet.

**Tabelle 14 Kapa-Polymerase PCR Ansatz für 10 Reaktionen**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
GC Puffer	50 µl
Primer Forward (10 mM)	7,5 µl
Primer Reverse (10 mM)	7,5 µl
Nukleotide	7,5 µl
Wasser	171,5 µl
DNA Template (gDNA 200 ng/10 Reaktionen oder 20 ng Plasmid DNA/10Reaktionen)	1 µl
Kapa Polymerase	5 µl

Anschließend wurden 8 PCR Reaktionsgefäße mit 25 µl PCR Mix befüllt und eine Gradienten- PCR im Bereich von 54°C und 70°C durchgeführt. Variablen wie Template, Dauer der Elongationszeit und Zyklenzahl sind bei der Beschreibung der einzelnen Klonierungen im Detail aufgeführt.

**Tabelle 15 PCR Bedingungen**

<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Temp</b>	<b>Zyklen</b>
Initiale Denaturierung	95°C 5 Min	
Denaturierung	95°C 30s	30 Zyklen
Annealing	54°C bis 70°C, 30s	
Extension	72°C 30s/kB	
Finale Extension	72°C 5 min	
Lagerung	4° C bis zur Entnahme	

Nach Beendigung der PCR wurden 5 µl der jeweiligen Proben mit jeweils 3 µl Orange G Ladepuffer gemischt und eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Das restliche Volumen der PCR-Reaktionen einer Serie, die das erwünschte Produkt im Gel zeigten, wurden vereinigt und mit Hilfe des DNA Wizard Kits (Promega) nach Anleitung über ein Säulchen gereinigt. Am Ende

dieser Prozedur wurde die DNA mit 50 µl Wasser eluiert und die DNA-Konzentration mit dem Nano Drop Photometer bestimmt. Die DNA war nun fertig für spätere „Gibson Assemblies“.

### 3.2.6 Mango Mix PCR

Für die Kontrolle von „Gibson Assemblies“, Klonierungen und Mutagenesen wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Hierfür wurde jeweils ein Teil einer Bakterienkolonie in 50 µl Wasser resuspendiert, für 5 Minuten bei 95°C in einem Thermoblock erhitzt, kurz abzentrifugiert und 3 µl vom Überstand für die PCR eingesetzt. Die Komposition des PCR Mix und die PCR Bedingungen sind nachfolgend dargestellt, wenn nicht anderweitig spezifiziert.

**Tabelle 16 Mango Mix PCR Ansatz**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Mangomix	7,5 µl
Primer Forward (10mM)	0,5 µl
Primer Reverse (10mM)	0,5 µl
Wasser	3,5 µl
DNA-Template (Bakteriensuspension gekocht oder gDNA (20 ng insgesamt/Ansatz)	3 µl

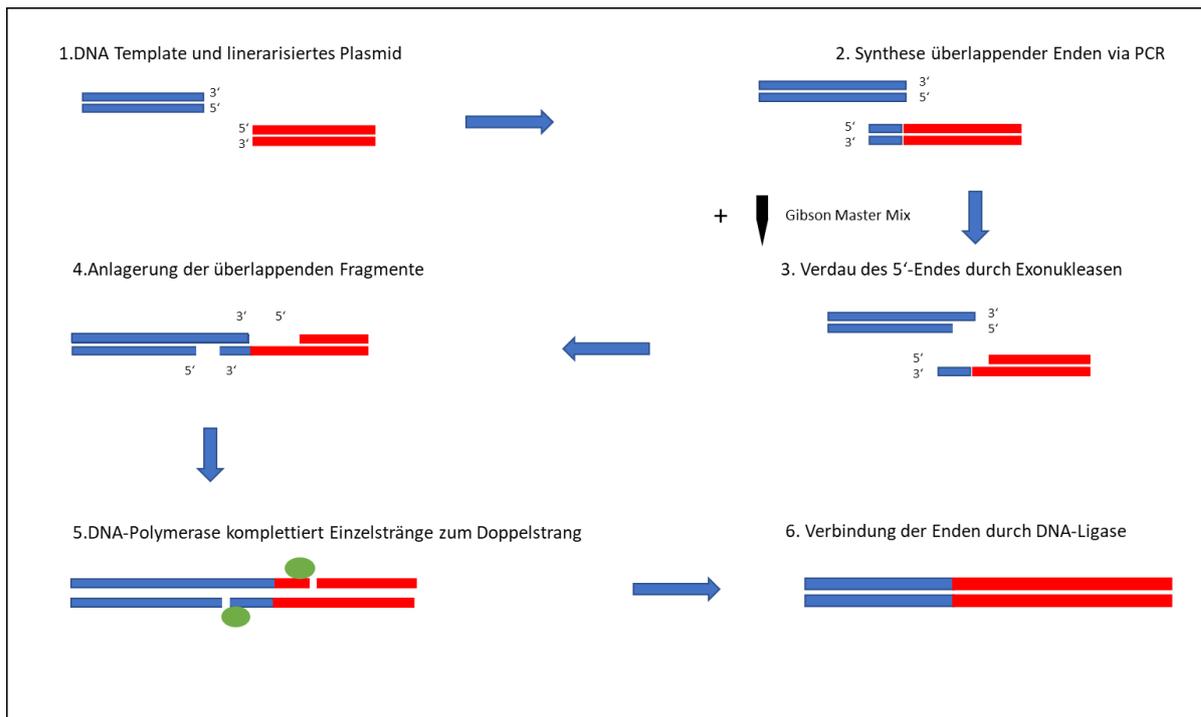
**Tabelle 17 PCR Bedingungen Mango Mix PCR**

<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Temp</b>	<b>Zyklen</b>
Initiale Denaturierung	95°C, 5 min	
Denaturierung	95°C, 30 s	30 Zyklen
Annealing	54°C, 30 s	
Extension	72°C 30 s/kB	
Finale Extension	72°C 5 min	
Lagerung	4° C bis zur Entnahme	

Nach der PCR wurden 8 µl des PCR-Ansatzes durch eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

### 3.2.7 Gibson Assembly

Beim „Gibson Assembly“ [109] werden ein oder mehrere PCR Fragmente in einen Vektor integriert. Hierbei überlappen die DNA Fragmente sich um etwa 30 bp. Die Assemblierung erfolgt wie in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3 Gibson Assembly.** Zunächst erfolgt die Linearisierung des Vektorplasmids (1). Nach Zugabe des DNA-Templates erfolgt eine PCR zur Generierung von überlappenden Enden (2). Durch Zugabe des Gibson Master Mix findet zunächst ein teilweiser Abbau der 5'-Enden durch eine Exonuklease statt. Die überlappenden Enden können sich nun anlagern (4) und durch die DNA-Polymerase findet eine re-Synthese der DNA-Stränge statt (5). Danach erfolgt eine Verbindung der freien DNA-Enden durch die im Gibson-Mix enthaltene DNA-Ligase (6).

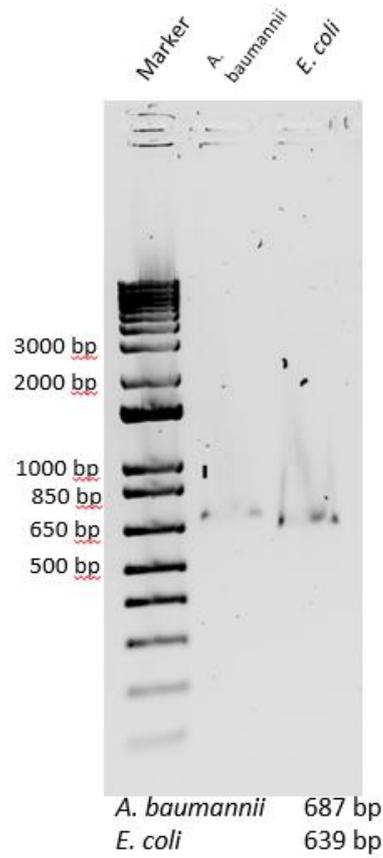
Das „Gibson Assembly“ erfolgte in der Regel nach der folgenden Prozedur: jeweils 100 ng der 1-2 Insert DNA-Fragmente und 100 ng der ebenfalls über eine PCR linearisierte Vektor-DNA wurden mit 10 µl Gibson Mix gemischt und 30 Minuten bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde zum Verdau von nicht linearisierter Template-Plasmid DNA 1 µl DpnI zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. DpnI bewirkt einen Restriktionsverdau spezifisch von methylierter DNA. Im Gegensatz zur Template-Plasmid DNA ist die durch PCR amplifizierte DNA nicht methyliert und wird daher von DpnI nicht geschnitten. Anschließend erfolgte eine Transformation von Kalzium-kompetenten *E. coli*. Dafür wurden die

Bakterien auf Eis aufgetaut und 5 µl des Gibsonreaktionsproduktes dazu gegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis, ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C und eine weitere Inkubation für 2 Minuten auf Eis. Zu den transformierten Bakterien wurde anschließend 1 ml vorgewärmtes SOC Medium gegeben und die Bakterien bei 37°C in einem Schüttelinkubator für eine Stunde inkubiert. Von der Bakteriensuspension wurden direkt 100 µl auf LB Agarplatten mit 15 µg/ml Gentamicin ausplattiert. Anschließend wurden die verbleibenden Bakterien bei 4.500 x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100 µl verworfen, die Bakterien im verbleibenden Medium resuspendiert und auf LB Agarplatten mit 15 µg/ml Gentamicin ausplattiert.

### 3.2.8 Komplementierung bereits deletierter Gene

Zur Generierung von pJM220-*ygfB* Ec und pJM220-*ygfB* Ab wurde ein Gibson Assembly durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der Vektor pJM220 mit den Primern 780 und 781 mit Hilfe einer Kapa-Gradienten-PCR amplifiziert (s. 3.2.5). Als Template wurde pJM220 verwendet. Die Dauer der Extension bei 72°C betrug 3 min.

Die Inserts für pJM220-*ygfB*-Ec und pJM220-*ygfB*-Ab wurden mit den Primern 887 und 888, bzw. 885 und 886 durchgeführt. Als Template wurde gDNA von *A. baumannii* AB5075 bzw. *E. coli* K12 verwendet. Die Dauer der Elongation bei 72°C betrug 30 s. Nach der PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (wie unter 3.2.4 beschrieben). Die PCR-Reaktionen, welche Produkte der erwarteten Größe (*Ec ygfB* 639 bp, *Ab ygfB* 687 bp) ohne Nebenprodukte generierten, wurden vereinigt. Die DNA wurde mit dem DNA Wizard Kit (Promega) gereinigt und die Konzentration mit einem Nanodrop Photometer bestimmt. Anschließend wurde ein Gibson Assembly durchgeführt (siehe 3.2.7).



**Abbildung 4 PCR auf *A. baumannii* und *E. coli* *ygfB*.** Die jeweiligen Produkte sind als Banden mit einer Größe von ~ 650 bp sichtbar.

Nach Transformation und Ausplattieren auf LB Agarplatten mit 15 µg/ml Gentamicin wurden mehrere Klone gepickt und eine Kolonie PCR (s. Abschnitt 3.2.6) durchgeführt. Hierzu wurden die Primer 780 und 781 verwendet. Mehrere Klone, die durch Kolonie PCR als solche identifiziert wurden, wurden dann in 5 ml LB Medium + 15 µg/ml Gentamicin über Nacht bei 37°C mit Schütteln kultiviert. Mit einem Monarch Plasmid Minipräp DNA Kit (NEB) wurde Plasmid-DNA isoliert und die DNA wurde mit den Primern 780 und 781 sequenziert. Die Sanger-Sequenzierung wurde von Eurofins Genomics durchgeführt. Hierzu wurde 15 µl Plasmid DNA-Lösung (50-100 ng/µl) mit 2 µl Sequenzierprimer (10 µM) gemischt. Ein durch Sequenzierung validierter Klon wurde dann bei -80°C weggefroren. Hierfür wurde der Bakterienklon über Nacht in 5 ml LB Medium bei 37°C unter Schütteln kultiviert, anschließend abzentrifugiert (4000 x g, 5 min) und in 4 ml LB

+ 20 % Glycerin resuspendiert. Vier 1 ml Aliquots wurde dann bei -80°C weggefroren.

### 3.2.9 Komplementierung von ID40 $\Delta$ *ygfB* mit *ygfB* anderer Spezies

Zunächst wurden elektrokompetente ID40 $\Delta$ *ygfB* Bakterien hergestellt. Hierzu wurden 6 ml einer Übernachtskultur von ID40 $\Delta$ *ygfB* in LB-Medium zentrifugiert (5.000 x g, 5 min) und anschließend der Überstand abgenommen. Danach wurde das Bakterienpellet in 5 ml 300 mM Sucrose-Lösung resuspendiert. Die Bakterien wurden erneut zentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes wieder in 300 mM Sucrose-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 1 ml Sucrose-Lösung resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation (16.000 x g, 1 min) und Entfernung des Überstandes, wurde das Pellet in 100  $\mu$ l 300 mM Sucrose-Lösung resuspendiert. Zu dieser Bakteriensuspension wurden 50 ng von pJM220-*ygfB Ec* oder pJM220-*ygfB Ab* gegeben und zusätzlich 50 ng des pTNS3 Helfer Plasmid. pTNS3 kodiert für eine Transposase, die für die Integration des Tn7 Elementes vom pJM220 Vektor in das Genom benötigt wird. Die Bakteriensuspension wurde dann in eine Elektroporationsküvette (GenePulser Küvette) überführt. Danach wurde mit einem Elektroporator (BioRad Gene Pulser II) elektroporiert (25 mF, 2,5 kV). Nach Elektroporation wurde sofort 1 ml LB-Medium zugegeben und diese Mischung dann in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde dann in einem Schüttelinkubator bei 37°C für eine Stunde geschüttelt. Nach der Inkubation wurden die Bakterien bei 10.000 x g für 1 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 110  $\mu$ l LB Medium resuspendiert und 10  $\mu$ l bzw. 100  $\mu$ l der Suspension wurden schließlich auf LB-Gentamicin (30  $\mu$ g/ml) ausplattiert.

Alternativ hierzu wurde die Transformation von pJM220-*ygfB Ec* und pJM220-*ygfB Ab* mittels Mating durch *E. coli* SM10  $\lambda$  pir durchgeführt. Hierzu wird der Stamm durch *E. coli* SM10  $\lambda$  pir 10 min auf Eis aufgetaut und jeweils 50-100 ng Plasmid DNA von pJM220-*ygfB Ec* oder pJM220-*ygfB Ab* hinzugegeben. Es folgt eine 30-minütige Inkubation auf Eis, dann ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad und wieder 1 Minute auf Eis. Anschließend wird 1ml SOC

Medium in das Reaktionsgefäß hinzugegeben und die Bakteriensuspension 1h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nun erfolgt noch ein Zentrifugationsschritt (4500 x g, 3 min) und die Resuspension des Zellpellets in 110 µl LB Medium. Es wurden jeweils 10 µl und 100 µl auf LB Agarplatten mit 15 µg/ml Gentamicin ausplattiert. Um den Erfolg der Transformation zu überprüfen, wurden Klone gepickt und sowohl auf einer markierten LB-Gentamicin-Agarplatte (15 µg/ml Gentamicin) ausgestrichen als auch in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 50 µl H<sub>2</sub>O gegeben und bei 95°C für 5 min inkubiert. 3 µl der Bakterien-Wasser Suspension wurde für eine Mango-Mix PCR zur Bestätigung Plasmid-tragender Klone mit den Primern 780 und 781 verwendet. Die Zusammensetzung der PCR Reaktion ist in Tabelle 18 zu sehen, sowie die Bedingungen in Tabelle 19. Die erwartete Produktlänge war 1065 bp für pJM220-*ygfB* *Ab* und 1011 bp für pJM220-*ygfB* *Ec* tragende *E. coli* SM10 λ pir. Ein positiver Klon wurde dann in 5 ml LB Medium mit 15 µg/ml Gentamicin über Nacht bei 37°C kultiviert. Danach wurde die Bakteriensuspension bei 4.000 x g 5 min zentrifugiert und das Bakterienpellet in 3 ml LB 20 % Glycerin resuspendiert. 1 ml Aliquots wurden dann bei -80°C gelagert.

**Tabelle 18 Mango Mix Zusammensetzung für *E. coli* SM10 λ pir**

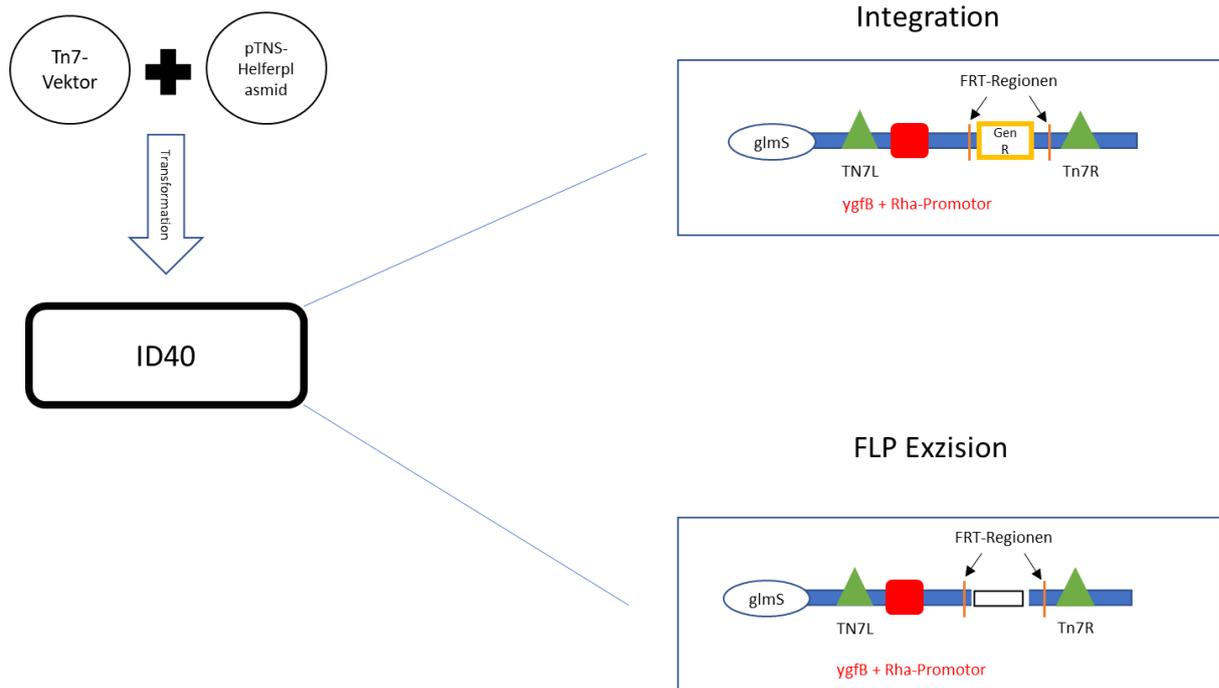
<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Mango Mix	7,5 µl
Primer 780	0,5 µl
Primer 781	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	3,5 µl
Gekochte Bakteriensuspension	3 µl

**Tabelle 19: Mango Mix PCR Bedingungen für *E. coli* SM10 λ pir**

<b>Reaktionsschritt</b>	<b>Temp</b>	<b>Zyklen</b>
Initiale Denaturierung	95°C, 5 min	
Denaturierung	95°C, 45 s	30 x

Reaktionsschritt	Temp	Zyklen
Annealing	51°C, 30 s	
Extension	72°C, 20 s	
Finale Extension	72°C, 5 min	
∞	4°C	

Für das triparentale Mating wurden nun die Stämme ID40  $\Delta ygfB$ , *E. coli* SM10  $\lambda$  pir pJM220-*ygfB* Ab und *E. coli* SM10  $\lambda$  pir pJM220-*ygfB* Ec sowie *E. coli* SM10  $\lambda$  pir pTNS3 über Nacht in 5ml LB, für die Plasmid-tragenden Stämme + 15  $\mu$ g/ml Gentamicin, angezüchtet. Nun wurden 400  $\mu$ l von ID40  $\Delta ygfB$  und je 200  $\mu$ l entweder *E. coli* SM10  $\lambda$  pir pJM220-*ygfB* Ab oder *E. coli* SM10  $\lambda$  pir pJM220-*ygfB* Ec sowie 200  $\mu$ l *E. coli* SM10  $\lambda$  pir pTNS3 in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Diese wurde dann für 3 min bei 4500 g zentrifugiert, der Überstand bis auf 100  $\mu$ l dekantiert und das Pellet resuspendiert. Der Bakterien-Mix wurde auf eine getrocknete LB Agarplatte punktförmig aufgetragen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Koloniematerial von der Agarplatte möglichst vollständig in ein mit 2 ml LB gefülltes Reaktionsgefäß überführt und gemischt. Hiervon wurden jeweils 10  $\mu$ l und 100  $\mu$ l auf Gentamicin 30  $\mu$ g/ml + Irgasan 25  $\mu$ g/ml Platten ausgespatelt. Irgasan unterdrückt das Wachstum von *E. coli* und das Gentamicin selektierte auf ID40  $\Delta ygfB$  Stämme, welche den Teil des Gens von Interesse (GOI) mit der Gentamicin-Kassette in ihr Genom integriert haben. Gentamicin-resistente Klone sollten, wie in Abbildung 5 dargestellt, einen Teil des pJM220-Gens von Interesse (GOI) inseriert haben. Die Insertion findet in der Nähe des *glmS* Gens statt [110]. Zwischen den Tn7-Stellen liegt zum einen der Rhamnose-Promotor, gefolgt vom GOI, und eine Gentamicin-Kassette, flankiert durch FRT Sites (Abbildung 5).



**Abbildung 5 Schematische Darstellung der Komplementierung von ID40  $\Delta ygfB$  mit *ygfB* mit dem mini-Tn7 System.** Es erfolgt die Transformation des Tn7-Vektors, welcher *ygfB* mit gekoppeltem Rhamnosepromotor, die Gentamicin-Resistenz und das *sacB*-Gen, sowie des pTNS-Helferplasmids mit der codierten Transposase. Die Integration ins Genom von ID40 erfolgt unterhalb des *glmS*-Gens. Mithilfe der Flp-Rekombinase wird die Gentamicin-Resistenzkassette exzidiert.

Um die Integration in die Attachment-Site zu überprüfen, wurden mehrere Klone gepickt und zum einen auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen und in jeweils 1 Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 50 µl Wasser überführt. Die Bakterien wurden für 5 Minuten bei 95°C inkubiert, kurz abzentrifugiert und mit 3 µl des Überstandes eine PCR unter Verwendung der Primer **783** und **788** durchgeführt. Die Größe des erwarteten PCR-Produktes war **480 bp**. Die Zusammensetzung der PCR Reaktion und das verwendete Programm sind in Tabelle 20 und Tabelle 21 dargestellt.

**Tabelle 20 Mango Mix PCR Integration in ID40  $\Delta ygfB$**

Komponente	Volumen
Mango Mix	7,5 µl
Primer Tn7R	0,5 µl
Primer Tn7L	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	3,5µl
gekochte Bakteriensuspension	3 µl

**Tabelle 21 PCR Programm Mango Mix PCR PCR Integration in ID40  $\Delta ygfB$**

Reaktionsschritt	Temp	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C, 5 min	
Denaturierung	95°C, 45 s	30 x
Annealing	59°C, 30 s	
Extension	72°C, 30 s	
Finale Extension	72°C, 5 min	
$\infty$	4°C	

Ein positiv getesteter Bakterienklon, der die Genkassette tatsächlich integriert hatte, wurde in 6 ml LB + 15  $\mu$ l Gentamicin (10 mg/ml) über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (siehe oben) in 300 mM Sucrose-Lösung zweimal gewaschen (2 Zentrifugationsschritte) und in 1 ml 300 mM Sucrose-Lösung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden ein weiteres Mal abzentrifugiert (10000g, 1 Minute) und dann in 100 $\mu$ l 300mM Sucrose-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 20-50 ng des Plasmides pFLP2 wurde das Gemisch in eine Elektroporationsküvette (GenePulser) überführt und eine Elektroporation durchgeführt (25 mF, 2,5 kV). Nach der Elektroporation wurde sofort 1 ml LB-Medium zugegeben und die Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurde die Bakteriensuspension 1:1000 verdünnt und 50 bzw. 100  $\mu$ l auf LB Agarplatten mit 200  $\mu$ g/ml Carbenicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Plasmid pFLP2 kodiert für eine Flp-Rekombinase, eine Ampicillin (Carbenicillin)-Resistenz und trägt zusätzlich noch ein *sacB* Gen. Die Flp Rekombinase führt zur Exzision des Bereichs zwischen den FRT-Sites, welcher die Gentamicin-Resistenzkassette enthält (s.

Abbildung 5). Übrig bleibt eine FRT-Narbe. Nach der Inkubation werden circa 20-50 Bakterienklone gepickt und sowohl auf markierte Felder einer LB-, einer LB-Carbenicillin 200 µg/ml- als auch einer LB-Gentamicin 30 µg/ml- Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einem Klon, welcher Carbenicillin resistent und Gentamicin sensitiv ist, wird weitergearbeitet. Dieser Klon wird von der LB Agarplatte auf eine LB 15 % Sucrose Agarplatte mit einem Dreiösenausstrich überführt. Das *sacB* Gen kodiert für ein Enzym, welches Sucrose in Levulansucrose umwandelt. Damit wird auf Bakterien selektioniert, die kein pFLP2 Plasmid mehr tragen. Da Levulansucrose toxisch ist, werden alle Bakterien, die noch das pFLP2 Plasmid tragen im Wachstum unterdrückt. Nun werden wieder 50 Bakterienklone auf markierte Raster von je einer LB Carbenicillin 200 µg/ml-, einer LB Gentamicin 30 µg/ml- und einer LB 15 % Sucrose- Agarplatte überführt. Die gesuchten Bakterienklone sind jetzt Gentamicin und Carbenicillin sensitiv (kein Wachstum) und wachsen auf 15 % Sucroseplatten. Ein Bakterienklon, der diese Kriterien erfüllt, wurde dann in 5 ml LB Medium über Nacht bei 37°C kultiviert. Danach wurde die Bakteriensuspension bei 4.000 x g 5 min zentrifugiert und das Bakterienpellet in 3 ml LB 20 % Glycerin resuspendiert. 1 ml Aliquots wurden dann bei -80°C gelagert.

### 3.2.10 Herstellung von *ampDh3*-Luciferase Konstrukten

Zunächst wurde das Plasmid pBBR1-*ampDh3*-532-luc generiert. Hierzu wurden Gradienten-PCRs durchgeführt um den Vektor pBBR1 (Primer 946 und 947) zu linearisieren, außerdem um das *ampDh3* Promotorfragment 532 (bp -532 bis -1) (Primer 948 und 949) und die Nanoluc Luciferase (950 und 951) zu amplifizieren. Die PCR Bedingungen waren wie in Tabelle 14 dargestellt. Die Elongationszeit bei 72°C pro Zyklus lag bei 2,5 Minuten (Linearisierung) und für die Fragmente 30 Sekunden. Als Template für die PCR diente pBBR1 (2 ng/Reaktion), ID40 gDNA (20 ng/Reaktion) und für die Nanoluc der Vektor pNL1.1 (2 ng/Reaktion). Anschließend wurde mit den gereinigten Amplifikaten ein Gibson-Assembly durchgeführt: 100 ng linearisierter Vektor + 100 ng *ampDh3* 532 Promotorfragment + 100 ng Nanolucfragment + 10 µl Gibson Mix. Alle folgenden Schritte sind unter dem Punkt Gibson-Assembly beschrieben. Nach

erfolgreichem Gibson-Assembly, der Transformation in *E. coli* und dem Ausplattieren auf LB Gentamicin 15 µg/ml Agarplatten, wurden mehrere Klone gepickt und eine Kolonie-PCR durchgeführt wie unter 3.2.6 beschrieben. Hierzu wurden die Primer 697 und 698 verwendet. Kolonien, deren PCR Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese die richtige Fragmentgröße zeigten, wurden dann in LB Medium + 15 µg/ml Gentamicin über Nacht bei 37°C kultiviert. Aus dieser Kultur wurde Plasmid-DNA isoliert (Minipräp) und durch Eurofins sequenziert. Hierfür wurden die Primer 697 und 698 verwendet. Alle weiteren Luciferase-Reporterkonstrukte basieren auf dem Vektor pBBR1 ampDh3 -532-luc.

Als Template für die Amplifikation der verschiedenen Inserts wurde der Vektor pBBR1 ampDh3-532-luc verwendet. Es wurden wieder Gradienten PCRs durchgeführt wie in Tabelle 15 beschrieben. Die Elongationszeit lag je nach Insert zwischen 30 s und 1 min. In Tabelle 22 sind die verschiedenen generierten PCR Fragmente und Primer gelistet:

**Tabelle 22 PCR-Fragmentgrößen und Primer zur Herstellung verschiedener *ampDh3*-Promotor-Luc Reporter Konstrukte**

PCR Fragment	Primer	Fragmentlänge
pBBR1 linearisiert	946/947	4329 bp
Insert ampDh3 -532 bis-1 Insert	950/951	592 bp
Insert ampDh3 -479 bis -1 Nanoluc	948/1035	1053 bp
Insert ampDh3 -464 bis -1 Nanoluc	948/1041	1038 bp
Insert ampDh3 -430 bis -1 Nanoluc	948/1034	1004 bp
Insert ampDh3 -418 bis -1 Nanoluc	948/968	992 bp
Insert ampDh3 -363 bis -1 Nanoluc	948/1042	939 bp

Insert ampDh3 -283 bis -1 Nanoluc	948/1043	857 bp
Insert ampDh3 -233 bis -1 Nanoluc	948/969	807 bp
Insert ampDh3 -180 bis -1 Nanoluc	948/1044	754 bp
Insert ampDh3 -158 bis -1 Nanoluc	948/970	732 bp
Insert ampDh3 -141 bis -1 Nanoluc	948/1045	715 bp
Insert ampDh3 -122 bis -1 Nanoluc	948/1033	696 bp
Insert ampDh3 -77 bis -1 Nanoluc	948/1049	651 bp
Insert Nanoluc	948/1049	574 bp

Das Gibson-Assembly erfolgte dann jeweils mit 100 ng linearisiertem pBBR1 und 100 ng der *ampDh3* -x bis-1 Nanoluc Inserts, gefolgt von Transformation, Ausplattieren auf LB Gentamicin Platten, Kolonie-PCR und Sequenzierung, wie zuvor beschrieben. Zur Sequenzierung wurden die Primer 697 und 698 verwendet. Ein durch Sequenzierung bestätigter Klon pro Vektor wurden dann wie bereits beschrieben bei -80°C weggefroren.

### 3.2.11 $\beta$ -Laktamase Aktivitätstestung

Verwendet wurde das EZScreen™ Beta-Laktamase Activity Colorimetric Assay Kit von Biovision (Katalog #: K954). Als Ausgangsmaterial wurden bakterielle Flüssigkulturen verwendet. Zur Detektion der  $\beta$ -Laktamaseaktivität wurde der Nitrocefinumsatz verwendet. Dies ist ein chromogenes Cephalosporin und es zeigt sich ein Farbumschlag des Substrats von gelb zu roter Farbe bei enzymatische  $\beta$ -Laktamaseaktivität. Es wurde nach Protokoll des Herstellers verfahren. Der Zellaufschluss erfolgte nach Resuspension der Zellpellets in 5

$\mu\text{l}/\text{mg}$   $\beta$ -Laktamase Assay Puffer durch Sonifizierung für 10 min im Ultraschallbad (35 kHz). Anschließend folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Für den Assay erfolgte eine 1:50 Verdünnung des Überstandes in  $\beta$ -Laktamase Assay Puffer. Der Reaction Mix bestand aus 48  $\mu\text{l}$  Assay Buffer und 2  $\mu\text{l}$  Nitrocefin je Ansatz. Pro Well wurden insgesamt 100  $\mu\text{l}$  Volumen verwendet, bestehend aus Reaction Mix und verdünnter Probe. Für die Erstellung einer Eichgeraden wurde eine Verdünnungsreihe bestehend aus Nitrocefin und Assay Buffer pipettiert (ad 100  $\mu\text{l}$ ; 0  $\mu\text{l}$ , 2  $\mu\text{l}$ , 4  $\mu\text{l}$ , 6  $\mu\text{l}$ , 8  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{l}$  Nitrocefin). Die photometrische Detektion erfolgte mittels Tecan Infinite M200 PRO, Berechnung sowie graphische Darstellung mittels Excel und GraphPadPrism8. Die Messung erfolgte bei 21°C, für 60 Zyklen bei 60 s Dauer je Zyklus bei einer Wellenlänge von 490 nm mit einem Muster von 3x3 Spots per Well. Die Berechnung erfolgte nach der Formel

$$\beta - \text{Laktamaseaktivität in } \frac{\text{nmol}}{\text{min ml}} = B / (\Delta T \times V) \times D$$

Wobei B dem umgesetzten Nitrocefin im beobachteten Zeitraum,  $\Delta T$  dem Zeitintervall, V dem Probenvolumen und D dem Verdünnungsfaktor entspricht.

### 3.2.12 RNA Extraktion

Die Methode erfolgte nach einem modifizierten Protokoll [110, 111]. Für die Gewinnung von RNA zur Analyse der Expression ausgewählter Gene wurden 10 ml Subkultur wie oben beschrieben angesetzt und inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen durch Zentrifugation bei 4.495 x g für 5 min bei Raumtemperatur wurde das Zellpellet in 1 ml TRIzol Reagenz gelöst und in eine bis 0.3 ml mit Zirkonia/Silica Beads (0,1 mm) gefüllte Mikroröhre (Sarstedt) überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch 2-minütiges horizontales Schütteln auf einem Vortexer mit entsprechendem Aufsatz bei 4°C. Für die Isolation von RNA aus Kulturmaterial in kurzen Zeitabständen zur Generierung einer Kinetik erfolgte nach diesem Schritt sofortiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Lagerung der Proben bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung. Nach erfolgtem Einfrieren der Proben mussten diese für die weitere Verarbeitung zunächst wieder auf Eis aufgetaut werden. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Chloroform, 60 s Mischen sowie 3

min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 12.000 x g bei 4 °C für 15 min. Aus den sich ergebenden drei Phasen einer Probe wurden der oberen wässrigen Phase 400 µl entnommen und zu 500 µl Isopropanol in ein DNA-LoBind Tube (Eppendorf) zur Fällung der RNA zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 12.000 x g bei 4°C für 30 Minuten wurde ein weißes Pellet im Reaktionsgefäß sichtbar. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Es folgten drei weitere Zentrifugationsschritte mit oben genannten Einstellungen für jeweils 5 und zwei Mal 3 Minuten, zwischen diesen wurde der Überstand durch Dekantieren bzw. Abnehmen mit 100 µl und 10 µl Pipettenspitzen entfernt. Vor Resuspension in 50 µl The RNA Storage Solution (Thermo Fisher Scientific) trocknete das Pellet 60-90 Minuten an der Luft. Darauf folgte eine 10-minütige Inkubation im Heizschüttler (Raumtemperatur) bei 1.000 Umdrehungen pro Minute (RPM), unterbrochen durch Mischen für 10 s auf dem Vortexer nach 5 min. Abschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung und Reinheitskontrolle der RNA mittels Nanodrop ONE (Thermo Fisher Scientific). Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

### 3.2.13 DNase-Verdau

Von der erhaltenen RNA (3.2.12) wurden 5 µg in 50 µl Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Im Anschluss wurden zu jeder Probe 8 µl des DNase-Verdau Mastermixes (Zusammensetzung siehe Tabelle 23) zugegeben und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Zur Entfernung der DNase erfolgte eine Zugabe von 6 µl DNase-Inaktivierungsreagenz aus dem Turbo DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific) mit Inkubation bei Raumtemperatur für 3 Minuten auf dem Schüttler. Abschließend erfolgte eine 1-minütige Zentrifugation bei 10.000 Umdrehungen pro Minute, Überführung des Überstands in ein neues DNA-LoBind Tube und Lagern der Proben bei -80°C.

**Tabelle 23 DNase-Verdau Mastermix**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
10x Inkubationspuffer	5 µl

DNase I, rekombinant, RNase freie Lösung	2 µl
RNASin Ribonuklease Inhibitor	1 µl
Gesamtvolumen	8 µl

### 3.2.14 RT-qPCR

Die quantitative PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit zu mehreren Zwecken verwendet. Zum einen diente Sie als Methode zur Verifikation der Ergebnisse der Differentialexpressionsanalyse. Zum anderen wurde Sie eingesetzt, um einen zeitlichen und kausalen Zusammenhang der Expression von unterschiedlich exprimierten Genen nachzuweisen. Alle Experimente wurden mit dem Lightcycler 480 II von Roche durchgeführt. Hierzu erfolgt zunächst eine Verdünnung der in 3.2.12 erhaltenen, DNase verdauten, RNA 1:10 in RNase freiem Wasser (Konzentration 10 ng/µl). Nun erfolgte die Vorbereitung des Mastermix für die PCR auf das zu untersuchende Gen nach der Zusammensetzung s. Tabelle 24.

**Tabelle 24 Mastermix RT-qPCR**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
SYBR green RT PCR Mastermix	5 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
RT Mix Enzyme (Reverse Transkriptase)	0,1 µl
H <sub>2</sub> O (RNase free)	1,9 µl

Im nächsten Schritt wurden 9 µl des Mastermix und jeweils 1 µl der zu untersuchenden Probe in technischen Duplikaten in eine 96-Well Lightcyclerplatte pipettiert und mit einer Folie verschlossen. Abschließend wurde die Platte bei 400 x g kurz abzentrifugiert. Die qPCR erfolgte unter den in Tabelle 25 beschriebenen Bedingungen.

Tabelle 25 RT-qPCR

Reaktionsschritt		Temperatur und Zeit
Reverse Transkription		50°C, 10 min
Denaturierung		95°C, 5 min
Zyklus (40x)	Denaturierung	95°C, 10 s
	Annealing	60°C, 10 s
	Elongation	72°C, 30 s
Schmelzkurven	95°C, 5 s	
	46°C, 10 s	
	Ramp-Rate 0,06°C/s auf 95°C final	
Kühlung	Auf 40°C, 20 s	
	Danach 4°C	

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Lightcycler 480 Software, Version 1.5 von Roche für die Bestimmung der Cp-Werte sowie Schmelzkurven und Microsoft Excel Office 365 Pro Plus für die relative Quantifizierung nach Pfaffl (Pfaffl 2001, Abb. Formel). Die hierfür benötigte Bestimmung der Effizienz der PCR-Reaktion wurde mithilfe einer abnehmenden Verdünnungsreihe in 5 Schritten (1:2, 1:4, 1:8; 1:16, 1:32) und Berechnung anhand der Steigung einer Regressionsgeraden mit der Software Lightcycler 480 Software, Version 1.5 von Roche vorgenommen.

### 3.2.15 Transkriptomanalyse

In dieser Studie wurde die Transkriptomanalyse verwendet, um die differentielle Expression von Genen bei ID40  $\Delta ygfB$  im Vergleich zum Wildtyp darzustellen. Als Positivkontrolle diente ID40  $\Delta ygfB::Rha-YgfB$ . Die RNA für die Sequenzierung wurde aus jeweils 4 x 5 ml separat angesetzten LB-Subkulturen des Wildtyps, ID40  $\Delta ygfB$  und bei ID40  $\Delta ygfB::Rha-YgfB$  mit Zusatz von 0,01 % Rhamnose mit dem Quick-RNA™ Fungal/Bacterial MiniprepKit (Zymo Research) nach Protokoll des Herstellers extrahiert. Anschließend erfolgte ein DNase-Verdau mit 10 U rekombinanter DNase I (Roche), ~10-15 µg RNA ad 50 µl H<sub>2</sub>O pro Reaktion. Zur Feststellung möglicherweise auftretender RNA-Degradation

wurde der RNA Integrity Index mittels Agilent Bio Analyzer High Sensitivity DNA Assay durchgeführt. Darauf erfolgte eine RT-qPCR zur Feststellung der Vergleichbarkeit der Proben auf enthaltene RNA, der An- bzw. Abwesenheit von *ygfB* und der erfolgreichen Entfernung von DNA. Nach Kontrolle der Proben auf Eignung zur Sequenzierung (4.1.1) erfolgte die Depletion ribosomaler RNA und Präparation der RNA zur Sequenzierung mit dem Zymo-Seq RiboFree total RNA Library Prep Kit (Zymo Research). Hierzu wurden 2000 ng aufgereinigte RNA pro Probe eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte mittels Illumina NextSeq500 (2x75bp, MidOutput Flowcell). Nach Sequenzierung erfolgte ein Mapping der einzelnen Reads zum ID40 Referenzgenom (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/LR700248>) mit dem Subread-Paket in R [112]. Außerdem erfolgte eine Bestimmung der Anzahl der Reads pro Gen ebenfalls durch Subread. Die Analyse der Differential-Expression wurde mit DeSeq2 mit Shrinkage durchgeführt [113]. Die RNA-Extraktion, der DNase-Verdau, die Sequenzierung und die bioinformatische Auswertung erfolgten über das NGS Competence Center Tübingen durch Kristina Engesser und Angel Angelov.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Transkriptomanalyse von ID40 $\Delta ygfB$ im Vergleich mit ID40 Wildtyp

Bei der Suche nach Genen, die die Sensibilität gegenüber Meropenem und Cefepim in einem MDR-Stamm von *Pa* wiederherstellen, wurde neben vielen anderen Genen das Gen *ygfB* gefunden über dessen Funktion noch nichts bekannt war [105]. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass in Abwesenheit von YgfB bei dem untersuchten klinischen Isolat ID40 im Zusammenhang mit vermehrter Sensibilität gegenüber Antibiotika der  $\beta$ -Laktamgruppe eine Abnahme der Expression des Gens *ampC* steht. Das Gen *ampC* kodiert für eine  $\beta$ -Laktamase [105]. Um festzustellen, ob neben *ampC* noch weitere Gene Veränderungen in der Expression aufweisen, wurde für ID40  $\Delta ygfB$  eine Transkriptomanalyse mit Referenz zum WT und dem konditional

komplementierten Stamm ID40  $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB (Wachstum in Anwesenheit von 0,01 % Rhamnose zur Induktion der Expression von *ygfB*) durchgeführt.

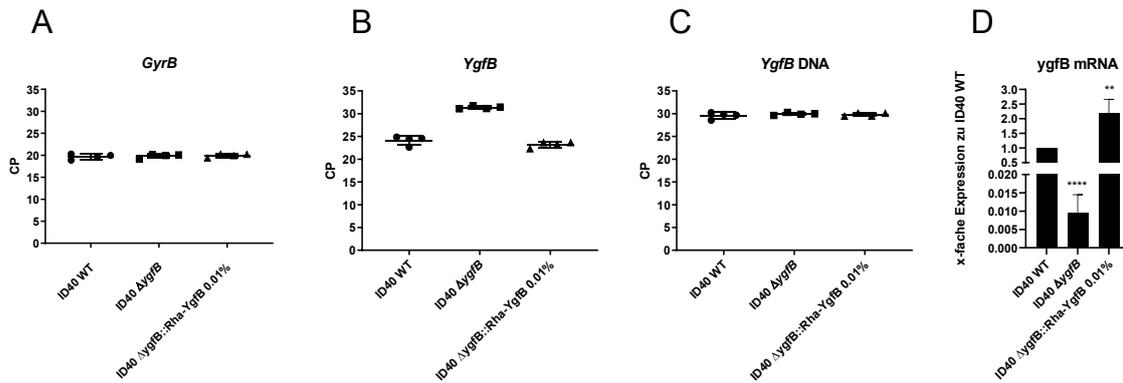
In diesem Stamm kann durch Zugabe von Rhamnose die Transkription von *ygfB* induziert werden [100]. Für die Transkriptomanalyse wurde die sogenannte RNA Sequenzierung, kurz auch als RNA Seq bezeichnet, verwendet [114, 115] Dazu erfolgte zunächst die Extraktion von RNA und die Überprüfung der Eignung der RNA für die Transkriptomanalyse (Vergleichbarkeit der Proben, Verifikation An-/Abwesenheit von *ygfB*, DNA Kontamination) (s. 4.1.1).

Teile der dargestellten Daten sind bereits publiziert. Dies ist zu Beginn des jeweiligen, betroffenen Abschnitts kenntlich gemacht. Abbildungen, welche auf bereits publizierten Daten basieren, die Darstellung der Daten jedoch abweicht sind ebenfalls kenntlich gemacht.

#### 4.1.1 Qualitätskontrolle der RNA

Die RNA wurde wie unter 3.2.12 beschrieben, vorbereitet. Zur abschließenden Qualitätskontrolle der RNA wurde vor der eigentlichen RNA-Seq eine RT-qPCR (s. 3.2.14) auf das Referenzgen *gyrB* (Abbildung 6A) und das Zielgen *ygfB* (Abbildung 6B) durchgeführt. Zusätzlich wurde zur Bestimmung möglicher DNA-Kontaminationen eine qPCR ohne Zugabe von reverser Transkriptase auf *ygfB* (Abbildung 6C) durchgeführt (Oligonukleotide s. Tabelle 11). Aus den ermittelten Cp-Werten von vier biologischen Replikaten für jeden Stamm wurde der jeweilige Mittelwert berechnet und mit GraphpadPrism8 graphisch dargestellt (Abbildung 6A-C). Für *gyrB* ergab dies bei ID40 WT einen Mittelwert von 19,69 (Standardabweichung  $\pm 0,59$ ), bei ID40  $\Delta ygfB$  einen Mittelwert von 19,83 (Standardabweichung  $\pm 0,51$ ) und ID40  $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB einen Mittelwert von 19,92 (Standardabweichung  $\pm 0,39$ ). Dies zeigt, dass die Proben vergleichbare Mengen an RNA enthielten. Für *ygfB* ergab dies bei ID40 WT einen Mittelwert

von 24,15 (Standardabweichung  $\pm 1$ ),



**Abbildung 6 RT-qPCR auf *gyrB* und *ygfB* der RNA-Proben für die Transkriptomanalyse.** A) Cp-Werte der RT-qPCR auf das Referenzgen *gyrB*. B) Cp-Werte der RT-qPCR für das Zielgen *ygfB*. C) RT-Kontrolle unter Verwendung der Primer zur Amplifikation von *ygfB*. Gezeigt sind die Daten von vier biologischen Replikaten und deren Mittelwert sowie die Standardabweichung (y-Achse) für den jeweiligen Stamm (x-Achse). D) Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von *ygfB* nach Pfaffl. Der Graph zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen. Für die Bestimmung auf statistisch signifikante Unterschiede der Mittelwerte wurde der ONE-Way-ANOVA Test verwendet (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ). Die Berechnungen und statistische Analysen erfolgten mit GraphpadPrism8 und Microsoft Excel 2010.

bei ID40  $\Delta ygfB$  einen Mittelwert von 31,35 (Standardabweichung  $\pm 0,31$ ) und für ID40  $\Delta ygfB::Rha-YgfB$  einen Mittelwert von 23,22 (Standardabweichung  $\pm 0,64$ ). Bei einem Cp-Wert von 31,35 ist von nicht vorhandener Zielsequenz bzw. unspezifischer Amplifizierung auszugehen, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass die Proben von ID40  $\Delta ygfB$  auch tatsächlich keine mRNA von *ygfB* und die Proben von ID40 WT sowie ID40  $\Delta ygfB::Rha-YgfB$  größere Mengen an *ygfB* mRNA enthalten. Dies konnte auch durch eine relative Quantifizierung der mRNA nach Pfaffl [116] von ID40  $\Delta ygfB$  und ID40  $\Delta ygfB::Rha-YgfB$  mRNA im Vergleich zum ID40 WT mRNA gezeigt werden (Abbildung 6D). Es ergab sich eine 0,009-fache verringerte *ygfB* mRNA Expression bei ID40  $\Delta ygfB$  bzw. eine 2-fach erhöhte *ygfB* mRNA Expression im Vergleich zum Wildtyp. Die qPCR auf *ygfB* DNA diente dem Ausschluss möglicher Kontamination der Proben mit DNA. Hierbei ergaben sich Cp-Werte von 29,59 ( $\pm 0,71$ ) für ID40 WT, 29,93 ( $\pm 0,28$ ) für ID40  $\Delta ygfB$  und 29,78 ( $\pm 0,36$ ) für ID40  $\Delta ygfB::Rha-YgfB$ , was für eine vergleichbare und sehr geringe DNA-Kontamination der verwendeten RNA in den untersuchten Proben spricht. Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass die RNA zur Verwendung bei einer Transkriptomanalyse mithilfe von RNA-

Seq in Bezug auf die in Abschnitt 4.1 genannten Kriterien geeignet ist. Somit konnte mit den Vorbereitungen zur Sequenzierung der RNA begonnen werden.

#### 4.1.2 RNA-Seq Ergebnisse

Die Dargestellten Daten sind publiziert in Eggers et al. 2023 [100]. Die Durchführung der Sequenzierung und die anschließende bioinformatische Auswertung erfolgten wie unter 3.2.15 beschrieben. Als Resultat nach durchgeführter Differenzialexpressionsanalyse ergaben sich in der *ΔygfB* Mutante neben dem Gen *ygfB* acht in der Expression signifikant veränderte Gene (s. Tabelle 26). Eine verringerte Expression zeigte sich lediglich für das Gen *ampC*. Eine Zunahme der Expression zeigte sich für die Gene des *alp*-Operons *alpBCDE*, die Gene TUEID40\_01945 und TUEID\_01954 sowie *ampDh3*. Bei genauerer Betrachtung kann man der Tabelle 26 entnehmen, dass sich die stärkste Zunahme für das Gen *ampDh3* zeigt, welches mit einem Wert von 42,83 mehr als vierfach so stark exprimiert ist wie das nächstfolgende Gen TUEID\_01954. Der größte Effekt zeigten sich also für *ampC* und *ampDh3*. Die geringe Anzahl an in der Expression veränderten Genen in der Differentialexpressionsanalyse verglichen zu anderen Experimenten dieser Art [117-120] ist erstaunlich und führte zu der Vermutung, dass es eine relativ eng umschriebene Wirkung von YgfB geben muss, möglicherweise als Bestandteil eines transkriptionellen Regelkreises. Um hier weitere Hinweise über die Funktion von YgfB und der Auswirkung bei Deletion zu erlangen, wurde analysiert, welche Rolle die regulierten Gene spielen und welche Funktion sie erfüllen. Für *ampC* ist dies wie bereits unter 4.1.1 beschrieben bekannt. Das Gen *ampC* kodiert für die  $\beta$ -Laktamase AmpC und die stark reduzierte *ampC* Expression in *ΔygfB* ist daher wahrscheinlich maßgeblich für den Effekt der Re-Sensibilisierung gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika verantwortlich. Mechanismen zur Regulation von AmpC sind bereits bekannt und näher erforscht. Der Peptidoglykan-Recycling-Pathway spielt hierbei eine entscheidende Rolle. So führt die Akkumulation von 1,6-anhydro-N-Acetylmuramyl-Peptiden (AnhydMurNAc-Peptide) zu einer Derepression des transkriptionellen Regulators AmpR, welche in der Folge eine vermehrte Expression von *ampC* nach sich zieht [121]. Interessanterweise steht AmpDh3, dessen mRNA die größte relative

Hochregulation in ID40  $\Delta ygfB$  aufweist, ebenfalls mit dem Peptidoglykanstoffwechsel in Zusammenhang. AmpDh3 ist eine Protease. In *Pa* gibt es noch zwei paraloge Enzyme dieser Familie, nämlich AmpD und AmpDh2 [97]. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass Sie in der Lage sind, von Peptidoglykan und dessen Abbauprodukten Peptide abzuspalten. Für AmpD ist eine Lokalisation im Zytoplasma wahrscheinlich, da es nur in der Lage ist, von 1,6-anhydro-N-acetylmuramyl-Peptiden die Seitenkette abzuspalten und diese Moleküle nur im Zytoplasma vorkommen [122]. AmpDh2 und AmpDh3 sind auch in der Lage, vom intakten Peptidoglykan die Peptidseitenketten abzuspalten. Eine Lokalisation wird für AmpDh2 wegen einer vorhandenen Signalsequenz als periplasmatisch angegeben; bei AmpDh3 wird die Lokalisation im Periplasma lediglich postuliert [97] und zwischenzeitlich ist die zytoplasmatische Lokalisation von AmpDh3 gezeigt [99, 100]. Für die Gene *alpB*, *alpC*, *alpD*, und *alpE* wurde eine etwa 2 bis 6,2-fache erhöhte mRNA Expression in der *ygfB* Deletionsmutante im Vergleich zu ID40 WT festgestellt. Die Gene des *alpBCDE*-Operons können funktionell eine Autolyse des Bakteriums *Pa* auslösen. Dieses Operon wird transkriptionell durch AlpR reguliert. Nach Spaltung des transkriptionellen Regulators AlpR kommt es zur Derepression des *alpA* Promotors und verstärkter *alpA* Expression. AlpA aktiviert wiederum die Transkription der BCDE-Gene. Die durch das *alpBCDE* Operon kodierten Proteine induzierte Autolyse in einer Subpopulation von *Pa* scheint die Virulenz der überlebenden *Pa* Erreger, wie in einem Lungeninfektionsmodell gezeigt, verstärken zu können [123].

**Tabelle 26 Ergebnisse der Differentialexpressionsanalyse**

Gen-Annotation	Genname/Funktion	ID40 $\Delta ygfB$ vs. ID40 WT	
		x-fache Änderung der Expression	adjustierter P-Wert
Kontrollbedingung			
TUEID40_03245	<i>ygfB</i>	0,07	$1,6 \times 10^{-15}$
Verringerte Expression			

TUEID40_04486	<i>ampC</i>	0,19	3,3 x 10 <sup>-4</sup>
Erhöhte Expression			
TUEID40_01840	<i>alpB</i>	2,58	0,04
TUEID40_01839	<i>alpC</i>	2,88	0,01
TUEID40_01838	<i>alpD</i>	6,15	0,03
TUEID40_01837	<i>alpE</i>	4	<0,005
TUEID40_1945	Gene encoding Glykosylase-like domain protein	3,73	0,0000337
TUEID40_01954	Hypothetisches Protein, TUEID_01954	9.96	6,3 x 10 <sup>-8</sup>
TUEID40_01955	<i>ampDh3</i>	42,83	4,4 x 10 <sup>-59</sup>

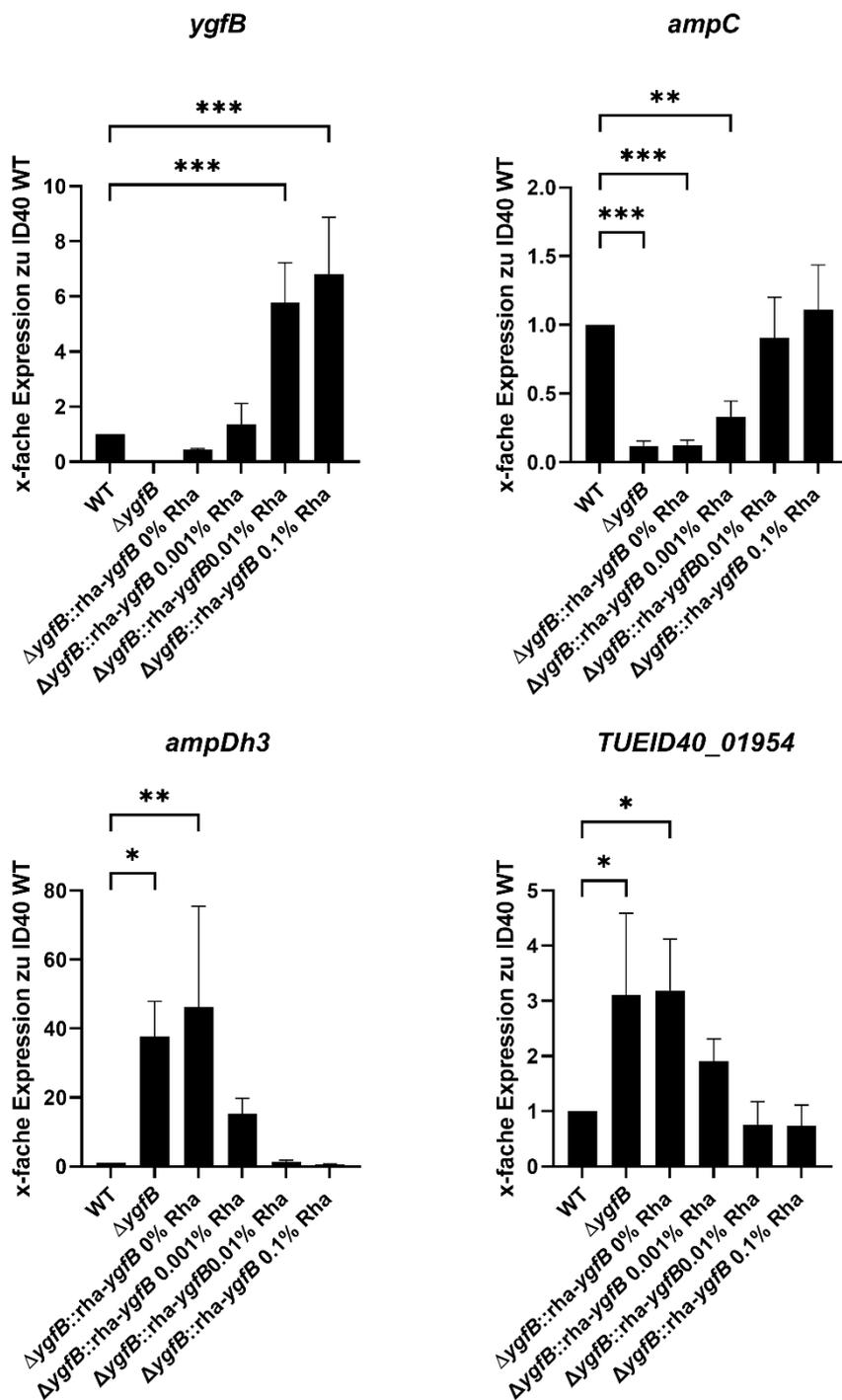
#### 4.1.3 Bestätigung der Transkriptomanalyse durch RT-qPCR

Die Dargestellten Daten sind publiziert in Eggers et al. 2023 [100]. Um die Ergebnisse der Transkriptomanalyse zu validieren, wurde eine RT-qPCR auf die Gene *ygfB*, *ampC*, *ampDh3*, TUEID\_01954, *alpB*, *alpC*, *alpD* und *alpE* wie unter 3.2.14 beschrieben durchgeführt.

Vor der RT-qPCR erfolgte die Gewinnung der RNA mit anschließendem DNase-Verdau, s. hierzu 3.2.12. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Software GraphPadPrism 8 Version 8.4.0. Die Ergebnisse wurden angelehnt an die Ergebnisse der Transkriptomanalyse gruppiert (s. Tabelle 26 und Tabelle 27). Die Experimente wurde mit n=3 biologischen Replikaten pro verwendetem Bakterienstamm durchgeführt. Verwendet wurden hierzu die Stämme ID40 WT, ID40  $\Delta ygfB$ , sowie als Kontrollbedingung, der mit *ygfB* komplementierte Stamm ID40  $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Induktors Rhamnose (0 %, 0,001 %, 0,01 % und 0,1). Nach der Deletion von *ygfB* konnte keine *ygfB* mRNA nachgewiesen werden. Allerdings zeigte der komplementierte Stamm ID40  $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB auch ohne Rhamnose Zugabe

eine schwache mRNA Expression. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass der Rhamnose-Promotor eine schwache basale Expression von *ygfB* zulässt. Zugabe von Rhamnose führt zu einer signifikanten Erhöhung der *ygfB* mRNA Expression. Für die *ampC*-, *ampDh3*- und TUE\_ID40\_01954-mRNA Expression konnten die Transkriptomdaten bestätigt werden. Die Deletion von *ygfB* führt zu einer signifikanten Reduktion der *ampC* Expression und zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA Expression des *ampDh3*-TUEID40\_01954 Operons. Die Komplementierungsexperimente zeigen, dass durch die Rhamnose-Gabe konzentrationsabhängig die *ampC*-mRNA Expression ansteigt und die *ampDh3* Expression abnimmt.

Damit konnte gezeigt werden, dass YgfB offensichtlich die *ampDh3* Expression reduzieren und eine *ampC* Expression erhöhen kann.



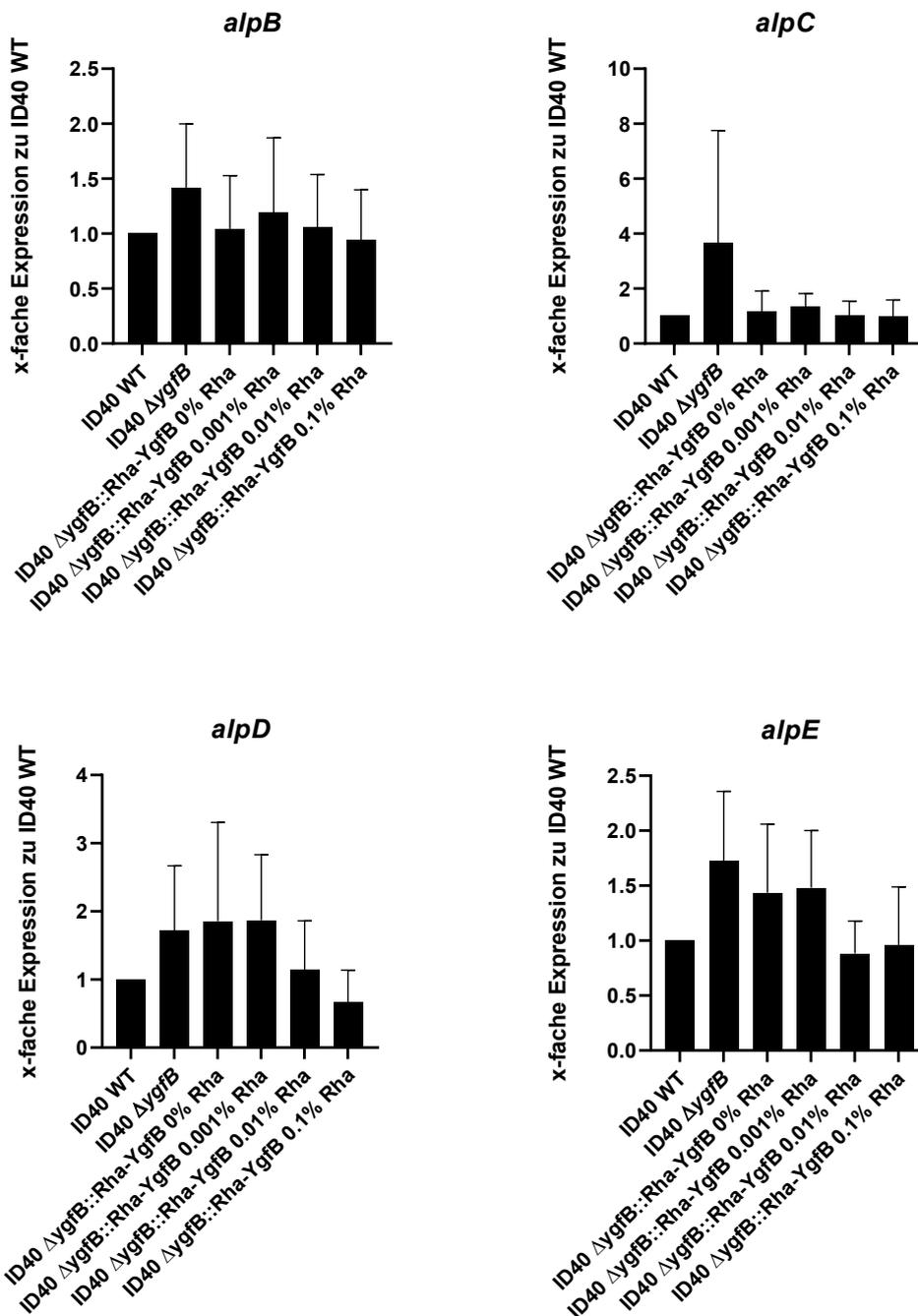
**Abbildung 7 Validierung der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für *ygfB*, *ampC*, *ampDh3* und *TUE\_ID40\_01954* durch RT-qPCR.** Ergebnisse der RT-qPCR für die Gene *ygfB*, *ampC*, *ampDh3* und *TUE\_ID40\_01954*. Die x-Achse bezeichnet den verwendeten Stamm mit entsprechender Mutation bzw. bei Komplementierung die zugegebene Menge an Rhamnose während der bakteriellen Anzucht. Die y-Achse zeigt die x-Fache Expression der mRNA des untersuchten Gens im Vergleich zum Wildtyp. Die statistische Testung auf Signifikanz erfolgte mittels ONE-Way-ANOVA Test (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,005$ , \*\*\*\* $p < 0,001$ ). Daten publiziert in Eggers et al. 2023 [100].

Die RT-qPCR, die zur Validierung der Ergebnisse für die Gene *ampC*, *ampDh3* und TUE\_ID40\_01954 durchgeführt wurde, bestätigt die Befunde der Transkriptomanalyse (Tabelle 26).

Tabelle 27 Vergleich der Transkriptomanalyse und ihrer Validierung über RT-qPCR für die Gene *ampC*, *ampDh3* und TUE\_ID40\_01954

Gen- Annotation	Genname	ID40 $\Delta$ <i>ygfB</i> zu ID40 WT			
		Transkriptomanalyse		RT-qPCR	
		x-fache Änderung der Expression	adjustierter p-Wert	x-fache Änderung der Expression (MW, n=3)	p-Wert
TUEID40_03245	<i>ygfB</i>	0,07	$1,6 \times 10^{-15}$	0,03	< 0,0001
TUEID40_04486	<i>ampC</i>	0,19	$3,3 \times 10^{-4}$	0,12	< 0,0001
TUEID40_01954	hypothetisches Protein, TUEID_01954	9,96	$6,3 \times 10^{-8}$	3,11	0,0036
TUEID40_01955	<i>ampDh3</i>	42,83	$4,4 \times 10^{-59}$	37,6	0,0021

Wie in Abbildung 8 dargestellt, konnte durch die RT-qPCR zudem eine leichte YgfB-abhängige Veränderung der mRNA-Expression des *alpBCDE*-Operons festgestellt werden. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 8 Analyse der *alpBCDE*-Expression über RT-qPCR.** Die verschiedenen Stämme wurden für 3h unter Zugabe verschiedener Konzentrationen von Rhamnose wie angegeben subkultiviert. Nach der RNA Isolierung wurden RT-qPCRs durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und SD des x-fachen Anstiegs im Vergleich zu ID40 WT von 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Testung auf Signifikanz erfolgte mittels ONE-Way-ANOVA. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen ID40 WT und den *ygfB* Mutanten nachgewiesen werden. Daten publiziert in Eggers et al. 2023 [100].

Der direkte Vergleich der Ergebnisse der Transkriptomanalyse mit denen der RT-qPCR zeigt noch einmal deutlich, dass die Deletion von *ygfB* keine

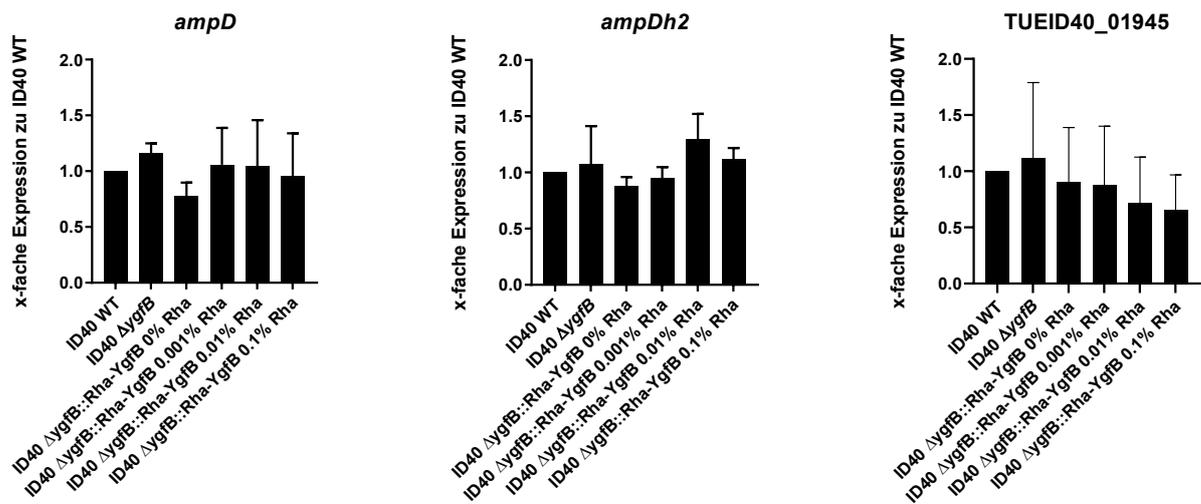
statistisch signifikante Veränderung der Expression der *alpBCDE*-Gene hervorruft.

Nun erfolgte noch eine Überprüfung des letzten in der Transkriptomanalyse gefundenen Gens TUEID40\_01945, welches für ein Glykosylase Like Domain Protein kodiert. Glykosylasen dienen der DNA Reparatur durch Exzision von Purin-/Pyrimidinbasen [124]. Die RT-qPCR ist in Abbildung 9 zu sehen. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression von TUEID40\_01945 im Vergleich von ID40 und ID40  $\Delta ygfB$ . Auch hier zeigt ein Vergleich der Ergebnisse der Transkriptomanalyse mit den in der RT-qPCR gefundenen Daten, dass durch die Deletion von *ygfB* keine statistisch signifikante Veränderung der Expression des Gens TUEID40\_01945 bewirkt.

Tabelle 28 Vergleich der Transkriptomanalyse und RT-qPCR, *alp*-Cluster und TUEID40\_01945

Gen Annotation	Bezeichnung	ID40 $\Delta ygfB$ zu ID40 WT			
		Transkriptomanalyse		Proof RT-qPCR	
		x-fache Änderun g der Expressi on	Adjustiert er p-Wert	x-fache Änderun g der Expressi on (MW, n=3)	adjustiert er p-Wert
TUE_ID40_01 840	<i>alpB</i>	2,58	0,04	1,42	0,7490
TUE_ID40_01 839	<i>alpC</i>	2,88	0,01	3,65	0,2791
TUE_ID40_01 838	<i>alpD</i>	6,15	0,03	1,72	0,7716
TUE_ID40_01 837	<i>alpE</i>	4	<0,005	1,72	0,2942
TUE_ID40_01 945	hypothetische s Protein, TUEID40_01 945	3,73	0,000033 7	1,12	0,8142

Da wie unter 4.1.2 beschrieben neben AmpDh3 noch weitere Proteasen in *Pa* vorhanden sind und diese auch in den Peptidoglykanstoffwechsel involviert sind, kam die Frage auf, ob diese ebenfalls im Rahmen der *ygfB*-Deletion erhöht sein könnten. Deshalb wurde zusätzlich mit den gleichen Stämmen eine RT-qPCR für die Gene *ampD* und *ampDh2* durchgeführt. Aufgrund der Transkriptomdaten wurde erwartet, dass sich durch die *ygfB* Deletion die Expression dieser Gene nicht verändert. Die Ergebnisse der RT-qPCR zeigt Abbildung 9. Für beide Gene konnte in der Tat keine signifikante Veränderung in der mRNA-Expression festgestellt werden.



**Abbildung 9** Expression von *ampD* und *ampDh2* sowie TUEID40\_01945 nach Deletion bzw. Komplementierung von *ygfB*. Expression der Gene *ampD*, *ampDh2* und TUEID40\_01945 für die Stämme ID40  $\Delta ygfB$  und ID40  $\Delta ygfB::Rha-YgfB$  mit steigenden Rhamnosekonzentrationen (0 %; 0,001 %; 0,01 %; 0,1 %) im Vergleich zum Wildtyp. Die statistische Analyse und Signifikanztestung erfolgte mittels ONE-Way-ANOVA und ergab keine signifikante Veränderung der relativen Expression von *ampD*, *ampDh2* und TUEID40\_01945 in ID40  $\Delta ygfB$  im Vergleich zum Wildtyp. Daten publiziert in Eggers et al. 2023 [100].

Durch die hier durchgeführten qRT-PCR Analysen konnten also für die Gene, *ampC*, *ampDh3*, TUEID40\_01954, *ampD* und *ampDh2* die Transkriptomdaten verifiziert werden. Für die Gene des *alp*-Clusters konnten ebenfalls Unterschiede in der Transkription zwischen WT und *ygfB* Deletion gezeigt werden. Allerdings sind diese Unterschiede nicht signifikant. Im weiteren Verlauf der Arbeit war deshalb eines der Ziele, den funktionellen Zusammenhang der drei Gene *ampC*, *ampDh3* und TUEID40\_01954 zu untersuchen, da diese auf genomischer Ebene Aufschluss über die Auswirkungen von YgfB geben könnten.

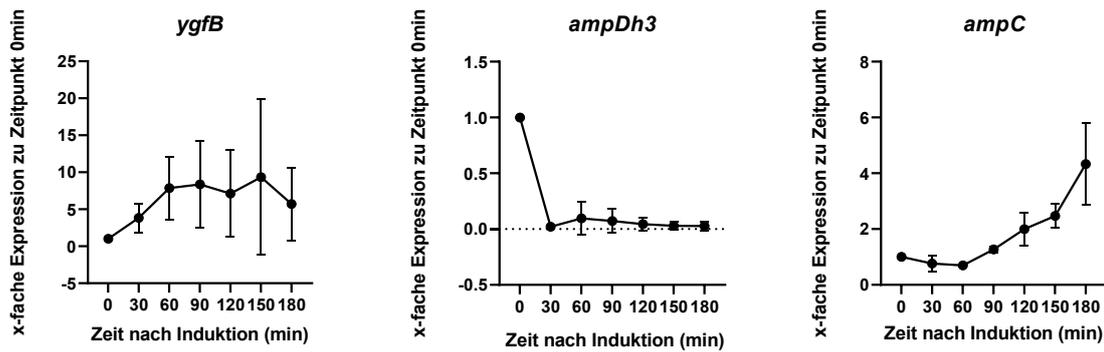
#### 4.2 Untersuchung des Zusammenhangs von *ygfB* mRNA Expression und der mRNA Expression von *ampDh3* und *ampC*

Ausgehend von den Ergebnissen der Transkriptomanalyse konnten drei durch das Gen *ygfB* regulierte Gene, nämlich *ampC*, *ampDh3* und TUE\_ID\_01954 (s. Tabelle 27) identifiziert werden und die durch *ygfB* vermittelte Änderung der mRNA Expression durch qRT-PCR bestätigt werden (s. Abbildung 7). Damit stellte sich die Frage, ob es zwischen der Expression dieser Gene einen Zusammenhang gibt. Dieser könnte sowohl temporär-kinetischer als auch funktionaler Natur sein. Um dies näher zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser

Arbeit eine Expressionskinetik für die Gene *ygfB*, *ampC*, *ampDh3* und TUEID\_01954 angefertigt.

#### 4.2.1 Untersuchung der *ampDh3* und *ampC* mRNA Expression im zeitlichen Verlauf nach Induktion von *ygfB* mRNA Expression

Die Dargestellten Daten sind publiziert in Eggers et al. 2023 [100]. Die Untersuchung eines möglichen zeitlichen Zusammenhangs wurde durch die Anfertigung einer Expressionskinetik durchgeführt. Als Methode diente hierbei die modifizierte qRT-PCR (s. 3.2.14) mit sieben Zeitpunkten für eine Probennahme während der dreistündigen Wachstumsphase der Subkulturen. Das Ergebnis der folgenden qRT-PCR für die Gene *ygfB*, *ampDh3* und *ampC* ist in Abbildung 10 zu sehen. Es zeigt sich eine Veränderung der Expression für *ygfB* bereits beim zweiten Entnahmezeitpunkt nach 30 min. Dieser geht einher mit einer reduzierten *ampDh3* mRNA Expression. Diese Veränderungen sind gefolgt von einer Zunahme der Expression von *ampC* zwischen 60 und 90 min. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass bei Aktivierung der Expression von *ygfB* im Stamm ID40  $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB nach Zugabe von Rhamnose mit Anstieg der Menge an *ygfB* mRNA eine mögliche Regulation des Gens *ampDh3* vorliegt, da die RNA von *ampDh3* infolge der Zunahme von YgfB abnimmt. Zeitlich verzögert folgt die Zunahme der *ampC* mRNA Expression. Ein möglicher Zusammenhang hätte sein können, dass *ygfB* durch eine negative Regulation von *ampDh3* zu einer Zunahme der Expression von *ampC* und damit einer Steigerung der  $\beta$ -Laktamaseexpression führt. Um zunächst jedoch auch den kausalen Zusammenhang der Regulation der Gene *ygfB*, *ampDh3* und *ampC* aufzuzeigen, wurden Deletionsmutanten für *ampDh3* sowie für *ampDh3* und *ygfB* im Stamm ID40 erstellt.

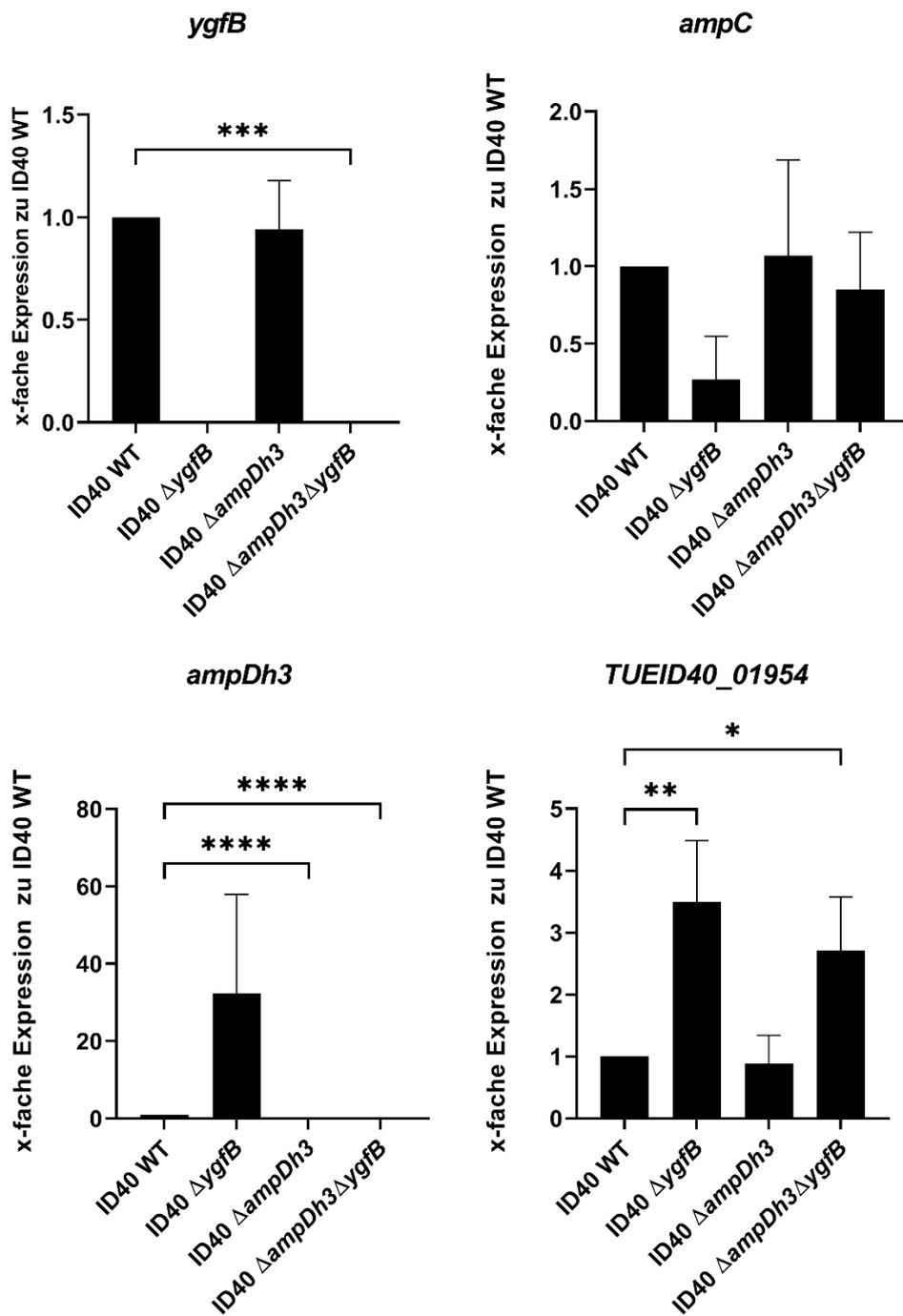


**Abbildung 10 Expressionskinetik von *ygfB*, *ampC* und *ampDh3*.** qRT-PCR Expressionsanalyse für die Gene *ygfB*, *ampDh3* und *ampC*. Zum Zeitpunkt 0 wurde zu dem Stamm ID40  $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB 0,1 % Rhamnose zugegeben. An den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils ein Teil der kultivierten Bakterien entnommen, RNA isoliert und mit diesen eine qRT-PCR durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des x-fachen Anstiegs der mRNA Expression im Vergleich zu Zeitpunkt 0 von drei unabhängigen Experimenten. Daten publiziert in Eggers et al. 2023 [100].

#### 4.2.2 Effekte der *ampDh3*-Deletion in ID40

Die Dargestellten Daten sind publiziert in Eggers et al. 2023 [100]. Die Herstellung der Mutanten ID40  $\Delta ampDh3$  und ID40  $\Delta ampDh3\Delta ygfB$  erfolgte wie unter 3.2.4 beschrieben durch Dr. Erwin Bohn. Die Stämme ID40, ID40  $\Delta ygfB$ , ID40  $\Delta ampDh3$  und ID40  $\Delta ampDh3\Delta ygfB$  wurden für drei Stunden subkultiviert und anschließend wurde die RNA Extraktion und qRT-PCR wie unter 3.2.14 beschrieben durchgeführt. Es wurde die mRNA-Expression der Gene *ygfB*, *ampC*, *ampDh3* und TUEID40\_01954 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 zu sehen. Die erfolgreiche Entfernung der Gene *ampDh3* bzw. *ygfB* konnte durch fehlende *ygfB* Expression in den Mutanten  $\Delta ygfB$  und  $\Delta ampDh3\Delta ygfB$  und fehlende *ampDh3* Expression in  $\Delta ampDh3$  und  $\Delta ampDh3\Delta ygfB$  nachgewiesen werden. Der entscheidende Faktor ist jedoch die Expression von *ampC*, da dieses Gen ausschlaggebend für den antibiotikasensiblen Phänotyp von ID40  $\Delta ygfB$  ist. Der Logik aus den Ergebnissen der Kinetik folgend, müsste durch Deletion von *ampDh3* die Expression von *ampC* gegenüber dem Stamm ID40 WT nicht verändert sein (zu sehen in Abbildung 9). Für ID40  $\Delta ampDh3\Delta ygfB$  zeigt sich ebenfalls keine signifikante Differenz des Mittelwertes zum Wildtyp. In Abwesenheit von *ampDh3* bleibt jedoch der negative Effekt auf die Expression von *ampC* aus. TUEID40\_01954 zeigt dagegen bei Deletion von *ygfB* in ID40  $\Delta ygfB$  und ID40

$\Delta ampDh3\Delta ygfB$  wiederum eine verstärkte Expression. Da TUEID40\_01954 auf dem gleichen Operon liegt wie *ampDh3* war dies zu erwarten. Die bei der Doppelmutante stattfindende Expression zeigt zudem die Funktionalität des Operons von *ampDh3* und TUEID40\_01954, da bei Deletion von *ygfB* eine Erhöhung von TUEID40\_01954 stattfindet, welche weitgehend unabhängig von *ampDh3* ist.



**Abbildung 11** qRT-PCR auf mRNA von *ygfB*, *ampC*, *ampDh3* und TUEID40\_01954 für die Stämme ID40 WT, ID40  $\Delta$ ygfB, ID40  $\Delta$ ampDh3, ID40  $\Delta$ ampDh3 $\Delta$ ygfB. Die genannten Pa Stämme wurden für 3h subkultiviert, geerntet, die RNA isoliert und anschließend qRT-PCRs durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung der x-fachen mRNA-Expression von drei unabhängigen Experimenten. Es wurde eine ANOVA Analyse durchgeführt. Sternchen geben signifikante Unterschiede im Vergleich zu ID40 WT an (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001). Daten publiziert in Eggers et al. 2023 [100].

Aus diesen Daten lässt sich zusammenfassend schlussfolgern, dass YgfB ursächlich durch Repression der *ampDh3* mRNA Expression eine erhöhte *ampC* mRNA Expression bewirkt.

#### **4.3 Charakterisierung der transkriptionellen Regulation von *ampDh3***

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Verringerung der Expression von *ampC* sowohl in temporärem als auch kausalem Zusammenhang mit dem Vorhandensein von *ygfB* steht. Des Weiteren geht der Verringerung von *ampC* eine Zunahme der Expression von *ampDh3* voraus. Daher war die nächste sich daraus ergebende Fragestellung, wie das Gen *ygfB* Einfluss auf die Expression von *ampDh3* nimmt. Denkbar wäre sowohl eine transkriptionelle als auch eine post-transkriptionelle Regulation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Möglichkeit der transkriptionellen Regulation näher untersucht.

##### **4.3.1 Generierung von *ampDh3*-Promotor-Nanoluc Konstrukten unterschiedlicher Länge**

Zu Beginn dieser Arbeit war der *ampDh3*-Promotor noch nicht charakterisiert. Um den *ampDh3* Promotor zu charakterisieren wurde ein Luciferase Reportersystem verwendet. Es wurden unterschiedlich lange 5'-flankierende Fragmente des putativen *ampDh3* Promotors mit dem Nanoluc-Luciferase-Gen fusioniert und in den Vektor pBBR1 kloniert. Das längste Fragment enthielt die Basenpaare -532 bis -1 (5'-flankierend den Startpunkt der kodierenden Sequenz; in Abbildung 12 bezeichnet als -532). Das kürzeste Fragment enthielt die Basenpaare -77 bis -1. Zur Bestimmung einer möglichen basalen Expression des Vektors wurde eine promotorlose Luciferase in pBBR1 kloniert (bezeichnet als 0). Insgesamt wurden 13 unterschiedlich lange Konstrukte sowie ein Konstrukt ohne *ampDh3* Promotor zur Standardisierung der Signalintensität erstellt (s. 3.2.10).

##### **4.3.2 Transformation in *Pa* ID40 $\Delta$ *ygfB*::Rha-YgfB**

Nun erfolgte die Transformation (s. 3.2.10) der erstellten Vektoren in den bereits vorhandenen Stamm ID40  $\Delta$ *ygfB*::Rha-YgfB, wodurch eine differenzierte Untersuchung der unterschiedlichen Abschnitte des *ampDh3* Promotors in An- und Abwesenheit von YgfB anhand der Lumineszenz durchgeführt werden konnte.

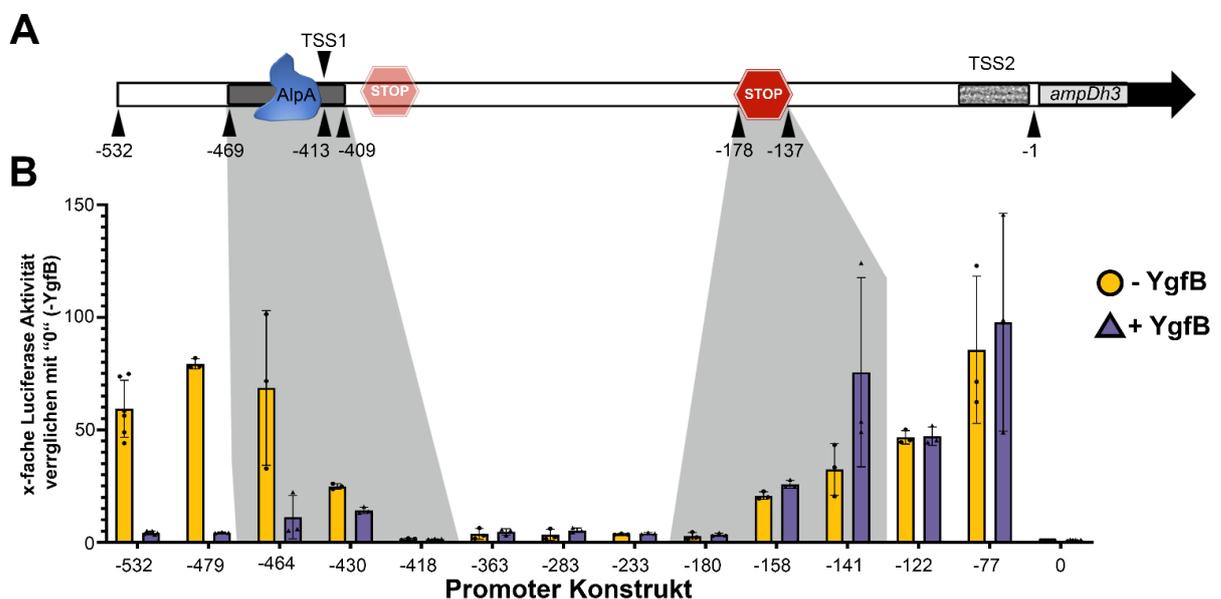
#### 4.3.3 Luciferase-Assay zum Nachweis der *ampDh3* Promotoraktivität in An- und Abwesenheit von YgfB

Die Dargestellten Daten sind publiziert in Eggers et al. 2023 [100]. Zuletzt erfolgte die Messung der Lumineszenz, um zu determinieren, in welchen Abschnitten des Promotors eine mögliche Regulation stattfindet (Methoden: Übernackkultur, Subkultur  $\pm$  Rhamnose, anschließende Lyse der Zellen, Zugabe von Substrat und Detektion im Tecanreader). Das Ergebnis ist in Abbildung 12A dargestellt. Das Promotorfragment, das die Basenpaare -77 bis -1 enthielt, führte zu einer starken transkriptionellen Aktivität sowohl ohne, als auch mit durch Rhamnose induzierter YgfB Produktion. Promotorfragmente bis zu einer Länge -158 bis -1 zeigten ebenfalls noch eine transkriptionelle Aktivität. Noch längere Promotorfragmente bis zu -418 bis -1 zeigten ebenfalls Rhamnose- bzw. YgfB-unabhängig eine Luciferaseaktivität, die ähnlich hoch war wie die des promotorlosen Luciferasekonstruktes. ID40  $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB Stämme, die Luciferase unter den Promotorfragmenten -464 bis -1, -479 bis -1 und -532 bis -1 exprimieren konnten, zeigten ohne Zugabe von Rhamnose eine hohe Luciferaseaktivität. Durch Zugabe von 0,1 % Rhamnose für 3h wurde die Luciferaseaktivität jedoch stark reduziert.

Daraus folgt, dass der *ampDh3* Promotor drei regulatorische Bereiche zu besitzen scheint. Ein Cis-Element im Bereich von -77 bis -1 scheint ausreichend für eine basale Transaktivierung zu sein, welche allerdings durch ein Cis-Element im Bereich zwischen etwa -141 und -180 unterdrückt werden kann. Diese Regulation scheint YgfB unabhängig zu erfolgen. Ein weiteres Cis-Element, das im Bereich zwischen -418 und -479 liegt, scheint für die YgfB vermittelte Regulation des *ampDh3* Promotors verantwortlich zu sein. Die Luciferasereporter-Experimente zeigen auf jeden Fall, dass der *ampDh3* Promotor durch YgfB transkriptionell reguliert wird.

Nachdem diese Experimente fertiggestellt waren, erschien eine Publikation, die half, die erhaltenen Daten neu zu bewerten [125]. Pena et al. definierten eine Promotorregion und eine Transkriptionsstartstelle an Position -410 (Abbildung 12). Weiterhin wurde eine Region definiert, an die der Transkriptionsfaktor AlpA

bindet: AlpA Bindestelle (ABS), etwa im Bereich zwischen -445 und -410. Im Bereich nach Position -385 und im Bereich zwischen -178 und -137 wurden zwei Terminatorregionen definiert, die die Transkription stoppen. Dies führte Pena et al. zu folgendem Modell: AlpA bindet an die ABS und wirkt als Antiterminator. Durch zusätzliche Bindung an die RNA Polymerase kann die Termination überwunden werden und es kommt zur Transkription. Nimmt man die eigenen Daten erneut in die Hand, wird nun klar, dass YgfB in dem gleichen Cis-Element die *ampDh3* Promotoraktivität unterdrückt, in dem AlpA zu binden scheint. Aufgrund der gezeigten Luciferaseexperimente wird auch klar, dass die Terminatorregion (tR) im Bereich zwischen -178 und -137 ausreichend zu sein scheint um die Promotoraktivität zu unterdrücken. In der Tat zeigen Pena et al., dass das putative tR Element im Bereich um -385 nur eine geringe Bedeutung hat. Von Pena et al. wurde nicht berichtet, dass ein Promotorelement zwischen -77 und -1 ausreichend ist, um in AlpA unabhängiger Weise eine transkriptionelle Aktivität zu erreichen.



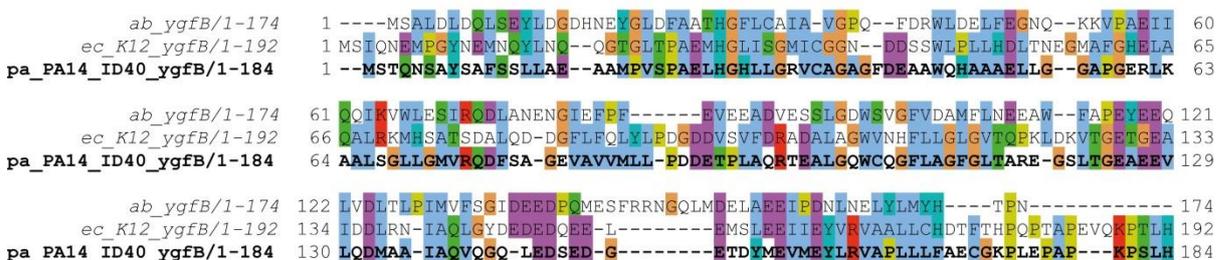
**Abbildung 12 Analyse des *ampDh3* Promotors.** A) Graphische Darstellung des *ampDh3* Promotors. Die Nummerierung unter dem grafisch dargestellten Promotor folgt der Kennzeichnung von Pena et al [125]. *ampDh3* bezeichnet hier den Transkriptionsstart, der dem *alpA* Promotorelement folgt. Die untere Nummerierung ist analog zur Bezeichnung der verwendeten Promotorkonstrukte und bezeichnet die Basenpaare unterhalb des Transkriptionsstarts von -1 bis -532 Basenpaare. Null bezeichnet hier den Start der kodierenden Sequenz von *ampDh3*. Blau markiert und graphisch dargestellt ist die AlpA-Bindestelle sowie die zwei putativen Terminationsstellen der Transkription in rot. TSS1 und TSS2 bezeichnen die potentiellen Transkriptionsstartstellen B) ID40  $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB Stämme, die *ampDh3*-Promotor-Luciferase

Konstrukte mit unterschiedlich langen Promotorfragmenten (längstes Fragment -532 bis -1 (-532)) fusioniert an ein Luciferasegen enthielten, wurden mit (lila, + YgfB) oder ohne (gelb, - YgfB) 0,1 % Rhamnose für 3 h kultiviert. Als Kontrolle wurde ein Stamm, der ein promotorloses Luciferasegen trägt, verwendet. Dargestellt ist der x-fache Anstieg (Mittelwerte und SD von mindestens drei unabhängigen Experimenten) der Luciferaseaktivität im Vergleich zu dem ohne Rhamnose kultivierten Stamm, der das promotorlose Fragment (0) trägt. Daten publiziert in Eggers et al. 2023 [100]. Creative Commons attribution License CC BY 4.0, Springer Nature, adaptierte Abbildung; Support ID [#8107850]

#### 4.4 Speziesübergreifender Vergleich von YgfB-Proteinen

##### 4.4.1 Sequenzhomologie verschiedener YgfB-Proteine in Gram-negativen Bakterien

Die Bezeichnung des hier untersuchten Gens, stammt von der hohen Sequenzübereinstimmung mit dem Protein YgfB von *E. coli*. Sequenzvergleiche, die mit dem Needleman-Wunsch Algorithmus durchgeführt wurden [126], ergaben eine Sequenzidentität von 18 % bei einem Vergleich von *Pa* ID40 mit *Acinetobacter baumannii* (Ab) und von *E. coli* K12 (Ec) mit Ab YgfB bzw. von 32.5 % bei einem Vergleich von *Pa* ID40 mit *E. coli* K12. Dieser Aminosäuresequenzvergleich ist in Abbildung 13 dargestellt.

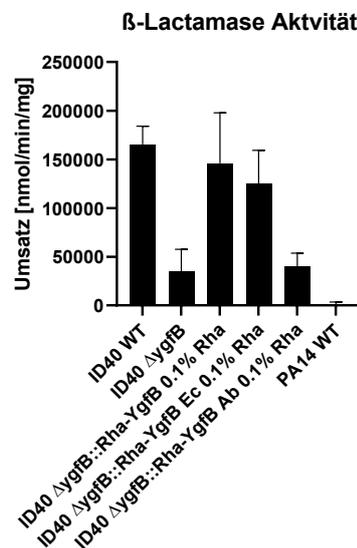


**Abbildung 13** Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Pa* ID40 YgfB, *E. coli* K12 YgfB und *A. baumannii* YgfB. Übereinstimmende Aminosäuren sind farblich markiert. Die prozentuale Identität wurde mithilfe des Needleman-Wunsch-Algorithmus berechnet. Die größte Übereinstimmung ergab sich für *Pa* ID40 und *E. coli* K12 mit 32,5 %. Für *A. baumannii* zeigten sich ein geringerer Wert von 18 %.

##### 4.4.2 Können *E. coli* und *A. baumannii* YgfB den Verlust von YgfB in *Pseudomonas aeruginosa* komplementieren?

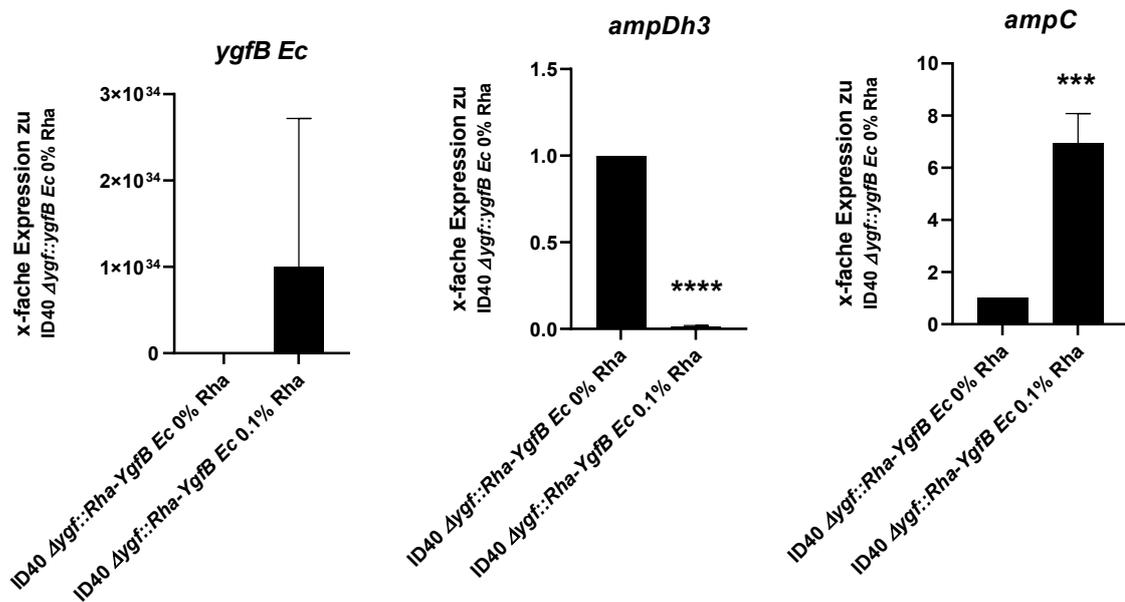
Um zu untersuchen, ob zwischen den YgfB-Proteinen unterschiedlicher bakterieller Spezies neben den Übereinstimmungen der Sequenz auch funktionelle Übereinstimmungen bestehen, wurden der Stamm ID40  $\Delta ygfB$  wie unter 3.2.9 beschrieben, jeweils mit *E. coli ygfB* bzw. *A. baumannii ygfB*

komplementiert. Als phänotypische Test zur Validierung der funktionellen Komplementierung wurde eine Quantifizierung der  $\beta$ -Laktamase-Aktivität durchgeführt. Dazu wurde das „**Beta-Lactamase Activity Colorimetric Assay Kit**“ von BioVision verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Induktion von *Pa* YgfB durch Rhamnose, sondern auch von *E. coli* YgfB zu einer Suppression der  $\beta$ -Laktamase Aktivität führt, s. Abbildung 14. Dieser Effekt konnte jedoch nicht bei einer Komplementierung mit *A. baumannii* YgfB beobachtet werden.



**Abbildung 14** Quantifizierung der  $\beta$ -Laktamaseaktivität von ID40 Stämmen komplementiert mit *ygfB* Genen von *E. coli* und *A. baumannii*. Die gekennzeichneten Stämme wurden für 3h subkultiviert. Die mit *ygfB* verschiedener Spezies komplementierten Stämme wurden unter Zugabe von 0,1 % Rhamnose kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien lysiert und mit einem Nitrocefin-Assay die  $\beta$ -Laktamaseaktivität gemessen. Die Abbildung zeigt Daten von drei unabhängigen Experimenten.

Im Weiteren wurde untersucht ob *E. coli* YgfB als Ersatz für *Pa* YgfB auch *ampC* und *ampDh3* mRNA Expression modulieren kann. Hierfür wurde mit RNA von einem mit und ohne 0.1 % Rhamnose kultiviertem *Pa* ID40  $\Delta$ ygfB::Rha-YgfB Ec RT-qPCRs durchgeführt. Tatsächlich kann die Induktion von *E. coli* YgfB ebenfalls die *ampDh3* Expression in *Pa* ID40 WT inhibieren und die *ampC* Expression induzieren, s. Abbildung 15. Trotz der großen Sequenzunterschiede deuten die Ergebnisse stark darauf hin, dass das *E. coli* YgfB funktionell das *Pa* YgfB vollständig ersetzen kann.



**Abbildung 15 Messung der Expression verschiedener Gene von einem mit *E. coli ygfB* komplementierten *Pa ID40 ΔygfB::Rha-YgfB Ec* -Stamm.** *Pa ID40ΔygfB::Rha-YgfB Ec* wurde jeweils mit und ohne 0,1 % Rhamnose für 3h kultiviert. Anschließend wurde RNA isoliert und qRT-PCRs durchgeführt. Der Mittelwert und die Standardabweichung SD des x-fachen Anstiegs der mRNA Expression für die gezeigte Gene von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Ein t-test wurde durchgeführt. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zu dem ohne Rhamnose kultivierten Stamm (\*\*\*)  $p < 0,005$ , \*\*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 5 Diskussion

In einer vorausgehenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *ygfB* zu einer verringerten Resistenz in dem eigentlich gegen  $\beta$ -Laktam Antibiotika resistenten *Pa* Stamm ID40 führt. Hierbei wurde auch gezeigt, dass die *ygfB* Deletion mit einer verringerten *ampC* mRNA Expression und  $\beta$ -Laktamase-Aktivität einher geht. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Anwesenheit von YgfB zu der höheren *ampC* mRNA Expression in ID40 beiträgt [105]. In der hier vorliegenden Arbeit sollten nun erste Experimente durchgeführt werden, um zu klären inwiefern YgfB zu einer hohen *ampC* mRNA Expression beiträgt.

### 5.1 Regulation der *ampC* Expression

Die *ampC* Expression wird durch Peptidoglykan-Fragmente reguliert, die während der Peptidoglykansynthese und dem Peptidoglykanrecycling entstehen.

Durch Antibiotika, die auf die Zellwandsynthese wirken, kann sich die Zusammensetzung und Menge dieser Peptidoglykan-Fragmente verändern. Mithilfe der Permease AmpG werden Muropeptidkatabolite wie GlcNAc-AnhydMurNAc-Peptide vom Periplasma in das Zytoplasma transportiert und durch das Enzym NagZ in AnhydMurNAc-Peptide umgewandelt. Diese AnhydMurNAc-Peptide werden dann durch die Amidase AmpD in AnhydMurNAc und Peptid gespalten. Aus diesen Fragmenten kann über verschiedene Wege das Molekül UDP-MurNAc-Pentapeptid synthetisiert werden, welches als Ausgangsbaustein für die Peptidoglykan Neusynthese dient [122]. Das Gleichgewicht von AnhydMurNAc-Peptiden und UDP-MurNAc-Pentapeptiden spielt eine zentrale Rolle für die Regulation der *ampC* mRNA Expression. Sowohl AnhydMurNAc-Peptide als auch UDP-MurNAc-Pentapeptide können an den transkriptionellen Aktivator AmpR binden. Während die Bindung von UDP-MurNAc-Pentapeptiden die Aktivität von AmpR reprimiert, führt die Verdrängung von UDP-MurNAc-Pentapeptiden durch AnhydMurNAc-Peptide zu einer Derepression von AmpR. AmpR kann nun an verschiedene Promotoren, wie z.B. den *ampC* Promotor binden und die Transkription von *ampC* und anderer Gene bewirken [127]. Für die Hyperproduktion von AmpC bei dem multiresistenten Stamm *Pa* ID40 scheint die Inaktivierung des Gens *dacB*, welches für das Penicillin-bindende Protein 4 (PBP4) kodiert, von Bedeutung zu sein. *Pa* ID40 trägt im *dacB* Gen eine Punktmutation, die für den Verlust der Funktionalität von PBP verantwortlich ist [105]. PBP4 hat eine Carboxypeptidasefunktion, die eine Aminosäure von Muropeptiden abspalten kann. Die *dacB* Inaktivierung führt dazu, dass vermehrt AnhydMurNAc-Pentapeptide und weniger AnhydMurNAc-Tripeptide vom Periplasma in das Cytoplasma transportiert werden [128]. Eine Studie von Torrens et al. [89] suggeriert, dass AnhydMurNAc-Pentapeptide ein stärkeres AmpC aktivierendes Potential besitzen, als AnhydMurNAc-Tripeptide [89]. Generell wurde gezeigt, dass Mutationen im *dacB* Gen die Ursache von Hyperresistenz sind [79]. Durch gezielte Deletion von *dacB* in dem Stamm PAO1 wurde z.B. gezeigt, dass dies die Resistenz von PAO1 gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika verstärkt [94].

Basierend auf diesen Kenntnissen wurde angenommen, dass YgfB auf eine bis dato unbekannte Weise in die Regulation der *ampC* Expression eingreift.

Um die Funktion von YgfB zu untersuchen wurden daher zunächst Transkriptomanalysen mit einem *Pa* ID40 WT Stamm und einer *ygfB* Deletionsmutante durchgeführt.

Durch diese Transkriptomanalysen konnte gezeigt werden, dass YgfB die mRNA Expression von ganz wenigen Genen moduliert, nämlich zum einen die Transkription der Gene des *ampDh3-TUEID40\_01954* Operons, von *ampC* und die der Gene des *alpBCDE* Operons. Durch qRT-PCR konnte tatsächlich bestätigt werden, dass YgfB die mRNA Expression von *ampDh3* und *TUEID40\_01954* signifikant supprimiert und von *ampC* signifikant erhöht. Der Einfluss auf die mRNA Expression auf das *alpBCDE* Operon scheint zumindest in dem Stamm *Pa* ID40 eher marginal zu sein.

## 5.2 Die YgfB-AmpDh3-AmpC Achse

*Pa* besitzt die drei paralogen Amidasen AmpD, AmpDh2 und AmpDh3 welche in der Lage sind, den Peptidstamm von Peptidoglykan-Intermediaten abzuspalten. Die Mutation von AmpD in *Pa* Stämmen ist ein häufiger Grund von erhöhter *ampC* Expression und  $\beta$ -Laktamresistenz in *Pa* Stämmen [93, 129]. Die Deletion von *ampD* führt zu einer Anreicherung von AnhydMurNAc-Peptiden und konsequenterweise zu erhöhten  $\beta$ -Laktamase-mengen. Laut Untersuchungen von Zhang et al. [97] hat AmpD, welches zytoplasmatisch lokalisiert ist, eine hohe Affinität zu AnhydMurNAc-Peptiden und spaltet diese in AnhydMurNAc plus Peptid. Es wurde gezeigt, dass AmpDh2 und AmpDh3 eine höhere Affinität zu größeren Peptidoglykanfragmenten besitzen und von diesen den Peptidstamm entfernen. Sie können aber mit geringerer Aktivität auch kleinere Peptidoglykanfragmente wie AnhydMurNAc-Peptide spalten. AmpDh2 besitzt eine Signalsequenz für den Transport in das Periplasma und ist dort lokalisiert. AmpDh3 besitzt keine Signalsequenz für den Transport ins Zytoplasma. Aufgrund der Affinität zu großen Peptidfragmenten wurde allerdings angenommen, dass AmpDh3 auch im Periplasma lokalisiert ist [97]. Dies scheint jedoch, wie später erläutert wird, nicht der Fall zu sein.

Frühere Untersuchungen zeigten, dass *ampC* Derepression von den AmpD Paralogen reguliert werden kann. Wenn alle drei Paraloge vorhanden sind, findet man eine basale *ampC* Expression. Eine Deletion von *ampD* führt zu einer erhöhten *ampC* mRNA Expression. Die zusätzliche Deletion einer weiteren Amidase führt zu einer weiteren Erhöhung der *ampC* Expression, die noch gesteigert werden kann, wenn alle drei Amidasen fehlen. Dies wirkt sich analog, je nachdem, wie viele Amidasen fehlen, auf die Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika aus [101].

Basierend auf diesen Vorarbeiten und den vorliegenden Transkriptomdaten wurde angenommen, dass YgfB durch die Repression der *ampDh3* mRNA Expression zu einer erhöhten  $\beta$ -Laktamresistenz beiträgt. Mithilfe einer konditionellen *ygfB* Deletionsmutante, die mit einem Rhamnose-induzierbaren Gen komplementiert wurde ( $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB), konnte tatsächlich gezeigt werden, dass eine erhöhte YgfB Produktion zu einer verringerten *ampDh3* Expression und zu einer erhöhten *ampC* Expression führt. Dies wird besonders deutlich, wenn man, wie hier durchgeführt, den zeitlichen Verlauf nach Gabe von Rhamnose betrachtet. Nach Gabe von Rhamnose kommt es in einer  $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB Mutante zunächst zu einem Anstieg der *ygfB* mRNA Expression. Dem folgt ziemlich unmittelbar eine Reduktion der *ampDh3* mRNA Expression. Zeitlich verzögert folgt dann der Anstieg der *ampC* mRNA Expression. Der kausale Zusammenhang zwischen einer YgfB vermittelten Suppression der *ampDh3* Expression und der daraus folgenden Erhöhung der *ampC* Expression konnte durch weitere Experimente dann bestätigt werden. Während es durch die *ygfB* Deletion zu einer Reduktion der *ampC* Expression kommt, wird durch die zusätzliche Deletion von *ampDh3* die *ampC* Expression wieder auf das Niveau eines Wildtypstammes gebracht. Dieses Experiment zeigte klar, dass die YgfB vermittelte Repression von *ampDh3* Expression ursächlich dafür verantwortlich ist, dass YgfB einen Beitrag zu einer erhöhten *ampC* Expression leisten kann. In begleitenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Christoph Mayer (Universität Tübingen) konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Deletion von *ygfB* zu einer verringerten Anreicherung von AnhydMurNAc-Peptiden im Zytoplasma führt [100].

Daraus lässt sich ein erstes Arbeitsmodell entwickeln: YgfB reprimiert die Produktion von AmpDh3. Die reduzierte Menge an AmpDh3 führt dazu, dass sich im Zytoplasma größere Mengen an AnhydMurNAc-Peptiden anreichern. Dies wiederum führt zu einer stärkeren Transaktivierung des *ampC* Promotors durch AmpR. Die erhöhte *ampC* Expression führt letztendlich, wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, zu einer erhöhten  $\beta$ -Laktamase Aktivität.

### 5.3 Transkriptionelle Regulation des *ampDh3* Promotors

Daran anschließend stellte sich die Frage, ob YgfB die Repression der *ampDh3* Expression posttranskriptionell oder transkriptionell bewirkt. Hierzu wurden mithilfe eines Luciferasereporters Promotoranalysen durchgeführt. Es wurde wieder die konditionelle  $\Delta ygfB::Rha$ -YgfB Mutante verwendet, in die Vektoren eingebracht wurden, die verschieden lange Promotorfragmente, fusioniert an die Luciferase trugen. Kurz nachdem diese Experimente durchgeführt worden waren, erfolgte eine Publikation, die zeigte, dass die Transaktivierung des *ampDh3* Promotors und des Promotors des *alpBCDE* Operons durch den Transkriptionsfaktor AlpA vermittelt wird [125]. AlpA transaktiviert fast exklusiv nur den *ampDh3* Promotor und den *alpBCDE* Promotor. Retrospektiv betrachtet stimmt diese Beobachtung perfekt mit den Transkriptomergebnissen überein, bei denen neben *ampDh3* auch noch Gene des *alp* Clusters gefunden wurden. Betrachtet man gemeinsam die eigenen Ergebnisse der Promotoranalysen und die Ergebnisse von Pena et al. [125], lässt sich feststellen, dass AlpA offensichtlich durch die Bindung an die AlpA Bindestelle (ABS) die *ampDh3* Expression bewirkt. Interessanterweise scheint das Cis-Element, durch das YgfB seine reprimierende Wirkung auf die *ampDh3* Expression ausübt, weitgehend mit dieser Region überein zu stimmen. Daraus ergibt sich die Frage ob YgfB mit AlpA um die Bindung an die ABS Stelle kompetitiert. Strukturanalysen, die von Dr. Fabian Renschler durchgeführt wurden, suggerieren, dass YgfB an seiner Oberfläche überwiegend negativ geladen ist. Daher wird eine direkte Bindung von YgfB an die negativ geladene DNA eher als unwahrscheinlich eingeschätzt. Eine Möglichkeit, wie YgfB mit der AlpA-Aktivierung des *ampDh3* Promotors interferieren könnte, wäre, dass YgfB an AlpA bindet und so die Bindung von AlpA an die ABS verhindert. Dies konnte tatsächlich in dieser Arbeit

nachfolgenden Experimenten gezeigt werden [100]. Neben der ABS-Stelle wurden von Pena et al. zwei Terminatorregionen beschrieben. An diesen Terminatoren kommt es zu einem Stopp der Transkription durch die RNA-Polymerase. Untersuchungen von Pena et al. zeigen, dass primär die Terminatorregion im Bereich zwischen -178 und -137 bp vor dem Start der kodierenden Sequenz (CDS) zum Stoppen der Transkription führt [125]. In eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein *ampDh3* Promotor-Fragment welches die bp -180 bis -1 umfasst, nicht ausreicht um eine Luciferaseaktivität hervorzurufen. Diese Beobachtung stimmt also mit den Ergebnissen von Pena et al überein [125]. Allerdings führt eine weitere Verkürzung des *ampDh3* Promotors (-77 bis -1) wieder zu einer starken Luciferaseaktivität (Transaktivierung). In diesem Fall kann die Transaktivierung jedoch nicht von YgfB reprimiert werden. Prinzipiell scheint es offensichtlich zwei Promotorbereiche zu geben, von denen die Transkription theoretisch gestartet werden kann. Im Gegensatz zu der ABS-Stelle ist der zweite Promotor nicht definiert und der Transkriptionsstartpunkt ist unklar. Hier sind weitere Untersuchungen nötig. Pena et al. [125] postulieren, dass nach der AlpA Bindung an die ABS, AlpA auch an die RNA Polymerase binden kann und durch diese Bindung der RNA Polymerase dieser ermöglicht über die Terminationsstellen hinwegzukommen und dadurch Transkription zu bewirken. Hieraus ergeben sich allerdings weitere Fragen, die zukünftig geklärt werden müssen: wie sehen die *ampDh3* mRNA Transkripte wirklich aus? Welche Bedeutung hat der zweite Promotorbereich und wo liegt dort ein möglicher weiterer Transkriptionsstart?

Ein weiterer interessanter Aspekt, den Pena et al. [125] aufgezeigt haben ist, dass es eine Kaskade gibt, die zur transkriptionellen Regulation des *ampDh3* Promotors führt: das Antibiotikum Ciprofloxacin führt zu einer DNA Schädigung über Hemmung der bakteriellen DNA-Gyrase [130]. Diese bewirkt auf unbekannte Weise die Selbstspaltung des Repressors AlpR. Nach Spaltung von AlpR, kann AlpR die Transkription von AlpA nicht mehr unterdrücken. Die dadurch verursachte Produktion von AlpA bewirkt dann eine gesteigerte Transkription von *ampDh3*. Eine synergistische antibiotische Wirkung von Ciprofloxacin und  $\beta$ -Laktamantibiotika ist schon lange bekannt [131-140]. Es gibt

verschiedene Studien, die zeigen, dass nicht in allen, aber in manchen *Pa* Stämmen durch eine Behandlung mit Ciprofloxacin und einem  $\beta$ -Laktamantibiotikum Resistenz gebrochen werden kann. Bereits 1986 konnte ein additiver Effekt *In vitro* und im Mausmodell von Ciprofloxacin mit  $\beta$ -Laktamantibiotika bei der Gabe von therapeutischen Dosen beobachtet werden, wobei sich schon zeigte, dass subinhibitorische Dosen von Mezlocillin/Azlocillin zu einer verstärkten Aktivität von Ciprofloxacin führten [131]. Eine weitere Studie zeigte in einem Infektionsmodell zur Sepsis durch *Pa* in Ratten einen synergistischen Effekt von Azlocillin mit Ciprofloxacin [132]. Die in verschiedenen Studien untersuchten Kombinationen von Fluorchinolonen, meist Ciprofloxacin und  $\beta$ -Laktamantibiotika *in vitro* bei mehreren klinischen *Pa* Isolaten unterschiedlicher Resistenzprofile und konnten synergistische oder zumindest additive Effekte feststellen, sowie eine verminderte Resistenzentwicklung gegenüber den Einzelsubstanzen [133-135]. Eventuell besteht sogar eine Verlängerung des postantibiotischen Effekts durch die Kombinationstherapie [136]. Fish et al. zeigten, dass die Kombination der beiden Antibiotikagruppen in *Pa* Isolaten mit Resistenz gegen eine der beiden Substanzen bei Verwendung von Konzentrationen entsprechend der Hälfte der MHK einen synergistischen, negativen Effekt auf das Wachstum der Keime hatte [137]. Auch bei MDR *Pa* Stämmen zeigte sich eine synergistische Wirkung der Fluorchinolon- $\beta$ -Laktam-Kombination mit Wachstumsinhibition über einen Zeitraum von vierundzwanzig Stunden [138]. Eine aktuellere Arbeit untersuchte den Synergismus in einem Biofilm-Modell für zwei hypermutable *Pa* Stämme, PAO  $\Delta mutS$  und CW 44 und beschreibt hier Verhinderung von Resistenzentstehung und Bakterizidie auch für Biofilm-Bildner bei einer Kombination von Ciprofloxacin mit Meropenem [139]. Auch eine Studie zu zwei XDR *Pa* Stämmen aus Patienten mit Diabetischem Fußsyndrom untersuchten die Auswirkungen von Meropenem und Ciprofloxacin mit Konzentrationen unterhalb der MHK und zeigten hier Verhinderung von Wachstum und Verringerung der MHK's für die Einzelsubstanzen sowie Antibiofilm-Aktivität [140]. Die hier durchgeführten Untersuchungen könnten langfristig ein neues Licht auf diesen Synergismus werfen. Als Szenario könnte man sich vorstellen, dass die durch Ciprofloxacin induzierte *alpA* mRNA

Expression zu einer erhöhten *ampDh3* Expression führt und dies final eine reduzierte *ampC* Expression bedingt und dadurch die Wirksamkeit von  $\beta$ -Laktamantibiotika einfach wiederhergestellt wird. Daraus ergeben sich weitere Fragen, die man in nachfolgenden Studien adressieren könnte. Wird *Pa* ID40 durch die Gabe subinhibitorischer Konzentrationen von Ciprofloxacin sensitiver gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika? Welche Rolle spielen hierbei AlpA, YgfB und AmpDh3? Nach dem jetzigen Stand scheint es tatsächlich so zu sein, dass die Kombination von Ciprofloxacin und  $\beta$ -Laktamantibiotika additiv die MHK-Werte von ID40 gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika verringern kann. Hierbei verhindert YgfB in AlpA/AmpDh3 abhängiger Weise, dass die Resistenz gegenüber verschiedenen  $\beta$ -Laktam Antibiotika wie Ceftazidim, Piperacillin, Imipenem und Aztreonam gebrochen wird [100]. YgfB könnte also quasi für *P. aeruginosa* Stämme einen Schutzmechanismus darstellen, der den negativen Einfluss von Ciprofloxacin auf die *ampC* Expression blockiert. Daraus ergibt sich die Frage ob es neben YgfB noch weitere solche Schutzmechanismen geben könnte.

#### **5.4 Das *alpBCDE* Cluster**

Wie bereits erwähnt, induziert der Transkriptionsfaktor AlpA die Expression der Gene *alpBCDE*. Mc Farland et al. beschreiben, dass es durch DNA Schädigung zur Selbstspaltung des transkriptionellen Regulators AlpR kommt [123]. Durch De-Repression des *alpA* Genes kommt es dann zur Expression der *alpBCDE* Lyse-Kassette. Dies kann in individuellen Zellen zu einer Art programmiertem Zelltod führen. In einem Lungeninfektionsmodell konnte gezeigt werden, dass es durch die Deletion dieser Lyse-Kassette zu einer Attenuierung der Lungeninfektion kommt [123]. Mc Farland et al. schlugen daher vor, dass Bakterien mit durch die Wirtsimmunantwort ausgelösten Schädigung der DNA in einer *Pa* Subpopulation eine Alp-vermittelte Zelllyse auslösen. Dies würde dann wiederum zu einer die Krankheit verstärkenden Antwort führen. Die Daten von Pena et al. [125] und die hier vorliegenden Daten zeigen, dass AlpA offensichtlich nur die Expression des *alpBCDE* und des *ampDh3-TUEID40\_01954* Operons induziert. Daher lässt sich spekulieren, dass die Induktion beider Cluster kein Zufall ist und möglicherweise als eine funktionelle Einheit zu begreifen wäre. Der sehr limitierte Einfluss von YgfB auf das Transkriptom war überraschend. Wie

bereits erwähnt, ist YgfB in vielen Proteobakterien konserviert. Eine Frage war daher ob das *ygfB* Gen aus anderen Spezies, wie hier untersucht, *E. coli* und *A. baumannii*, funktionell einen ID40  $\Delta$ *ygfB* Stamm komplementieren kann. Im Falle von *E. coli* ist das in der Tat möglich. *E. coli ygfB* supprimiert *ampDh3* mRNA und erhöht die *ampC* mRNA Expression. Ebenso kommt es zu einer erhöhten  $\beta$ -Laktamaseaktivität. Eine Komplementierung mit dem *A. baumannii ygfB* ist dagegen nicht möglich. Da die Ähnlichkeit mit *Ab ygfB* geringer ist als die von *Ec ygfB* mit *Pa ygfB* ist anzunehmen, dass die Unterschiede in der Aminosäuresequenz einfach zu groß sind um komplementierende Effekte zu ermöglichen. Interessanterweise ergaben *in silico* Untersuchungen, dass weder in *E. coli*-Stämmen noch in *A. baumannii*-Stämmen orthologe Gene von *ampDh3*, *alpA* bzw. dem *alpBCDE* Operon vorliegen. Bedenkt man das begrenzte Wirkspektrum von YgfB auf das Transkriptom, stellt sich natürlich die Frage, wofür YgfB in anderen Bakterienspezies benötigt wird. Das ist eine weitere Frage, die in Zukunft untersucht werden sollte.

## 6 Zusammenfassung

*Pseudomonas aeruginosa (Pa)* ist ein Gram-negatives Bakterium, welches vor allem nosokomiale Infektionen wie Pneumonie oder Sepsis verursacht. Ebenso bei Patienten mit Zystischer Fibrose kann die Besiedlung mit *Pa* ein lebensbedrohliches Problem darstellen. Weiterhin wird durch die ansteigende Anzahl von Resistenz gegen viele Antibiotika die therapeutische Behandlung einer *Pa* Infektion immer problematischer. Daher werden dringend neue Therapieansätze benötigt. Um solche Therapieansätze zu entwickeln, ist das Verstehen von Resistenzmechanismen sehr wichtig. Bei dem *Pa* Stamm ID40 handelt es sich um einen Stamm, der multi-resistent gegen  $\beta$ -Laktamantibiotika ist. Durch eine Punktmutation in dem *dacB* Gen kommt es bei diesem Stamm zu einer Hyperproduktion der  $\beta$ -Laktamase AmpC. In einer vorhergehenden Studie wurde untersucht, welche Gene ursächlich die  $\beta$ -Laktamresistenz von ID40 beeinflussen. Hierbei wurden vor allem Gene identifiziert, die einen Einfluss auf

das Peptidoglykanrecycling haben. Weiterhin wurde das uncharakterisierte Gen *ygfB* identifiziert. Die Deletion von *ygfB* in ID40 führt zu einer Reduktion der *ampC* Expression, der  $\beta$ -Laktamase Aktivität und konsequenterweise zu einer reduzierten Resistenz gegen verschiedene  $\beta$ -Laktam Antibiotika.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, wie YgfB zu einer erhöhten *ampC* Expression beiträgt. Mithilfe von RNA-Seq Transkriptomanalysen und quantitativer Reverse Transkriptase-qPCR konnte durch den Vergleich von *Pa* ID40 WT mit einer *ygfB* Deletionsmutante gezeigt werden, dass YgfB die Transkription der Amidase *ampDh3* signifikant reprimiert und die Expression der  $\beta$ -Laktamase *ampC* erhöht wird. Weiterhin konnte eine leichte Hemmung des sogenannten *alpBCDE* Operons festgestellt werden. Durch zusätzliche Deletion von *ampDh3* in der *ygfB* Deletionsmutante konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen YgfB-vermittelter Hemmung der *ampDh3* Expression und YgfB-vermittelter Erhöhung der *ampC* Expression hergestellt werden. Orthologe YgfB Proteine kommen in vielen  $\gamma$ -Proteobakterien mit unterschiedlicher hoher Aminosäuresequenzidentität vor. So ist die Aminosäuresequenzidentität mit YgfB von *E. coli* mit 32.5% und mit *A. baumannii* 18%. Mit Hilfe von Komplementierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Homologie von *E. coli* YgfB aber nicht von *A. baumannii* YgfB ausreichend ist das *Pa* YgfB für die Repression der *ampDh3* Expression und Erhöhung der  $\beta$ -Lactamase Aktivität, zu ersetzen.

AmpDh3 ist eine Amidase, die von Peptidoglykanfragmenten den Peptidstamm abspaltet. Dies hat wie in nachfolgenden Studien gezeigt wurde zur Folge, dass durch AmpDh3 bestimmte Muropeptide (1,6-anhydro-*N*-Acetylmuramyl-peptide) gespalten werden, die den die *ampC*-Expression induzierenden Transkriptionsfaktor AmpR positiv regulieren. YgfB dagegen inhibiert die AmpDh3 Produktion und verringert dadurch die Spaltung dieser Muropeptide, was zu einer verstärkten AmpR-induzierten *ampC* Expression führt.

*ampDh3* Promotoranalysen zeigten, dass YgfB die *ampDh3* Expression auf transkriptioneller Ebene hemmt. Es konnte grob die Region im *ampDh3* Promotor

definiert werden, die benötigt wird, damit YgfB die *ampDh3* Transaktivierung inhibieren kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der vorliegenden Studie zum allerersten Mal dem Protein YgfB eine Funktion, nämlich die der negativen Regulation der *ampDh3* mRNA Expression, zugeordnet werden konnte. Weiterhin stellte diese Studie die Basis für weitere Studien dar. Diese weiterführenden Studien und die Erkenntnisse von Pena et al. führten letztendlich zur Aufklärung eines komplexen Signalwegs: *ampDh3* Expression wird durch den Antiterminator AlpA positiv reguliert. AlpA bindet an die AlpA-Binde-Stelle (ABS), welche identisch ist mit der Stelle die in der vorliegenden Arbeit als der Bereich identifiziert wurde, der zur YgfB vermittelten Repression der *ampDh3* Promotoraktivität führt. Eine erhöhte AmpDh3 Produktion führt zum verstärkten Abbau von AnhydMurNAc-Peptiden und somit zu einer reduzierten *ampC* Expression bzw.  $\beta$ -Laktamase Aktivität und nachfolgender geringerer Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika. YgfB wirkt diesem Prozess entgegen, in dem es direkt an AlpA bindet und so die Bindung von AlpA an das ABE verhindert und letztendlich die *ampDh3* Expression reprimiert. Die Repression der *ampDh3* Expression trägt dann letztendlich zur erhöhten  $\beta$ -Laktamresistenz bei.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Zopf. *Bacillus pyocyanea*. 1884 [cited 2021 03-12]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=287>.
2. Fu, T., et al., *Evolution of Resistance to Phenazine Antibiotics in Staphylococcus aureus and Its Role During Coinfection with Pseudomonas aeruginosa*. ACS Infectious Diseases, 2021. **7**(3): p. 636-649.
3. Son, M.S., et al., *In vivo evidence of Pseudomonas aeruginosa nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients*. Infect Immun, 2007. **75**(11): p. 5313-24.
4. Marvig, R.L., et al., *Within-host evolution of Pseudomonas aeruginosa reveals adaptation toward iron acquisition from hemoglobin*. mBio, 2014. **5**(3): p. e00966-14.
5. Toder, D.S., et al., *lasA and lasB genes of Pseudomonas aeruginosa: analysis of transcription and gene product activity*. Infect Immun, 1994. **62**(4): p. 1320-7.
6. Lyczak, J.B., C.L. Cannon, and G.B. Pier, *Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist*. Microbes Infect, 2000. **2**(9): p. 1051-60.
7. Saito, R., et al., *Specific interactions between the alkaline protease of P. aeruginosa and its natural peptide inhibitor: ab initio molecular simulations*. Journal of Molecular Modeling, 2021. **28**(1): p. 10.

8. Bastaert, F., et al., *Pseudomonas aeruginosa LasB Subverts Alveolar Macrophage Activity by Interfering With Bacterial Killing Through Downregulation of Innate Immune Defense, Reactive Oxygen Species Generation, and Complement Activation*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 1675.
9. Speert, D.P., et al., *Pseudomonas aeruginosa colonization of the gastrointestinal tract in patients with cystic fibrosis*. *J Infect Dis*, 1993. **167**(1): p. 226-9.
10. Kulczycki, L.L., T.M. Murphy, and J.A. Bellanti, *Pseudomonas colonization in cystic fibrosis. A study of 160 patients*. *Jama*, 1978. **240**(1): p. 30-4.
11. Ohara, T. and K. Itoh, *Significance of Pseudomonas aeruginosa colonization of the gastrointestinal tract*. *Intern Med*, 2003. **42**(11): p. 1072-6.
12. Agodi, A., et al., *Pseudomonas aeruginosa carriage, colonization, and infection in ICU patients*. *Intensive Care Medicine*, 2007. **33**(7): p. 1155-1161.
13. Bel Hadj Ahmed, A., et al., *Characterization of Pseudomonas aeruginosa isolated from various environmental niches: New STs and occurrence of antibiotic susceptible "high-risk clones"*. *Int J Environ Health Res*, 2020. **30**(6): p. 643-652.
14. Crone, S., et al., *The environmental occurrence of Pseudomonas aeruginosa*. *Apmis*, 2020. **128**(3): p. 220-231.
15. Slekovec, C., et al., *Tracking down antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates in a wastewater network*. *PLoS One*, 2012. **7**(12): p. e49300.
16. Al-Saleh, E. and A. Akbar, *Occurrence of Pseudomonas aeruginosa in Kuwait soil*. *Chemosphere*, 2015. **120**: p. 100-7.
17. Diggle, S.P. and M. Whiteley, *Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat*. *Microbiology (Reading)*, 2020. **166**(1): p. 30-33.
18. Thi, M.T.T., D. Wibowo, and B.H.A. Rehm, *Pseudomonas aeruginosa Biofilms*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. **21**(22): p. 8671.
19. Fujitani, S., et al., *Pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source*. *Chest*, 2011. **139**(4): p. 909-919.
20. Berra, L., J. Sampson, and J. Wiener-Kronish, *Pseudomonas aeruginosa: acute lung injury or ventilator-associated pneumonia? Minerva Anesthesiol*, 2010. **76**(10): p. 824-32.
21. Kitagawa, K., et al., *Bacteremia complicating urinary tract infection by Pseudomonas aeruginosa: Mortality risk factors*. *Int J Urol*, 2019. **26**(3): p. 358-362.
22. Crouch Brewer, S., et al., *Ventilator-associated pneumonia due to Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*, 1996. **109**(4): p. 1019-29.
23. Bodey, G.P., et al., *Infections caused by Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*, 1983. **5**(2): p. 279-313.
24. Srivastava, P. and K. Sivashanmugam, *Combinatorial Drug Therapy for Controlling Pseudomonas aeruginosa and Its Association With Chronic Condition of Diabetic Foot Ulcer*. *Int J Low Extrem Wounds*, 2020. **19**(1): p. 7-20.
25. Reñé, R., et al., *Otitis externa maligna and cranial neuropathy*. *Neurologia*, 1990. **5**(7): p. 222-7.
26. Reid, T.M. and I.A. Porter, *An outbreak of otitis externa in competitive swimmers due to Pseudomonas aeruginosa*. *J Hyg (Lond)*, 1981. **86**(3): p. 357-62.
27. Hoadley, A.W. and D.E. Knight, *External otitis among swimmers and nonswimmers*. *Arch Environ Health*, 1975. **30**(9): p. 445-8.
28. Hilliam, Y., S. Kaye, and C. Winstanley, *Pseudomonas aeruginosa and microbial keratitis*. *J Med Microbiol*, 2020. **69**(1): p. 3-13.
29. Tofas, P., et al., *Pseudomonas aeruginosa bacteraemia in patients with hematologic malignancies: risk factors, treatment and outcome*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2017. **88**(4): p. 335-341.

30. Kujath, K., et al., *Severe disease activity and complications of immunosuppressive therapy: a challenge for acute hospital-based rehabilitation in rheumatology*. J Rheumatol, 2009. **36**(8): p. 1618-25.
31. Jeddi, R., et al., *Risk factors of septic shock in patients with hematologic malignancies and Pseudomonas infections*. Hematology, 2011. **16**(3): p. 160-5.
32. Rossi, E., et al., *Pseudomonas aeruginosa adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis*. Nature Reviews Microbiology, 2021. **19**(5): p. 331-342.
33. Pedersen, S.S., *Lung infection with alginate-producing, mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis*. APMIS Suppl, 1992. **28**: p. 1-79.
34. Parkins, M.D., R. Somayaji, and V.J. Waters, *Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal Pseudomonas aeruginosa Infections in Cystic Fibrosis*. Clin Microbiol Rev, 2018. **31**(4).
35. Aslanhan, U., et al., *Pseudomonas aeruginosa colonization in cystic fibrosis: Impact on neutrophil functions and cytokine secretion capacity*. Pediatr Pulmonol, 2021. **56**(6): p. 1504-1513.
36. Briskot, G., K. Taraz, and H. Budzikiewicz, *Pyoverdinin-type siderophores from Pseudomonas aeruginosa*. Z Naturforsch C J Biosci, 1986. **41**(5-6): p. 497-506.
37. Brandel, J., et al., *Pyochelin, a siderophore of Pseudomonas aeruginosa: physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes*. Dalton Trans, 2012. **41**(9): p. 2820-34.
38. Cartron, M.L., et al., *Feo--transport of ferrous iron into bacteria*. Biometals, 2006. **19**(2): p. 143-57.
39. Wilson, B.A. and R.J. Collier, *Diphtheria toxin and Pseudomonas aeruginosa exotoxin A: active-site structure and enzymic mechanism*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **175**: p. 27-41.
40. Hughes, A.J., et al., *ASC acts in a caspase-1-independent manner to worsen acute pneumonia caused by Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol, 2018. **67**(8): p. 1168-1180.
41. Roy-Burman, A., et al., *Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic Pseudomonas aeruginosa infections*. J Infect Dis, 2001. **183**(12): p. 1767-74.
42. Reboud, E., et al., *Exolysin Shapes the Virulence of Pseudomonas aeruginosa Clonal Outliers*. Toxins (Basel), 2017. **9**(11).
43. Pinto, A.F., et al., *Identification of Inhibitors of Pseudomonas aeruginosa Exotoxin-S ADP-Ribosyltransferase Activity*. J Biomol Screen, 2016. **21**(6): p. 590-5.
44. Foulkes, D.M., et al., *A pipeline to evaluate inhibitors of the Pseudomonas aeruginosa exotoxin U*. Biochem J, 2021. **478**(3): p. 647-668.
45. Liu, P.V., *Extracellular Toxins of Pseudomonas aeruginosa*. THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, 1974. **VOL. 130**.
46. Woods, D.E., et al., *Phenotypic comparison of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a variety of clinical sites*. J Clin Microbiol, 1986. **24**(2): p. 260-4.
47. Gellatly, S.L. and R.E.W. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses*. Pathogens and Disease, 2013. **67**(3): p. 159-173.
48. Wilson, R., et al., *Measurement of Pseudomonas aeruginosa phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium*. Infect Immun, 1988. **56**(9): p. 2515-7.
49. Lauredo, I.T., et al., *Mechanism of pyocyanin- and 1-hydroxyphenazine-induced lung neutrophilia in sheep airways*. J Appl Physiol (1985), 1998. **85**(6): p. 2298-304.
50. Lau, G.W., et al., *The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection*. Trends in Molecular Medicine, 2004. **10**(12): p. 599-606.

51. Hao, Y., et al., *Pyocyanin-induced mucin production is associated with redox modification of FOXA2*. Respiratory Research, 2013. **14**(1): p. 82.
52. Morin, C.D., et al., *An Organ System-Based Synopsis of Pseudomonas aeruginosa Virulence*. Virulence, 2021. **12**(1): p. 1469-1507.
53. Read, R.C., et al., *Effect of Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating*. J Appl Physiol (1985), 1992. **72**(6): p. 2271-7.
54. Burrows, L.L., *Pseudomonas aeruginosa twitching motility: type IV pili in action*. Annu Rev Microbiol, 2012. **66**: p. 493-520.
55. Bouteiller, M., et al., *Pseudomonas Flagella: Generalities and Specificities*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(7).
56. Mizuno, T. and M. Kageyama, *Isolation and characterization of major outer membrane proteins of Pseudomonas aeruginosa strain PAO with special reference to peptidoglycan-associated protein*. J Biochem, 1979. **86**(4): p. 979-89.
57. Duchesne, R., et al., *A proteomic approach of SigX function in Pseudomonas aeruginosa outer membrane composition*. J Proteomics, 2013. **94**: p. 451-9.
58. Institut, R.K. [cited 2021 05-11]; Available from: <https://ars.rki.de/Content/Database/PathogenOverview.aspx>.
59. CDC Pseudomonas aeruginosa. [cited 2021 26-11]; Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>.
60. Cassini, A., et al., *Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis*. Lancet Infect Dis, 2019. **19**(1): p. 56-66.
61. Reardon, S. *WHO warns against 'post-antibiotic' era*. Nature 2014 2014/04/30; Available from: <https://doi.org/10.1038/nature.2014.15135>.
62. WHO. *Urgently needed Antibiotics*. [cited 2021 17-11]; Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
63. Penalva, G., et al., *Decreasing and stabilising trends of antimicrobial consumption and resistance in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in segmented regression analysis, European Union/European Economic Area, 2001 to 2018*. Euro Surveill, 2019. **24**(46).
64. Zakuan, Z.D. and K. Suresh, *Rational use of intravenous polymyxin B and colistin: A review*. Med J Malaysia, 2018. **73**(5): p. 351-359.
65. Apisarnthanarak, A. and L.M. Mundy, *Use of high-dose 4-hour infusion of doripenem, in combination with fosfomycin, for treatment of carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa pneumonia*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(11): p. 1352-4.
66. Horcajada, J.P., et al., *Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Infections*. Clinical Microbiology Reviews, 2019. **32**(4): p. e00031-19.
67. Zhanel, G.G., et al., *Cefiderocol: A Siderophore Cephalosporin with Activity Against Carbapenem-Resistant and Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli*. Drugs, 2019. **79**(3): p. 271-289.
68. Ude, J., et al., *Outer membrane permeability: Antimicrobials and diverse nutrients bypass porins in Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2021. **118**(31): p. e2107644118.
69. Nikaido, H., *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(4): p. 593-656.
70. Winsor, G.L., et al., *Enhanced annotations and features for comparing thousands of Pseudomonas genomes in the Pseudomonas genome database*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(D1): p. D646-53.

71. Chevalier, S., et al., *Structure, function and regulation of Pseudomonas aeruginosa porins*. FEMS Microbiol Rev, 2017. **41**(5): p. 698-722.
72. Ivanov, M.E., N.K. Fursova, and V.D. Potapov, *Pseudomonas aeruginosa efflux pump superfamily (review of literature)*. Klin Lab Diagn, 2022. **67**(1): p. 53-58.
73. Poole, K., *Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa and related organisms*. J Mol Microbiol Biotechnol, 2001. **3**(2): p. 255-64.
74. Piddock, L.J.V., *Multidrug-resistance efflux pumps ? Not just for resistance*. Nature Reviews Microbiology, 2006. **4**(8): p. 629-636.
75. Li, X.-Z., P. Plésiat, and H. Nikaido, *The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria*. Clinical Microbiology Reviews, 2015. **28**(2): p. 337-418.
76. Mousa, J.J. and S.D. Bruner, *Structural and mechanistic diversity of multidrug transporters*. Natural Product Reports, 2016. **33**(11): p. 1255-1267.
77. Colclough, A.L., et al., *RND efflux pumps in Gram-negative bacteria; regulation, structure and role in antibiotic resistance*. Future Microbiol, 2020. **15**: p. 143-157.
78. Housseini B Issa, K., G. Phan, and I. Broutin, *Functional Mechanism of the Efflux Pumps Transcription Regulators From Pseudomonas aeruginosa Based on 3D Structures*. Frontiers in Molecular Biosciences, 2018. **5**: p. 57.
79. Cabot, G., et al., *Deciphering beta-lactamase-independent beta-lactam resistance evolution trajectories in Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother, 2018. **73**(12): p. 3322-3331.
80. Dever, L.A. and T.S. Dermody, *Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics*. Arch Intern Med, 1991. **151**(5): p. 886-95.
81. Ambler, R.P., *The structure of beta-lactamases*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1980. **289**(1036): p. 321-31.
82. Tooke, C.L., et al.,  *$\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century*. Journal of Molecular Biology, 2019. **431**(18): p. 3472-3500.
83. Witte, W. and M. Mielke,  *$\beta$ -Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2003. **46**(10): p. 881-890.
84. Johnson, J.W., J.F. Fisher, and S. Mobashery, *Bacterial cell-wall recycling*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2013. **1277**(1): p. 54-75.
85. Weber, D.A. and C.C. Sanders, *Diverse potential of beta-lactamase inhibitors to induce class I enzymes*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1990. **34**(1): p. 156-158.
86. Sanders, C.C., et al., *Penicillin-binding proteins and induction of AmpC beta-lactamase*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1997. **41**(9): p. 2013-2015.
87. Jacobs, C., J.M. Frère, and S. Normark, *Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria*. Cell, 1997. **88**(6): p. 823-32.
88. Vadlamani, G., et al., *The  $\beta$ -lactamase gene regulator AmpR is a tetramer that recognizes and binds the D-Ala-D-Ala motif of its repressor UDP-N-acetylmuramic acid (MurNAc)-pentapeptide*. J Biol Chem, 2015. **290**(5): p. 2630-43.
89. Torrens, G., et al., *Regulation of AmpC-Driven  $\beta$ -Lactam Resistance in Pseudomonas aeruginosa: Different Pathways, Different Signaling*. mSystems, 2019. **4**(6): p. e00524-19.
90. Balasubramanian, D., et al., *The regulatory repertoire of Pseudomonas aeruginosa AmpC  $\beta$ -lactamase regulator AmpR includes virulence genes*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e34067.

91. Lindberg, F., L. Westman, and S. Normark, *Regulatory components in Citrobacter freundii ampC beta-lactamase induction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(14): p. 4620-4.
92. Lindquist, S., F. Lindberg, and S. Normark, *Binding of the Citrobacter freundii AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible ampC beta-lactamase gene*. J Bacteriol, 1989. **171**(7): p. 3746-53.
93. Tam, V.H., et al., *Prevalence of AmpC over-expression in bloodstream isolates of Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(4): p. 413-8.
94. Moya, B., et al., *Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein*. PLoS Pathog, 2009. **5**(3): p. e1000353.
95. Juan, C., et al., *Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in Pseudomonas aeruginosa clinical strains*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(11): p. 4733-8.
96. Langae, T.Y., L. Gagnon, and A. Huletsky, *Inactivation of the ampD gene in Pseudomonas aeruginosa leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC beta-lactamase expression*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(3): p. 583-9.
97. Zhang, W., et al., *Reactions of the three AmpD enzymes of Pseudomonas aeruginosa*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(13): p. 4950-3.
98. Martínez-Caballero, S., et al., *Reaction Products and the X-ray Structure of AmpDh2, a Virulence Determinant of Pseudomonas aeruginosa*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(28): p. 10318-10321.
99. Colautti, J., N.P. Bullen, and J.C. Whitney, *Lack of evidence that Pseudomonas aeruginosa AmpDh3-PA0808 constitute a type VI secretion system effector-immunity pair*. Molecular Microbiology, 2023. **119**(2): p. 262-274.
100. Eggers, O., et al., *YgfB increases  $\beta$ -lactam resistance in Pseudomonas aeruginosa by counteracting AlpA-mediated ampDh3 expression*. Commun Biol, 2023. **6**(1): p. 254.
101. Juan, C., et al., *Stepwise upregulation of the Pseudomonas aeruginosa chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(5): p. 1780-7.
102. Zamorano, L., et al., *AmpG inactivation restores susceptibility of pan-beta-lactam-resistant Pseudomonas aeruginosa clinical strains*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(5): p. 1990-6.
103. Zamorano, L., et al., *NagZ inactivation prevents and reverts beta-lactam resistance, driven by AmpD and PBP 4 mutations, in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(9): p. 3557-63.
104. Torrens, G., et al., *In Vivo Validation of Peptidoglycan Recycling as a Target to Disable AmpC-Mediated Resistance and Reduce Virulence Enhancing the Cell-Wall-Targeting Immunity*. J Infect Dis, 2019. **220**(11): p. 1729-1737.
105. Sonnabend, M.S., et al., *Identification of Drug Resistance Determinants in a Clinical Isolate of Pseudomonas aeruginosa by High-Density Transposon Mutagenesis*. Antimicrob Agents Chemother, 2020. **64**(3).
106. Feinbaum, R.L., et al., *Genome-Wide Identification of Pseudomonas aeruginosa Virulence-Related Genes Using a Caenorhabditis elegans Infection Model*. PLOS Pathogens, 2012. **8**(7): p. e1002813.
107. Pelosi, L., et al., *Evolution of Ubiquinone Biosynthesis: Multiple Proteobacterial Enzymes with Various Regioselectivities To Catalyze Three Contiguous Aromatic Hydroxylation Reactions*. mSystems, 2016. **1**(4).
108. Aussel, L., et al., *Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 2014. **1837**(7): p. 1004-1011.

109. Gibson, D.G., et al., *Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases*. Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 343-5.
110. Klein, K., et al., *Deprivation of the Periplasmic Chaperone SurA Reduces Virulence and Restores Antibiotic Susceptibility of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 100.
111. Münzenmayer, L., et al., *Influence of Sae-regulated and Agr-regulated factors on the escape of Staphylococcus aureus from human macrophages*. Cell Microbiol, 2016. **18**(8): p. 1172-83.
112. Liao, Y., G.K. Smyth, and W. Shi, *The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(8): p. e47.
113. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome Biol, 2014. **15**(12): p. 550.
114. Sharma, C.M. and J. Vogel, *Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA*. Curr Opin Microbiol, 2009. **12**(5): p. 536-46.
115. van Vliet, A.H., *Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities*. FEMS Microbiol Lett, 2010. **302**(1): p. 1-7.
116. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Research, 2001. **29**(9): p. e45-e45.
117. Xiao, Y., et al., *FinR Regulates Expression of nicC and nicX Operons, Involved in Nicotinic Acid Degradation in Pseudomonas putida KT2440*. Applied and Environmental Microbiology, 2018. **84**(20).
118. Becerra, G., et al., *New evolving strategies revealed by transcriptomic analysis of a fur(-) mutant of the cyanotrophic bacterium Pseudomonas pseudoalcaligenes CECT 5344*. Microb Biotechnol, 2020. **13**(1): p. 148-161.
119. Liu, Y., et al., *Pleiotropic control of antibiotic biosynthesis, flagellar operon expression, biofilm formation, and carbon source utilization by RpoN in Pseudomonas protegens H78*. Appl Microbiol Biotechnol, 2018. **102**(22): p. 9719-9730.
120. Wang, Y., et al., *FleQ regulates both the type VI secretion system and flagella in Pseudomonas putida*. Biotechnol Appl Biochem, 2018. **65**(3): p. 419-427.
121. Lee, M., et al., *Cell-wall remodeling by the zinc-protease AmpDh3 from Pseudomonas aeruginosa*. J Am Chem Soc, 2013. **135**(34): p. 12604-7.
122. Dhar, S., et al., *Cell-wall recycling and synthesis in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa - their role in the development of resistance*. J Med Microbiol, 2018. **67**(1): p. 1-21.
123. McFarland, K.A., et al., *A self-lysis pathway that enhances the virulence of a pathogenic bacterium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(27): p. 8433-8.
124. Mielecki, D., et al., *Pseudomonas putida AlkA and AlkB proteins comprise different defense systems for the repair of alkylation damage to DNA - in vivo, in vitro, and in silico studies*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76198.
125. Peña, J.M., et al., *Control of a programmed cell death pathway in Pseudomonas aeruginosa by an antiterminator*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 1702.
126. Madeira, F., et al., *The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019*. Nucleic acids research, 2019. **47**(W1): p. W636-W641.
127. Kong, K.F., et al., *Pseudomonas aeruginosa AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(11): p. 4567-75.
128. Lee, M., et al., *Catalytic spectrum of the penicillin-binding protein 4 of Pseudomonas aeruginosa, a nexus for the induction of beta-lactam antibiotic resistance*. Journal of the American Chemical Society, 2015. **137**(1): p. 190-200.

129. Schmidtke, A.J. and N.D. Hanson, *Role of ampD homologs in overproduction of AmpC in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(11): p. 3922-7.
130. LeBel, M., *Ciprofloxacin: chemistry, mechanism of action, resistance, antimicrobial spectrum, pharmacokinetics, clinical trials, and adverse reactions*. Pharmacotherapy, 1988. **8**(1): p. 3-33.
131. Haller, I., *Comprehensive evaluation of ciprofloxacin in combination with beta-lactam antibiotics against Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa*. Arzneimittelforschung, 1986. **36**(2): p. 226-9.
132. Johnson, M., P. Minitier, and V.T. Andriole, *Comparative efficacy of ciprofloxacin, azlocillin, and tobramycin alone and in combination in experimental Pseudomonas sepsis*. J Infect Dis, 1987. **155**(4): p. 783-8.
133. Meyer, R.D. and S. Liu, *In vitro synergy studies with ciprofloxacin and selected beta-lactam agents and aminoglycosides against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa*. Diagn Microbiol Infect Dis, 1988. **11**(3): p. 151-7.
134. Stratton, C.W., et al., *Comparison of the bactericidal activity of ciprofloxacin alone and in combination with selected antipseudomonal beta-lactam agents against clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa*. Diagn Microbiol Infect Dis, 1988. **11**(1): p. 41-52.
135. Visalli, M.A., M.R. Jacobs, and P.C. Appelbaum, *Determination of Activities of Levofloxacin, Alone and Combined with Gentamicin, Ceftazidime, Cefpirome, and Meropenem, against 124 Strains of Pseudomonas aeruginosa by Checkerboard and Time-Kill Methodology*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998. **42**(4): p. 953-955.
136. Mayer, I. and E. Nagy, *Post-antibiotic and synergic effects of fluoroquinolones and ceftazidime in combination against Pseudomonas strains*. Acta Biol Hung, 2001. **52**(2-3): p. 241-8.
137. Fish, D.N., M.K. Choi, and R. Jung, *Synergic activity of cephalosporins plus fluoroquinolones against Pseudomonas aeruginosa with resistance to one or both drugs*. J Antimicrob Chemother, 2002. **50**(6): p. 1045-9.
138. Kanellakopoulou, K., et al., *In vitro synergism of beta-lactams with ciprofloxacin and moxifloxacin against genetically distinct multidrug-resistant isolates of Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents, 2008. **32**(1): p. 33-9.
139. Bilal, H., et al., *Clinically Relevant Epithelial Lining Fluid Concentrations of Meropenem with Ciprofloxacin Provide Synergistic Killing and Resistance Suppression of Hypermutable Pseudomonas aeruginosa in a Dynamic Biofilm Model*. Antimicrob Agents Chemother, 2020. **64**(7).
140. Srivastava, P. and K. Sivashanmugam, *Efficacy of sub-MIC level of meropenem and ciprofloxacin against extensive drug-resistant (XDR) Pseudomonas aeruginosa isolates of diabetic foot ulcer patients*. Infect Genet Evol, 2021. **92**: p. 104824.

## 8 Erklärungen zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen unter Aufsicht von Dr. Erwin Bohn und Dr. Monika Schütz durchgeführt. Die Konzeption erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Erwin

Bohn (Arbeitsgruppenleiter), Dr. Kristina Klein (PhD-Studentin) und Dr. Michael Sonnabend (PhD-Student). Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch o.g. Personen von mir durchgeführt. Die Erstellung der *ampDh3*-Promotorkonstrukte erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Bohn. Die Durchführung des  $\beta$ -Laktamaseassays erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Sonnabend. Die Durchführung der Transkriptomanalyse erfolgte durch Christina Engesser und Angel Angelov (NCCT). Die statistischen Auswertungen erfolgten nach Rücksprache mit Dr. Bohn sowie Dr. Ullrich Schoppmeier. Ich versichere das Manuskript nach Anleitung durch Dr. Bohn und Dr. Schütz selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 21.06.2022

## 9 Veröffentlichungen

Eggers O, Renschler FA, Michalek LA, Wackler N, Walter E, Smollich F, Klein K, Sonnabend MS, Egle V, Angelov A, Engesser C, Borisova M, Mayer C, Schütz M, Bohn E. YgfB increases  $\beta$ -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by counteracting AlpA-mediated ampDh3 expression. Commun Biol. 2023 Mar 10;6(1):254. doi: 10.1038/s42003-023-04609-4. PMID: 36894667; PMCID: PMC9998450.

## 10 Danksagung

Die Erstellung dieser Arbeit wäre ohne die Hilfe zahlreicher Personen nicht möglich gewesen. Zunächst einmal möchte ich meiner Familie danken, meinen Eltern Joachim und Doris und meinen Brüdern Lucas, Joel und Samuel, welche mich immer darin bestärkt haben, diese Arbeit zu vollenden. Ein großer Dank gilt Erwin Bohn und Monika Schütz, welche sowohl fachlich als auch in persönlichen Belangen jederzeit als kompetente Ansprechpartner zur Verfügung gestanden haben. Ebenso bedanken möchte ich mich bei Kristina, Michael, Fabian und Karo für Unterstützung und aufgebrachte Geduld beim Einarbeiten in die Labormethoden und die gute Zeit im Labor. Ebenso gilt mein Dank auch allen

Kolleginnen und Kollegen des 2. Stocks, welche jetzt nicht namentlich explizit erwähnt wurden! Zuletzt möchte ich mich noch bei Prof. Autenrieth und Prof. Peter für das Einräumen der Möglichkeit diese Dissertation zu erstellen danken.