# Untersuchungen zur Bestimmung der minimalen selektiven Konzentration von Antibiotika und Schwermetallen

### Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Dominik Schuster** 

aus Achern

Bonn 2025

Die vorliegende Arbeit wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP) unter der Leitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Bierbaum angefertigt.

Gutachterin/Betreuerin: apl. Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Bierbaum

Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Tanja Schneider

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Martin Baunach

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Kubitscheck

Tag der Promotion: 02.06.2025

Erscheinungsjahr: 2025

## Inhaltsverzeichnis

#### Abkürzungsverzeichnis

| 1. Einleitung   | 1    |
|---|------|
| 1.1 One Health  | 1    |
| 1.2 Antibiotika   | 3    |
| 1.3 Antibiotikaresistenzen  | 8    |
| 1.4 Resistenzplasmide   | 12   |
| 1.5 Acinetobacter baylyi BD413  | 14   |
| 1.6 Minimale Selektive Konzentration  | 18   |
| 1.7 Fluorophore   | 21   |
| 1.8 Durchflusszytometrie  | 21   |
| 1.9 Staphylococcus aureus, Staphylococcus argenteus und Staphylococcus schweitzer | i.23 |
| 1.10 Typisierung von bakteriellen Isolaten  | 28   |
| 1.11 Die bioinformatische Berechnung der Massen von Proteinen in vivo             | 30   |
| 1.12 Das Isolat Staphylococcus spec. BN75   | 31   |
| 1.13 Ziel dieser Arbeit   | 32   |
| 2. Material und Methoden  | 34   |
| 2.1 Chemikalien, Antibiotika und Enzyme   | 34   |
| 2.2 Materialien, Kits und Geräte  | 36   |
| 2.3 Stämme und Anzuchtbedingungen   | 38   |
| 2.4 Verwendete Plasmide   | 40   |
| 2.4.1 Der S. aureus / E. coli Shuttle-Vektor pEPSA5                               | 40   |
| 2.4.2 Das natürliche Resistenzplasmid pHHV216                                     | 41   |
| 2.5 Nährmedien  | 43   |
| 2.6 Lösungen  | 44   |
| 2.7 Sterilisationsprozess   | 45   |
| 2.8 Messung der DNA-Konzentration   | 45   |

| 2.9 Herstellung von genomischer DNA für die PCR            | 45 |
|--|----|
| 2.10 Polymerasekettenreaktion(PCR)                         | 45 |
| 2.11 Aufreinigung von PCR- Produkten                       | 53 |
| 2.12 Sequenzierung von DNA                                 | 53 |
| 2.13 Agarosegelelektrophorese                              | 53 |
| 2.14 MALDI-TOF-MS  | 54 |
| 2.14.1 Peptid-Extraktion                                   | 54 |
| 2.14.2 Direkte Applikation von Zellmaterial                | 55 |
| 2.15 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen | 55 |
| 2.16 Isolierung von Plasmid-DNA                            | 55 |
| 2.17 Isolierung genomischer DNA                            | 55 |
| 2.18 Restriktionsverdau                                    | 56 |
| 2.19 Ligation  | 56 |
| 2.20 Natürliche Kompetenz von Acinetobacter baylyi BD413   | 57 |
| 2.21 Puddle-Transformation                                 | 58 |
| 2.22 Vorbereitungen für die Fluoreszenzmikroskopie         | 58 |
| 2.23 Antibiogramme   | 59 |
| 2.23.1 Vitek®2-System                                      | 59 |
| 2.23.2 Micronaut-System                                    | 60 |
| 2.23.3 Mikrodilutionsmethode                               | 60 |
| 2.23.4 Agardiffusionstest mit Plättchen                    | 60 |
| 2.23.5. Agardiffusionstest mit Aussparungen                | 62 |
| 2.24 Checkerboard-Assay                                    | 62 |
| 2.25 Minimale Selektive Konzentration (MSC)                | 63 |
| 2.26 Durchflusszytometrie                                  | 64 |
| 2.27 Wachstumskurven                                       | 64 |
| 2.28 Bestimmung des Spa-Typs                               | 65 |

|   | 2.29 MLST-Typisierung  | 65  |
|---|--|-----|
|   | 2.30 APIStaph -Test  | 65  |
|   | 2.31 Verwendete Online-Tools und Software  | 66  |
| 3 | . Ergebnisse   | 68  |
|   | 3.1 Evaluation der Anforderungen an das erstrebte Testsystem   | 68  |
|   | 3.2 Konstruktion der Genkassetten für Acinetobacter baylyi   | 70  |
|   | 3.3 Klonierung der Fluoreszenz-Gene in Acinetobacter baylyi BD413  | 71  |
|   | 3.4 Selektion von spontanen multiresistenten Mutanten  | 73  |
|   | 3.5 Agardiffusionstest mit Schwermetallen  | 78  |
|   | 3.6 Sequenzierung ausgewählter Stämme von Acinetobacter baylyi   | 79  |
|   | 3.7 Transformation des Plasmids pHHV216 in <i>Acinetobacter baylyi</i> BD413 GFP und <i>Acinetobacter baylyi</i> BD413 mCherry |     |
|   | 3.8 Antibiogramme  | 89  |
|   | 3.9 Checkerboard-Assay   | 91  |
|   | 3.10 Wachstumskurven   | 93  |
|   | 3.11 Ermittlung der Minimalen Selektiven Konzentration   | 98  |
|   | 3.12 Sequenzierung und manuelle Vervollständigung des Genoms von Staphylococargenteus BN 75                                    |     |
|   | 3.13 Genomanalyse von Staphylococcus argenteus BN 75 mit Fokus auf Virulenzfakto   |     |
|   | 3.14 Nachweis von Staphylococcus argenteus und Differenzierung gegenüber ande nahen verwandten Staphylokokken via MALDI-TOF MS |     |
| 4 | . Diskussion   | 112 |
|   | 4.1 Bestimmung der Minimalen Selektiven Konzentration  | 112 |
|   | 4.1.1 Konstruktion des Testsystems   | 112 |
|   | 4.1.2 Antimikrobielle Substanzen   | 114 |
|   | 4.1.3 Wachstumskurven  | 116 |
|   | 4.1.4 Antibiogramme  | 119 |
|   | 4.1.5 Sequenzierung ausgewählter Stämme von Acinetobacter baylyi   | 122 |
|   | 4.1.6 Minimale Selektive Konzentration   | 134 |

| 4.2 Staphylococcus argenteus BN75 | 139 |
|-----------------------------------|-----|
| 4.3 Ausblick                      | 142 |
| 5. Zusammenfassung                | 144 |
| 6. Literaturverzeichnis           |     |
| 7. Danksagung                     | 191 |
| 8. Anhang                         | 193 |
| 9. Publikationen                  | 220 |

#### Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden finden sich alle fachpezifischen Abkürzungen und solche die über den allgemeinen deutschen Sprachgebrauch, wie "z.B." für zum Beispiel oder "u. a." für unter anderem, hinausgehen. Nukleinsäuren und Aminosäuren sind nach der IUPAC-Nomenklatur benannt. Physikalische Einheiten sind nach dem SI-System bezeichnet.

3-APB 3-Amino-Phenyl-Borat

AAC6 Aminoglycosid-6'-N-Acetyltransferase des Typs

lb [AAC(6')-lb]

A. dest. Lat: "Aqua destillata"

A. i. Lat: "Aqua ad iniectabilia"

AB Antibiotika

ABC ATP-Bindekassette

Ala Alanin

AMP Adenosinmonophosphat
ANI Average Nucleotide Identity

ANT(9) Aminoglykosid-Nukleotidyl-Transferase

AR Antibiotikaresistenz

ARB Antibiotika-resistente Bakterien

AS Aminosäure(n)

ATP Adenosintriphosphat

BHI Hirn-Herz-Infusions-Bouillon

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

BMBF Bundesministerium für Bildung und Forschung

bp Basenpaar(e)

bp/s Basenpaare pro Sekunde

C Cytosin

CC Klonaler Komplex

CCCP Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon
CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

CRISPR Clustered Regularly Interspaced Short

Palindromic Repeats

DDD Defined Daily Dosis

Da Dalton

DIN Deutsches Institut für Normierung

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonucleic acid

٧

dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphate

ds Doppelsträngig

dsDNA Doppelsträngige DNA EDTA Ethylendiamintetraacetat

ENA Europäisches Nukleotidarchiv

ESBL Extended-spectrum β-lactamases

EUCAST European Committee on Antimicrobial

Susceptibility Testing

F Phenylalanin

Falcon Falcon-Reaktionsgefäß

fM Formylmethionin

FRET Förster-Resonanzenergietransfer

FSC Forward Scatter

g Erdbeschleunigung: 1 G= 9,81 m/s<sup>2</sup>

GFP Grün fluoreszierendes Protein

h Stunde(n)

H<sup>+</sup> Einfach geladenes Wasserstoff-Kation

HME "heavy metal efflux" mit Bezug auf die

Effluxpumpen in Acinetobacter spp.

HyReKA Verbundprojekt: **Hy**gienisch-medizinische

**Re**levanz und **K**ontrolle **A**ntibiotikaresistenter Krankheitserreger in klinischen, landwirtschaftlichen und kommunalen Abwässern

und deren Bedeutung in Rohwässern

Inc Inkompatibilität

Lat Einbuchstabencode für die AS Leucin
Aus dem Lateinischen oder auf Lateinisch

LB Lysogeny Broth

Laser Light amplification by stimulated emission of

radiation. Gerät zur Erzeugung und Verstärkung

von kohärentem Licht.

kb Kilobasenpaar(e)

KNS Koagulase-negative Staphylokokken

M Einbuchstabencode für die AS Methionin

MADLI-TOF-MS Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization—

Time of Flight-Massenspektrometrie

MATE Multidrug and toxic compound extrusion

MCS Multiple Cloning Site

MFS Major facilitator superfamily

MH Müller-Hinton

MHK Minimale Hemmkonzentration

MHK<sub>res</sub> MHK der resistenten Population

MHK<sub>sen</sub> MHK der sensiblen Population

MilliQ-Wasser Doppelt destilliertes Wasser / Reinstwasser

min Minute(n)

MIPC Minimal Increased Persistence

Concentration

MRGN Multiresistente gramnegative Bakterien

MRSA Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus

MSC Minimale Selektive Konzentration

MSSA Methicillin-sensitiver Staphylococcus aureus

m/z Masse/Ladungs-Verhältnis

NaCl Natriumchlorid

NAD Nicotin-Amid-Dinukleotid; es kann in der

oxidierten Form als NAD+ oder in der reduzierten

Form als NADH vorliegen

NADP Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat;

es kann in der oxidierten Form als NADP+ oder in

der reduzierten Form als NADPH vorliegen

NCBI National Center for Biotechnology Information

NDM Neu-Delhi-Metallo-β-Lactamase

OD<sub>600nm</sub> Optische Dichte bei 600 nm

ORI Origin of replication
PBP Penicillinbindeprotein

PCR Polymerasekettenreaktion
PVL Panton-Valentine-Leukozidin

R1 Risikogruppe 1 nach der Biostoffverordnung §3

RBS Ribosomale Bindestelle

rDNA Ribosomale DNA

RND Resistance-nodulation-cell division

rpm Revolutions per minute

RNA Ribonucleic acid rRNA Ribosomale RNA

RT Raumtemperatur

s Sekunde

S Einbuchstabencode für die AS Serin

S1 Sicherheitsstufe 1 nach dem Gentechnikgesetz

§7

SMR Small multidrug resistance

ss Single stranded

SSC Side Scatter

t Zeit

T Thymin

 $T_{M}$  Schmelztemperatur

Tab. Tabelle

tRNA Transfer-RNA

VISA Vancomycin intermidiär-resistente

Staphylococcus aureus

WGS Whole genom sequencing
WHO World Health Organisation
XDR Extensively drug-resistant

ÜN Über Nacht

#### 1. Einleitung

#### 1.1 One Health

Es sterben circa 700.000 Menschen pro Jahr weltweit an Infekten mit antibiotika-resistenten Bakterien (ARB) (Ansari et al., 2021; Duanchie et al., 2020), wobei neuere Schätzungen eher von 1,2 Millionen pro Jahr ausgehen (Murray et al., 2022). In Zukunft sollen die Zahlen sogar noch auf etwa 10 Millionen Tote im Jahr 2050 steigen (Ansari et al., 2021). Derzeit sterben alleine in der EU 33.000 Menschen jedes Jahr aufgrund von Infektionen mit ARB. Neununddreißig Prozent dieser Todesfälle können mit ARB assoziiert werden, die gegen Reserveantibiotika, wie Carbapeneme und Colistin, resistent sind (Polianciuc et al., 2020). Gleichzeitig steigt der Verbrauch von Antibiotika (AB) stetig an, besonders im Hinblick auf Reserveantibiotika. Zwischen den Jahren 2000 und 2015 stieg der weltweite Antibiotikakonsum, ausgedrückt in "Definierten Täglichen Dosen" von engl.: "Defined Daily Dosis" (DDD), um 65 % und für 2030 geht man von einer weiteren Steigerung um 200 % aus. In Europa lag 2019 die DDD bereits bei 19,4 (Polianciuc et al., 2020). Dabei herrscht selbst in einem relativ reichen Industriestaat wie Deutschland immer wieder Mangel an AB, besonders für Kinder. So stellte zum Beispiel das Bundesministerium für Gesundheit im Jahr 2023 im Bundesanzeiger (BAnz AT 25.04.2023 B4) einen solchen Mangel fest (https://www.bundesanzeiger.de/pub/de/amtliche-veroeffentlichung?7 Stand 04.05.2023). Im Bezug auf die Patientenversorgung im Krankenhaus verursachen immer mehr resistente Isolate Probleme. Ein Hauptaugenmerk liegt dabei auf der unter dem Akronym ESKAPE zusammengefassten Gruppe nosokomialer Erreger: Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa und Enterobacter spp. (Jadimurthy et al., 2022; Mulani et al., 2019). Die sechs ESKAPE Organismen weisen in erheblichem Maße Multiresistenzen und eine verstärkte Virulenz auf. Die gleichzeitige Resistenz gegen mehrere AB wird als Multiresistenz bezeichnet und in drei Gruppen eingeteilt: Die "normale" Multiresistenz ist definiert als eine Resistenz gegen mindestens drei verschiedene Antibiotikaklassen. Bei weitreichender Resistenz (XDR von engl.: "extensively drug-resistant"), sind nur noch eine bis zwei AB-Klassen wirksam. Bei der dritten Kategorie, der Panresistenz, ist das Isolat gegen alle bekannten AB resistent (Basak et al., 2016; Mulani et al., 2019). Aus den sechs ESKAPE Organismen sticht A. baumannii besonders hervor, weshalb er hier exemplarisch betrachtet wird. A. baumannii kann nicht nur panresistent sein, sondern auch gegen andere natürliche und anthropogene Wirkstoffe, wie Desinfektionsmittel, resistent sein oder binnen weniger Generationen werden (Wong et al., 2017). A. baumannii gilt als ubiquitär verbreitet und ist als Umweltbakterium extrem anpassungsfähig. Es kann zudem Biofilme bilden und hat eine sehr gute Adhäsion (Howard et al., 2012; Wong et al., 2017). Diese Tenazität gepaart mit der häufig auftretenden

Multiresistenz bis hin zur Panresistenz, macht eine Behandlung von Infektionen im Krankenhaus immer herausfordernder (Wong et al., 2017). Denn gerade dort ist die ubiquitäre Verbreitung ein großes Problem. Auslöser von Ausbrüchen mit Acinetobacter war oft, neben besiedelten Patienten, eine Kolonisierung des Mobiliars, wie z. B. von Kissen oder Matratzen. Aber auch das Krankenhauspersonal selbst kann zum Überträger werden. Studien zeigen eine Besiedelung der Hände von zwischen 3 % und 23 % des Personals (Almasaudi 2018; Cisneros et al., 2002; Karageorgopoulos et al., 2008; Townsend et al., 2015). Im US-amerikanischen Raum ist A. baumannii noch unter einem anderen Namen bekannt. Er war im Irak während der Konflikte Anfang der 2000er eine der Hauptursachen für Infektionen bei Soldaten nach Verwundung (Almasaudi 2018; Wong et al., 2017). Aufgrund der massenhaften Anhäufung von Fällen bekam er dort beim US-Militär die Bezeichnung "Iraqibacter" (Howard et al., 2012). Das Problem rund um ARB und die Infekte die sie in Menschen auslösen, existiert dabei nicht nur im nosokomialen Kontext sondern sollte viel weiter betrachtet werden. Denn ARB spielen auch in der Umwelt, auf wilden Tieren, Nutztieren, Haustieren und in der Landwirtschaft eine immer größere Rolle. Die Umwelt kann durch anthropogene Aktivitäten mit resistenten Keimen und AB kontaminiert werden. So gelangen Antibiotikarückstände z. B. durch Industrie-, kommunale-, Krankenhausabwässer, Aquakulturen, Landwirtschaft und Tierzucht in die Umgebung (Dunachie et al., 2020). Mit diesen Zusammenhängen zwischen Lebewesen und Umwelt und wie sie sich gegenseitig beeinflussen beschäftigt sich der One Health Ansatz. Dieser wurde im April 2006 durch den Artikel "Confronting Zoonoses, Linking Human and Veterinary Medicine" von Laura H. Kahn (Kahn 2006) initiiert. Dabei wird die Gesundheit von Menschen, Tieren und der Umwelt unter der Zielsetzung betrachtet, möglichen Gesundheitsrisiken vorzubeugen. Bei dem interdisziplinären Ansatz stehen besonders die Sektoren öffentliche Gesundheit, Antibiotikaresistenzen (AR), Tropenkrankheiten, Zoonosen, vernachlässigte Nahrungsmittelsicherheit und Umweltschutz im Zentrum (Pitt et al., 2024). Da diese Arbeit im Rahmen des HyReKA-Verbundprojektes entstand liegt der Inhaltspunkt AR im Fokus. Bei HyReKA handelt es sich um ein vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördertes Verbundvorhaben, bei dem die interdisziplinären Forschungspartner sich zum Ziel gesetzt haben die "**Hy**gienisch-medizinische **Re**levanz und **K**ontrolle Antibiotikaresistenter Krankheitserreger in klinischen, landwirtschaftlichen und kommunalen Abwässern und deren Bedeutung in Rohwässern (HyReKA) (https://www.hyreka.net/ Stand 05.01.2025) zu untersuchen und damit Eintragspfade von antibiotikaresistenten Bakterien, Antibiotika-Resistenzgenen und Antibiotika-Rückständen von Mensch oder Tier in die Umwelt qualitativ und quantitativ zu charakterisieren, um so die Ausbreitung in die Umwelt mit geeigneten technischen Verfahren zu unterbrechen" (Jäger et al., 2018 I und II). Die Gefahren, der sich ausbreitenden Resistenz gegen AB werden im nachfolgenden Kapitel

"1.3 Antibiotikaresistenzen" ausführlich behandelt. Im One Health Ansatz geht es zusätzlich um die Verbreitung von ARB und Resistenzgenen. Denn die Problematik besteht darin, dass durch missbräuchlich verwendete AB sich sowohl resistente Mikroorganismen als auch steigende Konzentrationen von antimikrobiellen Substanzen in der Umwelt akkumulieren. Dadurch kann die Zahl der resistenten Keime in der Umwelt stark steigen. Dabei tragen nicht nur die nosokomialen Isolate selbst ihren Teil bei, auch deren Resistenzgene können sich weiterverbreiten. Als weitere Möglichkeit kommen noch die steigenden Konzentrationen antimikrobieller Stoffe zum Tragen, indem sie ebenfalls zur Selektion und Neubildung von Resistenzen beitragen. Wenn sich in der Natur resistente Mikroorganismen stark ausbreiten, steigt auch die Gefahr sich mit diesen zu kolonisieren, sodass diese sich in der Bevölkerung etablieren (Cycoń et al., 2019; Fletcher 2015; Treiber et al., 2021). Es gilt zu vermeiden, dass resistente Mikroorganismen zur Normalität in der Bevölkerung werden und jeder neue Patient im Krankenhaus bereits entsprechend besiedelt ist

#### 1.2 Antibiotika

Das Wort Antibiotikum leitet sich von den griechischen Wörtern "ἀντί" (gegen) und "βίος" (Leben) ab (Prathapan 2022), frei nach dem Satz: "Leben verhindert Leben", aus dem Bericht von Luis Pasteur und Jules Joubert aus dem Jahr 1877. Dort wurde vermerkt, dass sich "Anthrax Bakterien" nicht vermehren, wenn andere Mikroorganismen ebenfalls präsent sind. Dieses Phänomen wurde 1889 von Paul Vuillemin als "Antibiose" bezeichnet (Cavaillon et al., 2022). AB sind natürlich vorkommende, semi- oder vollsynthetische Substanzen, die bereits in niedrigen Konzentrationen Bakterien im Wachstum hemmen oder abtöten. Neben den bekannten niedermolekularen Stoffen von Mikroorganismen, wie Pilzen und Bakterien, werden aber auch von Pflanzen antibakterielle Substanzen gebildet, wie z. B. Phenole, Terpenoide etc. (Pancu et al., 2021). Im Gegensatz zu Desinfektionsmitteln weisen AB eine selektive Toxizität nach Paul Ehrlich (1906) auf, da sie nur Strukturen angreifen, die im Wirtsorganismus nicht oder nur in wesentlich anderer Form vorkommen (Dalhoff, 2021). AB sind gebräuchlich als Arzneimittel zur Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten und eine Teilklasse der Antiinfektiva, neben Antimykotika, Antihelmintika, Virustatika etc. Grundsätzlich werden AB in bakteriostatische oder bakteriozide Substanzen eingeteilt. Aber auch eine Unterscheidung anhand ihrer chemischen Struktur ist möglich, genauso wie eine Einteilung dem Wirkmechanismus, beziehungsweise dem Angriffsort verschiedenen AB. In der linken Hälfte von Abbildung 1 (Antibiotic Targets) ist eine Übersicht über die wichtigsten AB und ihre Angriffsorte dargestellt.

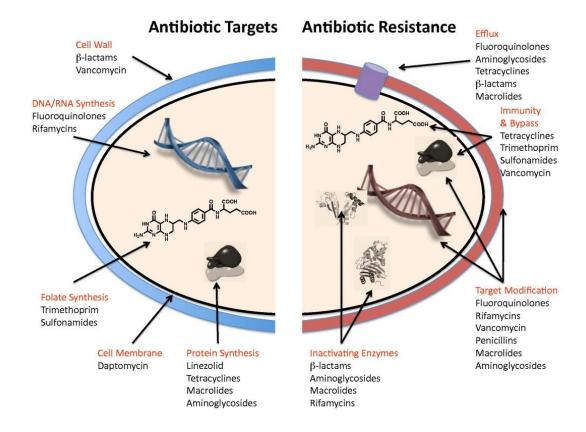


Abbildung 1: Übersicht der wichtigsten Angriffsorte in der bakteriellen Zelle für Antibiotika und entsprechende Resistenzmechanismen. Abbildung entnommen aus Wright et al. (2010).

Das wohl bekannteste AB Penicillin gehört zu den bakterioziden β-Lactam-Antibiotika und greift in die Zellwandsynthese ein. Tetracyclin hingegen wirkt bakteriostatisch, gehört zu den Polyketiden und verhindert als Translationshemmer die bakterielle Proteinsynthese. (Pancu et a., 2021; Wright 2010). Dabei entscheidet nicht nur der Wirkmechanismus alleine, ob ein AB gegen grampositive und/oder gegen gramnegative Bakterien eingesetzt werden kann, sondern auch Faktoren, wie z. B. die Größe oder elektrische Ladung sind wichtig, besonders für die Aufnahme in die Bakterienzelle. Wenn ein AB gegen ein breites Spektrum an grampositiven und gramnegativen Erregern Wirkung zeigt, kann es als Breitspektrum- oder auch Breitbandantibiotikum bezeichnet werden. Einen Überblick über die wichtigsten AB-Klassen und den Zeitpunkt ihrer Entdeckung ist in Abbildung 2 zu sehen.

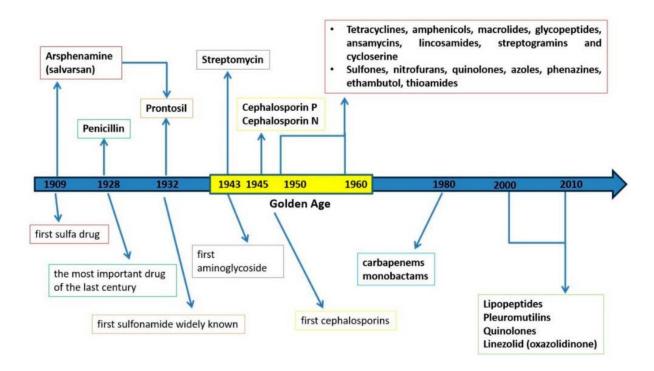


Abbildung 2: Der Zeitstrahl stellt die Entwicklung der unterschiedlichen Antibiotika im Laufe der Zeit dar. In dem hervorgehobenen Bereich des Zeitstrahls von 1943 bis 1960 dem so genannten "Goldenen Zeitalter (Golden Age)", wurden die meisten auch heute noch eingesetzten Antibiotika entdeckt. Abbildung modifiziert nach Pancu et al. (2021).

Die breite Verfügbarkeit von AB nach dem zweiten Weltkrieg sorgte nach und nach für eine drastische Erhöhung der durchschnittlichen Lebenserwartung. Für die USA z. B. um fast 30 Jahre von 47,3 Jahren um 1900 auf 76,8 Jahren in 2000. Dabei gab es eine Verschiebung der häufigsten Todesursachen von übertragbaren zu inhärenten Krankheiten, wie Krebs oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Adedejii 2016). Trotz ihrer guten Verträglichkeit können AB aber auch Nebenwirkungen wie Allergien, Übelkeit, Leberschäden, Nierenschäden, Schäden am Knochenmark, Diarrhoe, Herzrhythmusstörungen etc. auslösen. Ciprofloxacin kann z. B. die Desoxyribonukleinsäure (DNA) von Mitochondrien beschädigen, indem es die Topoisomerase II inhibiert (Hangas et al., 2018). Außerdem stehen einige AB im Verdacht teratogen oder karzinogen zu wirken (Cunha 2001; Mohsen et al., 2020; Sengupta et al., 2013; Treiber et al., 2021). Um die Verabreichung von AB zu optimieren und besser kontrollieren zu können, führte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) 2017 die so genannte "AWaRe" Klassifikation ein. Diese setzt sich aus den drei Gruppen der "Access group", "Watch group" und "Reserve antibiotics" zusammen. In der aktualisierten Fassung von 2021 werden 257 AB in diese drei Gruppen eingeordnet. In der Access group sind breit verfügbare, preiswerte AB zusammengefasst, die für die üblicherweise auftretenden Infektionen empfohlen werden. Sie haben ein relativ geringes Risiko zur Selektion von Resistenzen und sollen laut Ziel der WHO ab 2023 mindestens 60 % der applizierten AB ausmachen. Beispiele für Substanzen in der Access group sind: Benzylpenicillin, Ampicillin, Clindamycin, Chloramphenicol, Sulfamethoxazol und Spectinomycin. Die zweite Gruppe bilden die AB in der Watch group. Sie weisen ein höheres Potential für eine Resistenzbildung auf, weshalb ihr Einsatz streng kontrolliert werden sollte, um übermäßigen Gebrauch zu vermeiden. Während AB aus der Access group eher ambulant verwendet werden, kommt die Watch group in der Regel bei stationären Aufenthalten zum Einsatz. Zu ihnen gehören z. B. Ciprofloxacin, Meropenem, alle Cephalosporine der dritten Generation und Vancomycin. Die acht gelisteten Reserveantibiotika bilden die dritte Gruppe und sind der Behandlung von multiresistenten Erregern vorbehalten. Sie sollten nur zum Einsatz kommen, wenn ein schwerer Infekt vorliegt und alle Alternativen keine Wirkung mehr zeigen. Zu ihnen zählen u. a. Fosfomycin, Linezolid und Polymyxin B/Collistin (Zanichelli et al., 2023). Dank der industriellen Verfügbarkeit werden AB in der Landwirtschaft nicht nur zur Behandlung von Krankheiten, sondern auch in der Fleischindustrie als Wachstumsbeschleuniger dem Futtermittel beigemischt (Rahman et al., 2022; Treiber et al., 2021; Van Boeckel et al., 2015). Dabei betrug der Wert an eingesetzten AB pro Kilogramm Fleisch im Jahr 2010 bereits 45 mg für Rinder, 148 mg für Geflügel und 172 mg für Schweine (Rahman et al., 2022; Van Boeckel et al., 2015).

2010 wurden in den USA 80% aller AB in der Landwirtschaft verwendet (Van Boeckel et al., 2015). In China wurde 2013 die Hälfte aller AB für Tiere verwendet (Rahman et al., 2022). Während in der Studie von 2015 eine Steigerung des weltweiten Verbrauchs an AB um 76 % prognostiziert wurde (Van Boeckel et al., 2015), sind in vielen Ländern inzwischen AB als Wachstumsbeschleuniger stark reguliert oder ganz verboten (Rahman et al., 2022). Dennoch konnten in zahlreichen Studien Rückstände von AB in Lebensmitteln, aber speziell in Fleisch, nachgewiesen werden (Ghimpeteanu et al., 2022; Salama et a., 2011; Schmithausen et al., 2015; Treiber et al., 2021). Besonders drastisch ist der vermehrte Nachweis von Nitrofural in Shrimps oder Welsen aus Aquakultur, denn es steht im Verdacht Krebs auszulösen (Treiber et al., 2021). Die massenweise Verwendung von AB führt aber auch zu weiteren Begleiterscheinungen, wie der Akkumulation von Antibiotikarückständen in der Umwelt. Denn AB können vom menschlichen Körper, genau wie von Masttieren, nur schlecht metabolisiert werden, weshalb der größte Teil über Ausscheidungen in die Umwelt gelangt. Je nach Substanz werden bis zu 90 % unverändert wieder ausgeschieden (Polianciuc et a., 2020). Über die Kanalisation oder das Ausbringen von Gülle auf den Feldern etc. gelangen die AB dann in Flüsse, andere Gewässer oder den Boden (Jechalke et al., 2013; Gullberg et al., 2014; Sengupta et al., 2013; Treiber et al., 2021). In Gülle können die Tetracycline am häufigsten und in der höchsten Konzentration, mit bis zu 764 mg pro kg für z. B. Chlortetracyclin, nachgewiesen werden, gefolgt von Fluorchinolonen, Sulfonamiden und Makroliden. Im Erdreich sind nur noch Bruchteile davon nachweisbar. Bei unserem Beispiel sind es noch 12,9 mg Chlortetracyclin pro kg Boden (Cycoń et al., 2019; Jechalke et al., 2014). Dagegen findet man in anthropogenen Abwässern vermehrt Penicilline, Makrolide

und Fluorchinolone (Treiber et al., 2021). Die Menge an akkumulierten Substanzen hängt von vielen Bedingungen ab, wie der Menge und Häufigkeit der Eintragung, Abbaugeschwindigkeit, Ad- und Absorption, Umweltbedingungen, pH-Wert, Bodenart etc. (Cycoń et al., 2019; Jechalke et al., 2014; Treiber et al., 2021). Die Konzentrationsspanne reicht dabei von einigen Nanogramm bis zu mehreren hundert mg/kg, wie in unserem Beispiel für die Tretrazykline. Insbesondere bei Abwässern variiert die nachweisbare Menge und die Art der AB stark je nach Quelle. Wenn ein Krankenhaus in das Abwassersystem einleitet, variieren die gefundenen AB-Konzentrationen und die Konzentrationen der gefunden Substanzen sind in der Regel höher als in den Abwässern einer Siedlung ohne medizinische Einrichtungen. Dabei können sogar starke Schwankungen im Tagesverlauf festgestellt werden (Cai et al., 2022; Schuster et al., 2022; Verlicchi et al., 2012; Voigt et al., 2019). Makrolide und Sulfonamide gehören zu den persistentesten AB im Abwasser, weshalb sie dort oft detektiert werden können (Han et al., 2021). Fluorchinolone und Tetracycline hingegen können aufgrund ihrer hohen Adsorptionskapazität gut aus Abwässern entfernt werden oder sind relativ schnell im Boden gebunden (Golet et al., 2003). β-Lactam-Antibiotika dagegen werden in der Regel sehr schnell abgebaut, zum einen abiotisch, da der β-Lactamring sehr anfällig für hydrolytische Spaltung ist und zum anderen, da β-Lactamasen in der Umwelt weit verbreitet sind. Diese Enzyme verschiedener Ausprägungen (Klasse A, B, C, D etc.) inaktivieren die β-Lactame durch die Spaltung ihres β-Lactamringes (Fröhlich et al., 2020; Ribeiro et al., 2018; Tooke et al., 2019). Für das Erdreich gilt ähnliches, so sind β-Lactame in der Regel sehr schnell wieder abgebaut. Hierfür beispielhaft ist Amoxycillin mit einer Halbwertszeit von 0,6 Tagen, während Fluorchinolone, insbesondere Ciprofloxacin, biologisch nur schwer abbaubar sind. Entsprechend hat es eine sehr lange Halbwertszeit von 3466 Tagen. Diese fast neuneinhalb Jahre sind unabhängig von der Bodenart und der anfänglichen Menge an AB (Cycoń et al., 2019; Golet et al., 2002). Ein weiterer Faktor, die Photodegradation, spielt bei der oberflächlichen Dekomposition von u. a. Tetracyclinen und Chinolonen beim Ausbringen von Gülle auf Feldern eine sehr große Rolle (Cycoń et al., 2019). Der Missbrauch von AB, die falsche Anwendung bei viralen Infekten, die Nutzung als Wachstumsbeschleuniger in der Landwirtschaft etc. führen zur Akkumulation in der Umwelt. Diese kann zu einem Selektionsfaktor für ARB werden (Baquero et al., 1998; Gullberg et al., 2001; Liu et al., 2001; Ma et al., 2014; Svebrant et al., 2021). AR und sich immer schneller ausbreitende resistente Erreger werden im folgenden Kapitel "1.3 Antibiotikaresistenzen" näher betrachtet.

#### 1.3 Antibiotikaresistenzen

Der Begriff Resistenz gegen AB wird im klinischen Sinne nach der ISO 20776-1 definiert: Ein bakterielles Isolat gilt als sensibel gegen ein bestimmtes AB, wenn es in vitro von einer Konzentration inhibiert wird, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zum therapeutischem Erfolg führt (Nabal Diaz et al., 2022; Rodloff et al., 2008). Als intermediär resistent gilt ein bakterieller Erreger, wenn für einen therapeutischen Erfolg eine Hochdosistherapie erforderlich ist (Nabal Diaz et al., 2022). Ein Bakterienstamm gilt als resistent, wenn die inhibierende Konzentration des AB so hoch ist, dass sie mit einer hohen Wahrscheinlichkeit während der Therapie nicht erreicht wird (Nabal Diaz et al., 2022; Rodloff et al., 2008). In Deutschland gibt es zusätzlich noch die Einordnung in das sog. MRGN-System. Es bezieht sich auf multiresistente gramnegative Erreger und klassifiziert deren Mehrfachresistenz anhand von vier Antibiotikaklassen. Dabei werden mittels des MRGN-Systems im klinischen Alltag hauptsächlich nosokomiale Isolate eingeordnet, aber es gilt auch für ARB außerhalb des Krankenhauses. Wie in Tabelle 1 dargestellt, werden die gramnegativen Bakterien aufgrund ihrer Resistenz gegen die folgenden vier Gruppen an AB klassifiziert: Acylureidopenicilline, Cephalosporine der 3. und 4. Generation, Carbapeneme und Fluorchinolone (Schulz-Stübner 2017).

Tabelle 1: Klassifikation der multiresistenten gramnegativen Erreger (MRGN) anhand der Resistenz gegen die vier dargestellten Antibiotikaklassen. R steht für resistent und S für sensibel. Modifiziert nach Schulz-Stübner (2017).

| Antibiotikagruppe | Leitsubstanz  | Enterobacteriaceae |      | Pseudomonas<br>aeruginosa |      | Acinetobacter spp. |      |
|-------------------|---------------|--------------------|------|---------------------------|------|--------------------|------|
|                   |               | 3-                 | 4-   | 3-                        | 4-   | 3-                 | 4-   |
|                   |               | MRGN               | MRGN | MRGN                      | MRGN | MRGN               | MRGN |
| Acylureido-       | Piperacillin  | R                  | R    | Nur eine                  | R    | R                  | R    |
| penicilline       |               |                    |      | der 4                     |      |                    |      |
| Cephalosporine    | Cefotaxim     | R                  | R    | Antibiotika-              | R    | R                  | R    |
| der 3./4.         | und/oder      |                    |      | gruppen                   |      |                    |      |
| Generation        | Ceftazidim    |                    |      | wirksam                   |      |                    |      |
| Carbapeneme       | Imipenem      | S                  | R    |                           | R    | S                  | R    |
|                   | und/oder      |                    |      |                           |      |                    |      |
|                   | Meropenem     |                    |      |                           |      |                    |      |
| Fluorchinolone    | Ciprofloxacin | R                  | R    |                           | R    | R                  | R    |

3-MRGN: multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen 3 der 4 Antibiotikagruppen 4-MRGN: multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen 4 der 4 Antibiotikagruppen

International werden Erreger, egal ob gramnegativ oder grampositiv, stattdessen in die bekannten Kategorien multi- und panresistent eingeordnet. Zusätzlich gibt es noch eine Art Zwischenstufe, die als XDR (engl.: "extensively drug-resistant") Erreger eingestuft werden. Diese umfangreich resistenten Isolate sind nur noch gegen wenige AB sensibel. Eine genaue Einordnung in die Kategorien kann in Abbildung 3 am Beispiel von *Acinetobacter* eingesehen werden. Gleichzeitig kann die MRGN-Klassifizierung in die internationale Einordnung übersetzt werden, wobei Multiresistenz ungefähr einem 3-MRGN entsprechen würde und XDR oder panresistent einem 4-MRGN (Schulz-Stübner 2017).

| Bakterium          | Antibiotikaklassen   | MDR  | XDR   | PDR  |
|--------------------|--|--|---|--|
| Acinetobacter spp. | Aminoglykoside Anti-Pseudomonas- Carbapeneme Anti-Pseudomonas- Cephalosporine Anti-Pseudomonas- Fluorchinolone Anti-Pseudomonas- Penicilline mit β-Laktamase-Inhibitor Cephalosporine der 3./4 Generation Folsäureantagonisten Penicilline mit β-Laktamase-Inhibitor Polymyxin (Colistin) Tetrazykline | Resistenz in mindestens 3 der gelisteten<br>Antibiotikaklassen | Resistenz gegen<br>alle außer 2<br>der gelisteten<br>Antibiotikaklassen | Resistenz gegen<br>alle der gelisteten<br>Antibiotikaklassen |

Abbildung 3: Klassifizierung von Acinetobacter in multiresistent (MDR), umfangreich resistent (XDR) und panresistent (PDR) aufgrund der Resistenz gegen die aufgeführten Antibiotikaklassen. Abbildung modifiziert nach Schulz-Stübner (2017).

Im Jahr 1967 erklärte der Direktor des öffentlichen Gesundheitssystems der USA, Dr. William H. Stewart: "It is time to close the book on infectious diseases, and declare the war against pestilence won" (Sengupta et al., 2013). Aber diese Vorstellung endgültig alle bakteriellen Infektionen zu beherrschen war von Anfang an mehr Schein als Sein. Denn bereits 1944 gab es erste Belege für penicillinresistente Staphylokokken, also kurz nachdem Penicillin überhaupt eingeführt worden war (Shaffer 2013).

2004 gab es erste Berichte von panresistenten Isolaten von *Acinetobacter* und *Pseudomonaden* (Karakonstantis et al., 2020; Ventola 2015). Dabei beruht die Panresistenz von *Acinetobacter* auf der Kombination vieler Resistenzmechanismen, wie β-Lactamasen, modifizierende Enzyme, Permeabilitätsdefekte, Veränderungen von Zielstrukturen und Effluxpumpen (Abdi et al., 2020; Kyriakidis et al., 2021). Ein allgemeiner Überblick über die wichtigsten Angriffsorte der AB und die entsprechenden Resistenzmechanismen mit Beispielen, kann Abbildung 1 entnommen werden. Für *A. baumannii* im Speziellen, ist eine Übersicht in Abbildung 4 dargestellt.

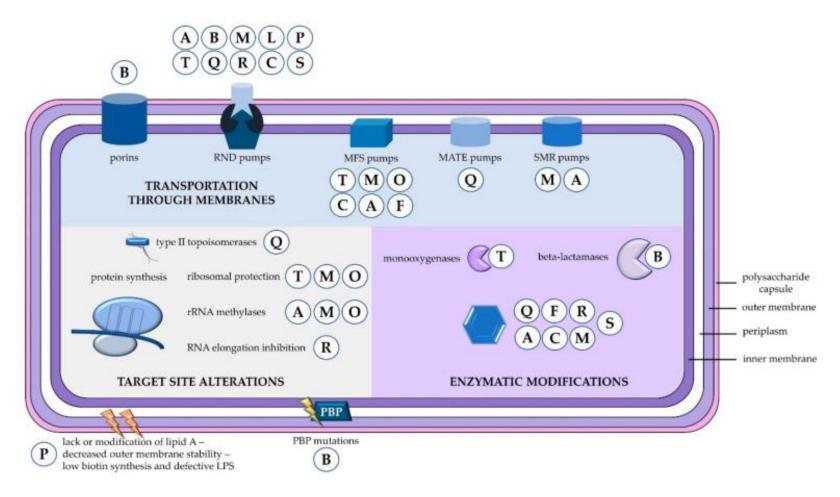


Abbildung 4: Überblick über die Antibiotikaresistenzmechanismen von *Acinetobacter baumannii*. Die Antibiotika sind mit einzelnen Buchstaben in Kreisen dargestellt, wobei das A für Aminoglykoside steht, B für β-Lactame, C für Chloramphenicol, F für Fosfomycin, L für Lincosamide, M für Makrolide, O für Oxazolidinone, P für Polymyxine, Q für Fluorchinolone, R für Rifampicine, S für Sulfonamide und T für Tetracycline. PBP steht für Penicillinbindeproteine, LPS für Lipopolysaccharide, RNA für Ribonukleinsäure und rRNA für ribosomale RNA. SMR steht für "small multidrug resistance", MFS für "major facilitator superfamily", MATE für "multidrug and toxic compound extrusion" und RND für "resistance-nodulation-cell division". Abbildung modifiziert nach Kyriakidis et al. (2021).

Da die Effluxsysteme ein wichtiger Baustein in der Resistenz von Acinetobacter sind, werden diese hier kurz beispielhaft für die mannigfaltigen Resistenzmechanismen der Bakterien beleuchtet. Die Exporter der Prokaryoten werden mittels phylogenetischer Klassifizierung anhand ihrer Proteinsequenzen in fünf Hauptfamilien eingeteilt (Abdi et al., 2020). Eine Übersicht zur Gruppierung und ausführliche Informationen zu den einzelnen Exporterfamilien können in der "Transporter Classification Database" (Saier et al., 2013) gefunden werden. Im Genom von A. baumannii sind mehr als 40 verschiedene Exporter kodiert (Coyne et al., 2011). Sie können in zehn verschiedene Familien unterteilt werden. Doch nur folgende fünf Superfamilien sind an der Resistenz gegen AB beteiligt: Adenosintriphosphat (ATP)-Bindekassetten-Transporter (ABC), engl.: "small multidrug resistance" (SMR), engl.: "multidrug and toxic compound extrusion" (MATE), engl.: "major facilitator superfamily" (MFS) und die engl.: "resistance-nodulation-cell division" (RND) (Coyne et al., 2011). Gerade die letzte Familie sticht besonders hervor, da ein einzelner Exporter der RND-Familie eine Vielzahl an unterschiedlichen Substraten exportieren und so eine Resistenz gegen eine mannigfaltige Auswahl an Substanzen gleichzeitig vermitteln kann. Die meisten anderen Effluxpumpen, wie z. B. TetA, können nur einzelne Substanzen herauspumpen. Wie in Abbildung 5 zu sehen, können die dreiteiligen Exportersysteme der RDN-Familie bei gramnegativen Bakterien das Substrat vom Cytoplasma über den periplasmatischen Raum hinweg direkt aus der Zelle hinaus pumpen (Abdi et al., 2022). Es ist auch möglich, dass sie ihr Substrat aus dem periplasmatischen Raum über die äußere Membran exportieren (Klenotic et al., 2022).

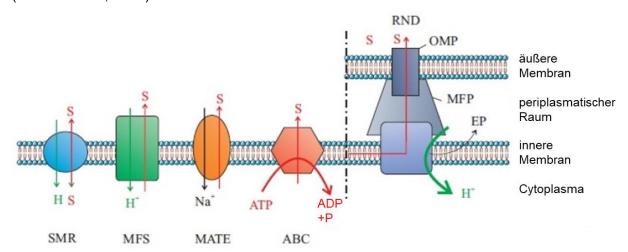


Abbildung 5: Schematische Darstellung verschiedener Exporter. Die gezeigten Antiporter aus den SMR-, MFS- und MATE-Familien transportieren je ein positiv geladenes Wasserstoff- (H\*) oder Natrium (Na\*)-Ion über die Zellmembran ins Cytoplasma und ein Substrat (S) in die andere Richtung. Symporter aus der SMR-Familie transportieren das Ion und Substrat in die gleiche Richtung. ABC-Transporter (ABC) befördern ihr Substrat über die Membran, indem sie ein Phosphat (P) von einem Adenosintriphosphat (ATP) abspalten und so Adenosindiphosphat (ADP) entsteht. RND-Exporter nutzen, wie dieSMR, und MFS-Transporter, den Protonengradienten an der Cytoplasmamembran, um ihr Substrat aus der Zelle zu pumpen. Dabei verbindet das Membranfusionsprotein (MFP) den eigentlichen Exporter (EP) in der inneren Membran mit dem Kanal des äußeren Membranproteins (OMP). SMR steht für "small multidrug resistance", MFS für "major facilitator superfamily", MATE für "multidrug and toxic compound

extrusion", ABC für ATP-Bindekassetten-Transporter und RND für "resistance-nodulation-cell division". Abbildung modifiziert nach Abdi et al. (2020).

Die meisten anderen Effluxpumpen können nur vom Cytoplasma in den periplasmatischen Raum exportieren (Coyne et al., 2011). Dadurch können AB leicht wieder ins Cytoplasma zurückdiffundieren, denn die meisten sind relativ lipophile Moleküle, während Substanzen die komplett aus der Zelle gepumpt werden, es schwerer haben zurück ins Cytoplasma zu kommen, da sie alle drei Kompartimente durchqueren müssen. Die Diffusion ist dabei durch die äußere Membran besonders langsam, da diese eine gute Permeabilitätsbarriere darstellt (Abdi et al., 2020). Deshalb sind RND-Exporter die klinisch relevantesten Effluxpumpen bei gramnegativen multiresistenten Bakterien (Coyne et al., 2011). Die Effluxsysteme aus der RND-Familie sind Antiporter die ein einfach geladenes Wasserstoff-Kation (H<sup>+</sup>) über die Zellmembran hinein und ein Substratmolekül hinaus befördern. Als sekundär aktive Transporter benötigten sie für diesen Vorgang einen entsprechenden Protonengradienten. Der typische dreiteilige Aufbau, sowie andere grundlegende Exportertypen sind in Abbildung 5 dargestellt. RND-Pumpensysteme bestehen aus drei Teilen, dem eigentlichen Exporter, dem Membranfusionsprotein und dem äußeren Membranprotein. Die Aufgabe des Membranfusionsproteins ist unter anderem die Überwindung des periplasmatischen Raums, indem es die Effluxpumpe mit dem Kanal des äußeren Membranproteins verbindet (Abdi et al., 2020). Primär aktive Transporter, wie die ABC-Familie, transportieren ihr Substrat über die Membran unter "ATP-Verbrauch". Dabei wird die Energie für die Pumpe aus der Spaltung von ATP in Adenosindiphosphat und ein Phosphat gewonnen. Sekundär aktive Transporter nutzen u. a. den Natrium- oder H<sup>+</sup>-Gradienten, die entweder natürlicherweise vorhanden sind oder zuvor durch "ATP-Verbrauch" aufgebaut wurden. Wie ebenfalls in Abbildung 5 dargestellt, gibt es bei der MATE-Familie natriumabhängige Antiporter, die ein positiv geladenes Natriumion in die Zelle und ein Substrat über die Membran transportieren. In der MFS- und SMR-Familie gibt es H<sup>+</sup>-abhängige Antiporter, sie funktionieren nach dem gleichen Prinzip wie die Natriumantiporter (Abdi et al., 2020).

#### 1.4 Resistenzplasmide

Plasmide sind zirkuläre extrachromosomale DNA. Sie enthalten in der Regel keine grundlegenden Gene für die Zelle oder den Stoffwechsel. Plasmide bringen also nützliche Gene in die Zelle ein (Bennett 2008). Einige Plasmide können dabei durchaus die Größe eines Chromosoms erreichen, aber viele besitzen zwischen drei Kilobasenpaaren (kb) und 100 kb und sind damit deutlich kleiner als ein bakterielles Genom. Durch ihre Größe bedingt replizieren sich verschiedene Plasmide unterschiedlich. Kleinere Plasmide verwenden dabei häufig die Theta-Methode (Lilly et al., 2015), während bei größeren meistens die Rolling-Circle-Replikation zum Einsatz kommt (del Solar et al., 1998). Neben ihrer Größe werden sie in konjugative und nicht-konjugative Plasmide eingeteilt. Konjugative Plasmide können mit

Hilfe ihrer Transfergene dafür sorgen, dass sie selbst von einer Zelle zur anderen übertragen werden (Bennet 2008; Shintani et al., 2015). Plasmide mit breiter Wirtsspezifität (engl.: "broad host range") können sich in vielen verschiedenen Arten von Bakterien stabil replizieren und auch generationsübergreifend weitergegeben werden. Können Plasmide hingegen nur in nahe verwandten Arten stabil propagiert werden, spricht man von enger Wirtsspezifität (engl.: "narrow host range") (Shintani et al., 2015; Tokuda et al., 2020). Ein weiteres Kriterium zur Unterscheidung von Plasmiden ist ihre Inkompatibilität (Inc) untereinander. Dabei ist es zwei Plasmiden unmöglich sich in der gleichen Bakterienzelle stabil zu propagieren, wenn deren Replikationsursprung (ORI) und/oder die Maschinerie zum Aufteilen der Plasmide in die Tochterzellen während der Teilung gleich oder sehr ähnlich sind. Diese Klassifizierung gibt es bereits seit den 1970er Jahren und sie basiert auf dem Replikationsapparat der Plasmide (Shintani et al., 2015). Die Einteilung ist sehr komplex, da jede Bakterien-Klasse ihre eigenen Inc-Gruppen hat und jede Art nochmals eigene Untergruppen. Außerdem beziehen sich viele Bezeichnungen nur auf ein Genus oder eine Familie. So ist z. B. die Gruppe IncP-4 aus den Pseudomonaden äquivalent zu IncQ bei den Enterobakterien. Gleiches gilt für IncP-1 und IncP, IncP-3 und IncA/C, IncP-6 und IncG/U etc. (Shintani et al., 2015). Resistenzgene können auf Plasmiden kodiert sein, die dann als Resistenzplasmide bezeichnet werden. In Bezug auf die Verbreitung von AR spielen Plasmide eine zentrale Rolle, auch über Artgrenzen hinweg (Bennet 2008; Shintani et al., 2015). Neben Resistenzplasmiden können Bakterien u. a. auch durch Transposons, Phagen (Haaber et al., 2017) oder zufällige Aufnahme externer DNA durch kompetente Zellen an Extrachromosomale DNA, aber Resistenzplasmide Resistenzgene gelangen. Besonderen, stellt neben ihren offensichtlichen Vorteilen auch immer eine Bürde für die Wirtszelle dar. Die Replikation der Plasmide, sowie die Expression fremder oder gar artfremder Gene, sind eine metabolische Belastung. Diese gleichzeitigen Vor- und Nachteile beeinflussen sowohl das Überleben der Wirtszelle als auch die Persistenz der Resistenzplasmide innerhalb der Bakterienpopulation (Bentley et al., 2009; Glick et al., 1995; Jechalke et al., 2013; Shintani et al., 2015; Silva et al., 2012). Denn die metabolische Mehrbelastung muss sich für die Bakterien immer durch einen Vorteil ausgleichen, sei es durch Hemmung der Konkurrenz, da bestimmte ökologische Nischen dadurch zugänglich werden oder das pure Überleben unter ansonsten tödlichen Bedingungen, z. B. in der Gegenwart von AB. Stellvertretend für die Firmicutes sei hier pSK41 aus S. aureus erwähnt. Dieses Multiresistenzplasmid war das erste vollständig sequenzierte, konjugative Resistenzplasmid von einem grampositiven Bakterium (Berg et al., 1998). Bei den Gramnegativen spielte z. B. die Verbreitung von engl.: "extended-spectrum β-lactamases" (ESBL)-Plasmiden eine erhebliche Rolle bei der Behandlung von Infektionen mit **ESBL** Enterobacterales (Paterson 2006). sind β-Lactamasen mit erweitertem

Wirkungsspektrum. Diese können Penicilline, Cephalosporine und Monobactame, aber keine Carbapeneme, spalten. Nach der Ambler-Klassifikation gehören sie zur Gruppe A, sind Serin-β-Lactamasen und können durch β-Lactamaseinhibitoren gehemmt werden (Castanheira et al., 2021; Queenan et al., 2007). Bei *A. baumannii* und anderen wichtigen pathogenen *Acinetobacter*-Arten gelten Plasmide als der Schlüsselfaktor für die Ausbreitung von multiresistenten Stämmen (Dijkshoorn et al., 2007; Evans et al., 2014). Nicht nur im Krankenhaus, sondern auch in der Umwelt spielen Resistenzplasmide, wie z. B. pHHV216, eine entscheidende Rolle. Dieses konjugative Plasmid ist ein gutes Beispiel für Resistenzplasmide, die typischerweise zur Verbreitung von Resistenzen bei Bodenbakterien beitragen (Heuer et al., 2009).

#### 1.5 Acinetobacter baylyi BD413

Der in dieser Dissertation verwendete Stamm Acinetobacter baylyi BD413 geht auf die Arbeiten von W.H. Taylor und E. Juni im Jahre 1960 zurück (Taylor et al., 1961 I, II; III). Dort wurde der Elternstamm BD4 aus dem Boden isoliert. Dieser zeichnete sich durch die Fähigkeit aus, mit Meso-2,3-Butandiol als einziger Kohlenstoffguelle wachsen zu können. Er wurde 1968 als Acinetobacter klassifiziert und erhielt den Namen Acinetobacter calcoaceticus BD4 für ButanDiol. Im gleichen Jahr entstand auch A. baylyi BD413 bei dem Versuch durch UV-induzierte Mutagenese möglichst unbekapselte Mutanten von A. calcoaceticus BD4 zu erzeugen. A. baylyi BD413 wurde damals als Laborstamm ausgewählt, da er aufgrund seiner reduzierten Kapsel bei Wachstum in flüssigem Medium nicht verklumpte. Diese mangelnde Agglutination machte es einfacher mit dem Stamm zu arbeiten. Die verringerte Kapsel ermöglichte A. baylyi BD413 eine gesteigerte Kompetenz im Vergleich mit seinem bereits natürlich kompetenten Elternstamm A. calcoaceticus BD4. A. baylyi BD413 gilt als einer der am besten natürlich transformierbaren Stämme (Barbe et al., 2004; Ellision et al., 2008; Palmen et al., 1997; Stuanis et al., 2014). Im Rahmen einer Seguenzierung der 16S ribosomalen Desoxyribonukleinsäure (rDNA) im Jahr 1996 wurde vormals A. calcoaceticus BD413 zu A. baylyi BD413 reklassifiziert (Ibrahim et al., 1997). Vor allem im englischsprachigen Raum ist A. baylyi BD413 auch unter der Bezeichnung A. baylyi ADP1 zu finden (Patel et al., 1975; Vaneechoutte et al., 2006). Grund hierfür ist die Umbenennung von A. calcoaceticus BD413 zu A. calcoaceticus ADP1 im Zuge von Experimenten zu Hydrolasen 1975 im Labor von Nicholas Ornston an der Yale Universität (Patel et al., 1975). Bei der Gattung Acinetobacter handelt es sich um chemoheterotrophe, gramnegative, kokkoide Stäbchen, die strikt aerob, Katalase-positiv, nicht fermentierend, nicht sporenbildend und Oxidase-negativ sind (Barbe et al., 2004; Baumann et al., 1968; 2008). Für die meisten Acinetobacter-Arten liegt die optimale Wachstumstemperatur bei 33 - 35 °C. Nosokomial bedeutsame Arten haben zumeist ein an

den Menschen angepasstes Temperaturoptimum von 37 - 42 °C. *Acinetobacter* bildet weiße, nicht pigmentierte, glatte, klar abgegrenzte, runde, ca. 1-2 mm große Kolonien auf Blutagar (Doughari et al., 2011). Die γ-Proteobakterien gelten als anspruchslos und sind entsprechend ubiquitär anzutreffen. Typischerweise handelt es sich dabei um Bodenbewohner, sie sind aber auch in wässrigen Milieus oder laut Barbe et al. (2004) "auf allem was lebt" zu finden (Barbe et al., 2004). Dabei wird auch der Mensch besiedelt (Barbe et al., 2004; Chen et al., 2008). Die metabolisch vielseitigen Bakterien können eine Vielzahl an ungewöhnlichen Substanzen verstoffwechseln, wie z. B. das oben bereits erwähnte Meso-2,3-Butandiol (Taylor et al., 1961 I, II; III) oder Triacylglycerole und Wachsester (Suárez et al., 2020). Was kaum bekannt sein dürfte, ist, dass die Spezies der Gattung *Acinetobacter* zu den 10 häufigsten Kontaminanten von Heizöl gehören (Dissertation Leuchtle, 2015).

Die bekannteste metabolische Besonderheit bei A. baylyi BD413 ist seine Fähigkeit mit aromatischen Substanzen als einzige Kohlenstoffguelle wachsen zu können (Barbe et al., 2004; Stuani et a., 2014; Taylor et al., 1961 I, II; III). Wie alle Acinetobacter, ist auch A. baylyi BD413 nicht begeißelt und wird deshalb als unbeweglich beschrieben (Barbe et al., 2004; Chen et al., 2008; Doughari et al., 2011). Der Gattungsname Acinetobacter beschreibt dies sehr gut, da er sich aus den griechischen Wörtern "akínētos" (unbeweglich) und "baktēría" (Stäbchen) zusammensetzt (Corral et al., 2021; Doughari et al., 2011). Dabei sind inzwischen bei A. baylyi flagellenunabhängige Bewegungsformen bekannt (Bitrian et al., 2013; Gohl et al., 2006; Leong et al., 2017; Xiong et al., 2020). Für die "twitching motility", von engl.: "zucken", sind spezielle Typ-IV-Pili verantwortlich (Bitrian et al., 2013; Gohl et al., 2006; Leong et al., 2017; Xiong et al., 2020), dabei schwärmen die Kolonien blütenartig auf dem Agar aus (Xiong et al., 2020). Neben der Fortbewegung können Typ-IV-Pili für die Anhaftung an biotische und abiotische Oberflächen von Bedeutung sein (Gohl et al., 2006). Ein weiteres spezielles Typ-IV-System dient neben der Fortbewegung auch dem Töten von konkurrierenden Bakterien und der Aufnahme von DNA zum Einbau in das eigene Genom (Xiong et al., 2020). In seiner natürlichen Umgebung verwendet A. baylyi BD413 u. a. sein Typ VI Sekretionssystem (T6SS) um andere Bakterien zu lysieren und so an frische DNA zu gelangen (Leong et al., 2017; Lin et al., 2019; Ringel et al., 2017; Smith et al., 2020). Dabei können sowohl einzelne Gene und Genkassetten in das Genom integriert werden (Palmen et., 1993; Palmen et al., 1997; Suárez et al., 2020) als auch ganze Plasmide in die Zelle aufgenommen werden (Heuer et al., 2009; Palmen et al., 1997; Singer et al., 1986). Im Gegensatz zu natürlich kompetenten Stämmen von Haemophilus influenzae, Neisseria gonorrhoeae und anderen, kann A. baylyi BD413 auch artfremde DNA aufnehmen (Hülter et al., 2008; Palmen et al., 1997; Suárez et al., 2020). Die Chance der aufgenommenen DNA ins Genom integriert zu werden ist für artfremde DNA um 10<sup>9</sup> (de Vries et al., 2002) bis 10<sup>10</sup>

(Hülter et al., 2008) niedriger. Heterologe DNA kann deshalb so schlecht ins Genom integriert werden, weil sie auf illegitime Rekombination angewiesen ist. Diese tritt aber nur sehr selten auf, da sie im Gegensatz zur homologen Rekombination auf Mikrohomologien von 3-8 Basenpaaren (bp) beruht (de Vries et al., 2002; Hülter et al., 2008). Wird die aufgenommene DNA auf mindestens einer Seite von homologen Regionen flankiert, steigert sich die Wahrscheinlichkeit der Integration nochmals um das 10<sup>5</sup>-Fache (de Vries et al., 2002), da hier die homologe Rekombination greifen kann. Die besten Ergebnisse lassen sich mit DNA erzielen, welche an beiden Enden mit einer mindestens 500 bp langen homologen Region ausgestattet ist (Palmen et al., 1997; Suárez et al., 2020).

Die natürliche Transformation lässt sich in vier Phasen unterteilen. In der ersten wird die Zelle in einen Kompetenzzustand versetzt. Die "frühen Kompetenzgene" (comA, comP, comQ etc.) sorgen für die benötigte Sensorik um die inneren und äußeren Bedingungen der Zelle einschätzen zu können und veranlassen die Expression der "späten Kompetenzgene" (comC, comE, comG, recA etc.). Diese sind für die benötigten zellulären Strukturen für die Aufnahme und Integration von DNA zuständig. Sobald die Bakterien bereit sind beginnt Phase zwei, in der freie DNA durch Rezeptoren an der Zelloberfläche gebunden wird. Solange die DNA doppelsträngig ist, spielt ihre Länge und Beschaffenheit für die Aufnahme nur eine untergeordnete Rolle. In Phase drei wird die DNA in die Zelle aufgenommen. Bei diesem Vorgang wird die doppelsträngige DNA (dsDNA) durch Hydrolyse des einen Stranges in einen Einzelstrang umgewandelt. Bei A. baylyi BD413 beträgt die Rate der aufgenommenen DNA ca. 60 Basenpaare pro Sekunde (bp/s) (Palmen et., 1993). Mit der Integration der akquirierten DNA beginnt und endet die vierte Phase (Palmen et al., 1997). Eventuell aufgenommene Plasmide werden im Cytoplasma wiederhergestellt und bleiben als ringförmige, extrachromosomale DNA erhalten. Der gesamte Prozess der natürlichen Transformation ist in Abbildung 6 nochmals bildlich dargestellt.

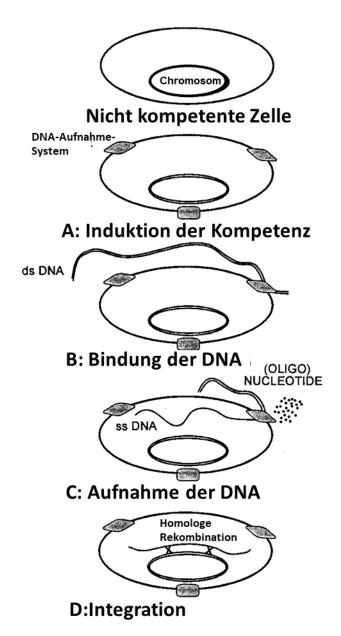


Abbildung 6: Darstellung der vier Phasen der natürlichen Transformation. A: Die nicht kompetente **Bakterienzelle** wird durch Induktion der Kompetenz zur Aufnahme von Desoxyribonukleinsäure (DNA) befähigt. Hierfür wurde in der kompetenten Zelle die Gene für das DNA-Aufnahme-System aktiviert die entsprechenden Sensoren und Komponenten in die Zellwand/-Membran eingebaut. B: Die nun vorhandenen Rezeptoren binden freie doppelsträngige (ds) DNA an die Zelloberfläche. C: Bei der Aufnahme der DNA diese in einzelsträngige (ss) DNA umgewandelt. D: Plasmide werden Cytoplasma rezyklisiert und vervollständigt. Aufgenommene **DNA-Stücke** werden bei entsprechender Homologie ins Genom integriert. Abbildung modifiziert nach Palmen et al. (1997).

Durch seine exzellente Effizienz in der natürlichen Transformation gilt *A. baylyi* BD413 als wichtiger Modellorganismus für pathogene *Acinetobacter*-Spezies, wie z. B. *A. baumannii* (Augsburger et al., 2019; Barbe et al., 2004; Elliot et al., 2011; Riva et al., 2022; Merod et al., 2014; Vaneechoutte et al., 2006). *A. baylyi* BD413 selbst gilt als apathogen und wird nach der Biostoffverordnung §3 in die Risikogruppe 1 (R1) eingeordnet. Aber auch wenn es "unwahrscheinlich" ist sich mit dem Bakterium zu infizieren, ist

dies dennoch möglich. Chen et al. (2008) berichteten z. B. von sechs Patienten, die sich mit A. baylyi im Krankenhaus infiziert hatten. Keiner der Patienten verstarb, dabei wurden nur drei von sechs antibiotisch behandelt. Außerdem lagen bei allen Erkrankten mehrere Grundleiden bereits vor der Bakteriämie vor. Gerade für A. baumannii stellt A. baylyi BD413 ein sehr gutes Labormodell dar, da diese beiden eine sehr hohe Ähnlichkeit aufweisen. So teilen sich die beiden mehr als zwei Drittel ihrer Gesamtgene. Obwohl A. baylyi BD413 eigentlich ein Umweltorganismus ist, weist er im Kerngenom eine größere Übereinstimmung mit A. baumannii AYE, einem typischen humanpathogenen Vertreter, auf, als mit dem nicht nosokomialen A. baumannii SDF (Adams et al., 2008; Vallenet et al., 2008). Auch in ihrer Fortbewegung sind sich A. baylyi BD413 und A. baumannii sehr ähnlich, beide beherrschen z. B. die "twitching motility" (Corral et al., 2021; Leong et al., 2017). Interessanterweise galt auch A. baumannii Anfang der 1970er Jahre als ungefährlich und wenig pathogen (Wong et

al., 2017). A. baumannii ist ein typischer Erreger nosokomialer Infekte, wobei am häufigsten Aspirationspneumonien und Katheter-assoziierte Bakteriämien auftreten (Wong et al., 2017). Insgesamt handelt es sich in der Regel um opportunistische Infektionen, die oft im Zusammenhang mit der Biofilmbildung stehen und dabei Fremdkörperabhängig oder unabhängig sein können, wie z. B. Pneumonie, Sepsis, Harnwegsinfektion, Wundinfektion, Osteomyelitis, nekrotisierende Fasziitis, Endokarditis, Meningitis, Peritonitis, Endophthalmitis oder Keratitis. Solche Infektionen treten nur auf, wenn die natürlichen Barrieren der Haut und Schleimhäute durchdrungen wurden, sei es durch eine Operation, wie z. B. Gelenkersatz oder durch eine Verletzung (Almasaudi 2018; Cisneros et al., 2002; Karageorgopoulos et a., 2008; Townsend et al., 2015). Während der Konflikte in Afghanistan und Irak zu Beginn der 2000er Jahre war Acinetobacter eine der Hauptursachen für Infektionen nach Verwundung (Almasaudi 2018; Wong et al., 2017). Außerhalb des Krankenhauses ist A. baumannii vor allem in warmen, tropischen Gebieten, wie Australien, Ozeanien und Asien ein Problem. Dort sind an erster Stelle Menschen mit eingeschränktem Immunsystem und Grunderkrankungen, wie Diabetes, Niereninsuffizienz, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) oder Krebs betroffen. Aber auch starke Raucher und Alkoholabhängige gehören zur Risikogruppe (Almasaudi 2018; Cisneros et al., 2002; Karageorgopoulos et a., 2008; Townsend et al., 2015). Das Arbeiten im Labor wird weiterhin vereinfacht durch die Tatsache, dass das Genom von A. baylyi BD413 vollständig sequenziert und unter der Nummer NC\_005966.1 einsehbar ist. A. baylyi BD413 wäre theoretisch resistent gegenüber β-Lactam-Antibiotika, da er eine intrinsische AmpC β-Lactamase besitzt, welche die Charakteristika einer Cephalosporinase aufweist. Das Gen wird allerdings nur sehr schwach exprimiert, wodurch der Stamm sensibel bleibt (Beceiro et al., 2007).

#### 1.6 Minimale Selektive Konzentration

Der selektierende Einfluss von hohen Antibiotika-Konzentrationen auf Bakterien gehört zum klinischen Alltag. Die geringste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, die noch bakterielles Wachstum verhindert, wird dabei als Minimale Hemmkonzentration (MHK) bezeichnet. Sie erlaubt die Beurteilung der Resistenz eines Erregers gegenüber einer inhibierenden Substanz. Wenn die MHK eines Bakteriums höher ist als die maximal zu erreichende Konzentration am Wirkort im Patienten, gilt ein Isolat als resistent gegenüber diesem AB. Doch welchen Einfluss haben niedrigere Konzentrationen von AB? Aus klinischer Sicht sind Konzentrationen unterhalb der MHK irrelevant, denn in pharmakodynamischen Modellen wird davon ausgegangen, dass unterhalb der MHK der sensiblen Wildtyppopulation (MHK<sub>sen</sub>) keine Selektion stattfindet, da diese durch die AB nicht inhibiert wird. Stattdessen wird eine Selektion der resistenten Mikroorganismen in Konzentrationsfenstern zwischen der MHK<sub>sen</sub> und der MHK von resistenten Bakterien

(MHK<sub>res</sub>) angenommen (Drlica et al., 2007). Studien zeigen jedoch, dass auch niedrigere Konzentrationen von antimikrobiellen Substanzen erheblichen Einfluss auf das Wachstum von Bakterien haben können (Baquero et al., 1998; Gullberg et al., 2001; Liu et al., 2001). Dabei werden die sensiblen Mikroorganismen durch die Effekte der AB, z. B. die teilweise Inhibierung enzymatischer Prozesse etc., in ihrem Wachstum verlangsamt. Resistente Isolate hingegen werden nicht durch geringe Antibiotikakonzentrationen beeinflusst und können in diesen Konzentrationsfenstern vergleichsweise schneller wachsen als ihre sensible Konkurrenz. Aber auch ein Resistenzmechanismus kann einen gewissen Wachstumsnachteil darstellen, z. B. durch den Erhalt und die Replikation eines großen Resistenzplasmides. Auch die Einschränkung zellulärer Transportmechanismen, die Veränderung in regulatorischen Genen, sowie die zusätzliche Expression fremder oder gar artfremder Gene können eine metabolische Belastung darstellen (Gullberg et al., 2011; Jechalke et al., 2013). Deshalb wird in dieser Arbeit bevorzugt die Minimale Selektive Konzentration (MSC) genutzt. Diese wurde von Gullberg et al. (2011) eingeführt und beschreibt die Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, bei der die Wachstumsrate einer sensiblen und einer resistenten Bakterienpopulation gleich sind. Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, findet bereits unterhalb der MHK<sub>sen</sub> eine Selektion statt, denn die sensible Population wächst bis zur MSC schneller als die resistente. Wird die MSC überschritten, weist hingegen die resistente Population ein besseres Wachstum auf. Oberhalb der MSC wird also bereits die resistente Population selektiert. Dabei wird die MSC maßgeblich durch die Resistenzmechanismen und deren Fitnesskosten beeinflusst. Die MSC liegt umso höher, desto geringer die Wachstumsrate der resistenten Population ist. Denn erst wenn die verringerte Wachstumsrate der resistenten Population durch die negativen Effekte der AB auf die sensiblen Bakterien ausgeglichen wird, kann eine Selektion in Richtung der resistenten Population erfolgen (Gullberg et al., 2001)

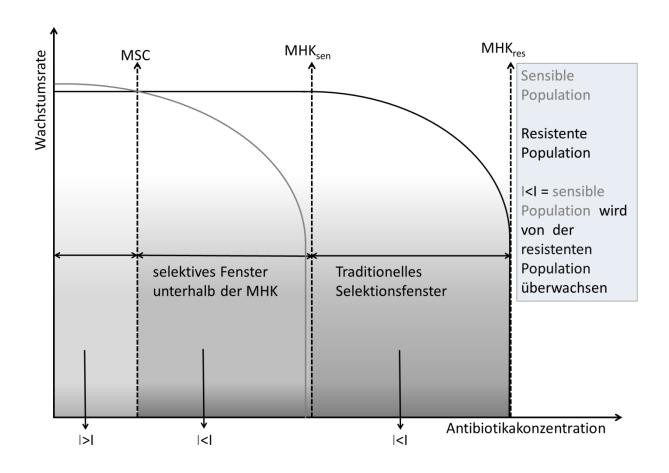


Abbildung 7: Darstellung des Wachstumsverhaltens einer sensiblen und einer resistenten Bakterienpopulation bei steigender Antibiotikakonzentration, sowie verschiedene Selektionsfenster. Die Minimale Selektive Konzentration (MSC) beschreibt den Punkt gleicher Wachstumsraten der beiden Populationen. Die MHKsen und MHKres stehen für die Minimale Hemmkonzentration (MHK) der sensiblen (sen) und resistenten (res) Bakterien. Abbildung modifiziert nach Gullberg et al. (2011).

Bisherige MSC-Experimente haben sich auf die üblichen Laborstämme wie *E. coli* und *Salmonella spp.* konzentriert. In diesen ersten Kompetitionsexperimenten konnte eine Selektion bei sehr niedrigen Antibiotikakonzentrationen bis zu hundertfach unterhalb der MHK gezeigt werden (Gullberg et al., 2011). Für Umweltbakterien, wie z. B. *Acinetobacter spp.*, gibt es hingegen kaum Daten. Dabei spielen diese in der Umwelt (Broszat et al., 2014), der humanen Umgebung (Al Atrouni et al., 2016) und auch immer stärker im klinischen Umfeld, eine entscheidende Rolle. Besonders *Acinetobacter* Spezies, wie *A. baumannii*, rücken aufgrund ihrer Carbapenem-Resistenz und auch möglichen Panresistenz immer mehr ins Rampenlicht (Wong et al., 2017). Im Zusammenhang mit der MSC und nosokomialen Isolaten sind auch deren vielfach vorhandenen sekundären Mutationen besonders interessant, denn durch diese werden oft die negativen Einflüsse der Resistenz kompensiert. Die Wachstumsrate der resistenten Bakterien kann, im Vergleich zur Wildtyppopulation, dadurch nur gering oder gar nicht erniedrigt sein (Andersson et al., 2010).

#### 1.7 Fluorophore

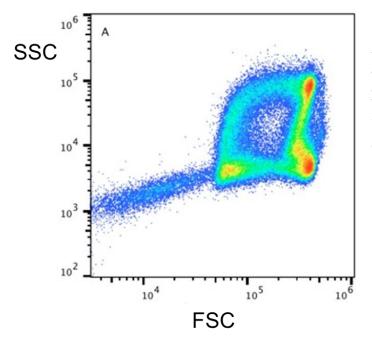
Als Fluoreszenz wird die Emission von Licht durch ein System bezeichnet, welches zuvor selbst durch Photonen angeregt wurde. Wie auch die Phosphoreszenz, gehört die Fluoreszenz zur Gruppe der Photolumineszenz. Der Unterschied ist, dass sich die Emission bei der Fluoreszenz im Bereich von 0,1 bis >100 Nanosekunden bewegt, während bei der Phosphoreszenz bedeutend länger Photonen emittiert werden können (Datta et al., 2020; Lavis et al., 2008; Mullins 1994). Fluorophore sind grundsätzlich Stoffe, die zur Fluoreszenz fähig sind. Fluorophore gibt es in vielen verschiedenen Varianten und Ausführungen. Der bekannteste Vertreter der natürlichen Fluorochrome dürfte wohl das grün fluoreszierende Protein (GFP) sein. Dieser Vertreter der proteinbasierten Fluoreszenzfarbstoffe absorbiert blauviolettes Licht bei 395 Nanometer und emittiert grünes, energieärmeres Licht bei einer Wellenlänge von 509 nm (Chalfie et al., 1994; Kendall et al., 1998; Lavis et al., 2008). Er stammt ursprünglich aus der Qualle Aequorea victoria und ist dort Teil der Biolumineszenz dieser Tiere (Chalfie et al., 1994; Kendall et al., 1998; Lavis et al., 2008; Tombolini et al., 1997). GFP gehört, wie beispielweise die aromatischen Aminosäuren (AS) Phenylalanin (F) und Tyrosin, Chinin, Flavine oder auch so manches Coenzym, wie etwa das Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD), zu den endogenen Fluorophoren (Lavis et al., 2008). Im Folgenden konzentriert sich diese Arbeit auf fluoreszierende Proteine, da diese die Hauptgruppe der Fluorophore bilden, die bei der Durchflusszytometrie Verwendung finden. Bereits diese Gruppe bietet eine schier unbegrenzte Zahl an verschieden Farbstoffen, denn im Laufe der Zeit wurden immer mehr künstlich verbesserte Fluorophore, wie etwa das eGFP veröffentlicht. Außerdem gibt es viele Farbvarianten von GFP, wie z. B. die gelbe Variante YFP oder das blau leuchtende CFP (Bevis et al., 2002; Taghizadeh et al., 2008). Außerdem gab es Weiterentwicklungen, wie das aus DsRed entstandene mCherry (Li et al., 2008). Der rotfluoreszierende Farbstoff DsRed stammt ursprünglich aus der Koralle Discosoma spec. und wurde nach dieser Art benannt: Ds steht für Discosoma und red für engl.: "Rot".

#### 1.8 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode zur Analyse von Zellen anhand ihrer Fluoreszenz und ihrer Reflektion beim Passieren einer Lichtquelle. Einige Gerätevarianten können die untersuchten Zellen auch direkt in verschiedene Gefäße sortieren und so eine bestimmte Gruppe von Zellen aufgrund ihrer Eigenschaften isolieren. Für eine Messung werden zunächst die Zellen in einer Flüssigkeit gelöst und üblicherweise in 5 ml Probenröhrchen oder einer Mikrodilutionsplatte in das Zytometer eingespannt. Dieses entnimmt mittels einer Kanüle die Flüssigkeit aus dem jeweiligen Gefäß und pumpt diese zu

einer Düse. Dort wird die Probe in einem Volumenstrom fokussiert und mit einem Hüllstrom umgeben. Durch diese hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen nach dem Prinzip der Laminarströmung vereinzelt und in einer Kanüle der Messküvette zugeführt. Der Mantelstrom besteht in der Regel aus einer gepufferten Lösung, wie z. B. einer phosphatgepufferten Salzlösung. Manche Geräte verwenden aber auch einfach A. dest., wie das in dieser Arbeit verwendete CytoflexS der Firma Beckman Coulter. Die Messküvette besteht im Allgemeinen aus Glas oder Quarz. In der Durchflussmesszelle passieren die Zellen einen Laserstrahl, je nach Anwendung und Fluorophor kommen Laser mit verschiedenen Wellenlängen zum Einsatz. Ein Laser ist ein Gerät zur Erzeugung und Verstärkung von kohärentem Licht. Sein Name leitet sich von dem englischen Akronym: "light amplification by stimulated emission of radiation" ab. In dieser Arbeit werden die Begriffe Laser und Laserstrahl synonym verwendet. Das von der Zelle reflektierte und emittierte Licht wird von verschiedenen Detektoren ausgewertet. Das Vorwärtsstreulicht wird vom sog. FSC für engl.: "Forward light Scatter" eingefangen und interpretiert. Es liefert Informationen über die Größe der Zelle. Der FSC sammelt Informationen von 1-10 ° zur Achse des Lasers (Cho et al., 2010). Damit der FSC nicht direkt vom Laserstrahl getroffen wird, blockiert ein Metallblock den direkten Strahlengang. Dieser Sperrblock verhindert das direkte Auftreffen des Laserstrahls auf den FSC, lässt jedoch Licht ab 1 ° Abweichung passieren. Der sog. SSC von engl.: "Side light Scatter" verarbeitet das Seitwärtsstreulicht. Er sitzt in einem 90 ° Winkel zum Lichtstrahl und bietet Informationen über die Granularität und damit über die Komplexität der Zelle (Cho et al., 2010; McKinnon 2018). Handelsübliche Durchflusszytometer sind für das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen konstruiert. Die Detektion von Bakterien stellt oft eine Herausforderung dar, weil diese im Vergleich zu eukaryotischen Zellen sehr viel kleiner und weniger komplex in ihrem Zellaufbau sind. Für die meisten Geräte sind Bakterien nur mit FSC und SSC kaum von Luftblasen zu unterscheiden, da diese in etwa die gleiche Größe und im Vergleich zu eukaryotischen Zellen kaum Granularität besitzen. Umso wichtiger ist der dritte Fluoreszenz-Detektor für das emittierte Licht. Nach Anregung durch den Laser fluoreszieren bestimmte Farbstoffe. Die durch die Fluoreszenz emittierten Photonen werden in einem Fluoreszenzdetektor ausgewertet. Die elektrischen Signale der Detektoren werden schließlich verarbeitet und über eine geeignete Schnittstelle an den PC übermittelt. Dort werden mit einem speziellen Programm sowohl die Daten des Durchflusszytometers dargestellt als auch die Maschine teilweise oder vollständig gesteuert. Die Daten des Durchflusszytometers werden typischerweise in Streudiagrammen dargestellt. Dabei wird, wie in Abbildung 8 gezeigt, jede einzelne analysierte Zelle als eigenständiges Ereignis gewertet und als Punkt dargestellt. So entstehen die charakteristischen Punktwolken. Auf den Streudiagrammen können

verschiedene Daten gegeneinander aufgetragen werden, wie z. B. FSC gegen SSC oder Fluoreszenz 1 gegen Fluoreszenz 2.



**Abbildung** Streudiagramm 8: **Patientenblut** nach einer peripheren Venenpunktion. sind Aufgetragen die gemessenen **Ereignisse** Vorwärtsdetektors (FSC) gegen die des Seitwärtsdetektors (SSC). Das typische Muster für gesunde Erythrozyten ist dabei gut zu erkennen. Abbildung modifiziert nach Rico et al. (2018).

# 1.9 Staphylococcus aureus, Staphylococcus argenteus und Staphylococcus schweitzeri

Die drei Staphylokokkenarten, Staphylococcus aureus, Staphylococcus argenteus und Staphylococcus schweitzeri sind sehr nahe verwandt. Jedoch wurde S. aureus bereits im Jahre 1884 von dem Göttinger Chirurgen Friedrich Julius Rosenbach erstmals beschrieben (Schwenzer et al., 2010). S. argenteus und S. schweitzeri hingegen wurden erst mehr als 130 Jahre später als eigene Spezies definiert (Tong et al., 2015). Zuvor galten sie als Untergruppe von S. aureus und gehörten zu dessen klonalen Komplex (CC) 75 (Johansson et al., 2019; Kaden et al., 2018; Schuster et al., 2017; Tong et al., 2015). Der Typstamm für S. argenteus MSHR1132 wurde 2006 aus der Blutprobe einer indigenen Australierin isoliert (Tong et al., 2015). Der Typstamm für S. schweitzeri FSA084 wurde in den Regenwäldern Gabuns von einer Rotschwanzmeerkatze (Cercopithecus ascanius) isoliert. Im Gegensatz zu S. aureus und S. argenteus scheint S. schweitzeri aber primär nur bei afrikanischen Wildtieren und nicht bei Menschen vorzukommen (Akoua-Koffi et al., 2022; Grossmann et al., 2021; Tong et al., 2015; Zhang et al., 2017). Allerdings sind für S. schweitzeri einige wenige Besiedlungen von Menschen bekannt, diese scheinen jedoch ausschließlich "Spillover-Ereignisse" nach dem Kontakt mit Wildtieren zu sein und führten bisher nicht zu Infektionen (Akoua-Koffi et al., 2022; Grossmann et al., 2021). Als Mitglieder der Gattung Staphylococcus teilen sie sich grundlegende Eigenschaften, es handelt sich um chemoorganoheterotrophe, fakultativ anaerobe, unbewegliche, 0,8 - 1,2 µm große, grampositive, nicht sporenbildende Kokken. Dabei wachsen die kugelförmigen Bakterien

typischerweise in weintraubenförmigen Haufen, wie der Name Staphylokokkus bereits erahnen lässt, da er sich aus den griechischen Wörtern "σταφυλή" (Weintraube) und "κόκκος" (Korn) zusammensetzt. Physiologisch sind die drei Arten kaum zu unterscheiden und werden mit den üblichen klinischen Methoden meist als S. aureus identifiziert (Schuster et al., 2017). Dabei sind sowohl altgediente Methoden wie die Bunte Reihe, aber auch moderne Methoden wie 16S-rRNA-Sequenzierung (ribosomale Ribonukleinsäure) zur Differenzierung der verschiedenen Spezies ungeeignet (Tong et al., 2015; Schuster et al., 2017; Schuster 2013). Auf Blutagar unterscheidet sich S. argenteus allerdings von S. aureus und S. schweitzeri durch die Bildung von grauen bis weißen, statt gelben Kolonien. Der Artname Staphylococcus aureus leitet sich von dem lateinischen Wort "aurum" für Gold ab und bezieht sich auf die gelbgoldene Färbung der Kolonien. Diese charakteristische Farbe entsteht durch die Einlagerung des Karotinoids Staphyloxanthin in die Zellmembran, um sich besser vor oxidativem Stress zu schützen und so widerstandsfähiger gegen das Immunsystem eines potentiellen Wirtes zu werden (Liu et al., 2005; Clauditz et al., 2006; Olivier et al., 2009). S. aureus und S. schweitzeri bilden in der Regel runde, gelbe, scharf abgegrenzte, glatte, matte bis glänzende Kolonien mit einem Durchmesser von 1 – 4 mm. S. argenteus wirkt hingegen wie ein S. aureus, der die Fähigkeit zur Bildung des Pigments Staphyloxanthin verloren hat und deshalb, wie in Abbildung 9 dargestellt, graue bis weiße Kolonien bildet (Hold et al., 2011; Tong et al., 2015). Von der Graufärbung der Kolonien und dem lateinischen Wort "argenteus" für Silber leitet sich auch der Artname Staphylococcus argenteus ab. S. schweitzeri hingegen erhielt seinen Namen zu Ehren des Friedensnobelpreisträgers Ludwig Phillip Albert Schweitzer (Tong et al., 2015). Die Verbreitung der drei Arten ist sehr unterschiedlich. S. schweitzeri ist regional stark begrenzt und kommt eigentlich nur auf afrikanischen Wildtieren, spezifisch in den Nasen von Primaten und Fledermäusen, vor (Grossmann et al., 2021). S. aureus hingegen ist ubiquitär verbreitet. Er ist neben dem Menschen auf so gut wie jedem warmblütigen Tier und in dessen Umgebung zu finden (Acker et al., 2019; Aires-de-Sousa 2017; Ariza-Miguel et al., 2014; Boost et al., 2008; Heaton et al., 2020; Kluytmans et al., 1997; Loncaric et al., 2013; Mallardo et al., 2013; Porrero et al., 2014; Schaumburg et al., 2011; Schmithausen et al., 2015, van den Honert et al., 2021; Vincze et al., 2013; Wardyn et al., 2012; Weese et al., 2011; Worthing et al., 2018). Bei S. argenteus ist die genaue Verbreitung noch immer unbekannt (Kaden et al., 2018, Schuster et al., 2017). Dabei scheint S. argenteus Tiere und Menschen besiedeln zu können. Während der Typstamm S. argenteus MSHR1132 von einem Menschen isoliert wurde, fand sich die Art ebenfalls bei einem wilden westlichen Flachlandgorilla (Gorilla gorilla gorilla) aus dem afrikanischen Regenwald (Schuster et al., 2017). Bis 2017 gab es Berichte aus: Mayotte (Chantratita et al., 2016), Australien (Tong et al., 2015), Gabun (Schuster et al., 2017), Neuseeland, Kambodscha, Thailand, China,

Myanmar, Belgien, Frankreich, Fidschi, Französisch-Guayana, sowie aus Trinidad und Tobago (Aung et al., 2017). Das Hauptverbreitungsgebiet lag dabei in Asien. Neuere Berichte über Isolate aus den USA weisen jedoch auf eine weltweite Verbreitung hin (Eshaghi et al., 2021).

Alle drei Arten sind typischerweise Teil der Haut-, Mund- und Rachenflora. S. aureus und S. schweitzeri sind dabei vor allem in der Nase zu finden (Grossman et al., 2021; Kluytmans et al., 1997). Dabei teilen sich S. aureus, S. argenteus und S. schweitzeri, soweit bekannt, nicht nur die Kolonie- und Stoffwechseleigenschaften, sondern auch die Wachstums- und Nährstoffansprüche. Deshalb werden diese hier folgend nur für S. aureus beschrieben, gelten aber grundsätzlich auch für die anderen beiden Arten. Das Wachstumsoptimum liegt bei 37 °C, angepasst an die warmblütigen Wirte, aber Wachstum kann grundsätzlich von 7 bis 48 °C stattfinden (Hennekinne et al., 2012). S. aureus überlebt mit seiner hohen Säuretoleranz auch Magenpassagen, Wachstum beginnt aber erst ab einen pH-Wert von 4,3. Wieder angepasst an die Wirte liegt das pH-Optimum für das Wachstum von S. aureus bei pH 7 (Hennekinne et al., 2012). S. argenteus überlebt ebenfalls die Passage durch den Magen, da er schon aus Faecesproben isoliert wurde (Schuster et al., 2017). Ein weiteres Beispiel für die außergewöhnliche hohe Tenazität bildet die Unempfindlichkeit gegenüber Salz- und Trockenstress, denn S. aureus kann bis zu einem aw-Wert von 0,86 wachsen (Hennekinne et al., 2012). Der aw-Wert bezeichnet die Wasseraktivität und weist das biologisch aktive Wasser aus. So ausgestattet könnte S. aureus theoretisch auch in der Umwelt überleben und wird z. B. immer wieder in Lebensmitteln gefunden (Li et al., 2021, Rodriguez-Lazaro et al., 2017). Aber bevorzugt besiedelt er als fakultativ pathogener Organismus einen warmblütigen Wirt. Um sich die Besiedelung eines potentiellen Wirtes zu erleichtern und dabei eventuell Krankheiten auszulösen, besitzt S. aureus ein ganzes Arsenal an Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren. Neben dem farbgebenden Staphyloxanthin, welches einen eher passiven Virulenzfaktor darstellt, besitzt S. aureus u. a. verschiedene Hämolysine  $(-\alpha, -\beta, -\gamma, -\delta)$  und mannigfaltige Toxine, die meist auf Phagen kodiert sind und nur in einzelnen Stämmen vorkommen. Darunter ist das sog. Panton-Valentin-Leukozidin (PVL); dieses Toxin erlaubt es direkt gegen das Immunsystem eines Wirtes vorzugehen. Es ist in der Lage mittels Porenbildung Makrophagen und Granulozyten direkt abzutöten (Bourn et al., 2013). Außerdem kann S. aureus die für Staphylokokken typischen PSMs (engl.: "Phenol soluble modulins") bilden. Hierbei handelt es sich um in Phenol lösliche, das Immunsystem modulierende Peptide, die als hervorstechendes Merkmal eine amphipatische α-Helix ausbilden (Cheung et al., 2014; Mehlin et al., 1999; Periasamy et al., 2012).

Die PSMs werden anhand ihrer Größe in zwei Klassen eingeteilt.  $\beta$ -PSMs umfassen ca. 45 AS und spielen eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung durch Staphylokokken (Cheung et

al., 2014). α-PSMs hingegen sind nur halb so groß und sind vorrangig Toxine. Ihr bekanntester Vertreter ist das δ-Toxin (Cheung et al., 2014). Das Superantigen TSST-1 (engl.: "Toxic Shock Syndrom Toxin") hingegen kann zum septischen Schock führen (Stingley et al., 2014). Die exofoliativen Staphylokokken-Toxine A und B können die Rittersche-Krankheit auslösen, welche im englisch sprachigen Raum auch "Staphylococcal Scalded Skin Syndrome" bekannt ist. Diese Erkrankung tritt vor allem bei Kleinkindern auf und verursacht großflächige Hautablösungen (Patel & Finlay, 2003). Die Enterotoxine -A, -B, -C, -D etc. können Lebensmittelvergiftungen auslösen. Dabei sind diese Toxine sehr hitzestabil und können auch zur Lebensmittelvergiftung führen, wenn das Bakterium selbst bereits abgestorben ist (Argudin et al., 2010). Um sich vor dem Immunsystem eines Wirtes zu schützen, kann S. aureus mittels des Zellwandproteins A das Fc-Stück von Antikörpern binden und so eine Opsonierung verhindern (Dosset et al., 1969). Ein Teil des entsprechenden Gens wird auch zur Bestimmung des spa-Typs herangezogen (Koreen et al., 2004). Alternativ kann S. aureus sich zur Immunevasion, unter Zuhilfenahme eines Komplexes aus Koagulase und vorhandenem Prothrombin, mit körpereigenem Fibrinogen einhüllen und sich so einer Erkennung durch Immunzellen entziehen (Boden & Flock, 1989). Bis auf das Staphyloxanthin kann S. argenteus prinzipiell die gleichen Virulenzfaktoren wie S. aureus besitzen. Die Art gilt nur als weniger virulent, da die meisten S. argenteus Isolate einzeln betrachtet weniger Virulenzfaktoren besitzen (Aung et al., 2017), aber auf die Gesamtpopulation bezogen steht S. argenteus S. aureus in nichts nach. So werden regelmäßig Isolate mit PVL (Aung et al., 2017; Eshaghi et al., 2021; Zhang et al., 2017) gefunden und auch das Superantigen TSST-1 wurde schon in S. argenteus nachgewiesen (Eshaghi et al., 2021). S. argenteus benutzt sogar die gleichen Strategien wie S. aureus, um chronische Infekte auszulösen. S. aureus (Von Eiff et al., 2000) und auch S. argenteus (Jiang et al., 2018) können als Subpopulation kleinere Kolonien ausbilden. Diese sog. "small colony variants" (engl.: "Kleinkolonienvarianten") tragen erheblich zur Persistenz, z. B. in Gelenksinfekten, bei (Jiang et al., 2018; Von Eiff et al., 2000). Neben einem verlangsamten Wachstum zeichnet die Varianten eine erhöhte Resistenz gegen Antibiotika aus (Jiang et al., 2018; Von Eiff et al., 2000). Für S. schweitzeri wurden die Virulenzfaktoren bisher nur in vitro analysiert, da bisher keine Krankheitsfälle bekannt sind und die Art quasi nur auf afrikanischen Wildtieren vorkommt (Grossmann et a., 2021). Theoretisch kann S. schweitzeri aber die gleichen Virulenzfaktoren wie S. aureus besitzen, da er im Gegensatz zu S. argenteus Staphyloxanthin bilden kann (Grossmann et al., 2021; Tong et al., 2015; Zhang et al., 2017).

Neben den oben bereits genannten Toxin-vermittelten Krankheitsbildern können S. aureus und S. argenteus eine Vielzahl anderer Krankheiten auslösen. Darunter fallen

Hauterkrankungen wie Furunkel und Karbunkel, Mastitis, Otitis media, Sinusitis, schwere Wund- und Weichteilinfektionen, Gelenks- und Protheseninfekte, Osteomyelitis, Pneumonie, Bakteriämie oder gar eine Sepsis (Baron, 1996; Chantratila et al., 2016; Diot et al., 2020, Kaden et al., 2018; Thaipadungpanit et al., 2015). S. argenteus löst nach jetzigem Stand eher Haut-, Wund- und Weichteilinfektionen aus (Diot et al., 2020, Kaden et al., 2018), aber kann auch tödliche Infekte hervorrufen (Thaipadungpanit et al., 2015). Der Fakt, dass S. argenteus bis 2015 noch zu S. aureus gehörte und dass er bis 2018 in vielen klinischen Routinelaboratorien als S. aureus fehlidentifziert wurde (Johansson et al., 2019; Kaden et al., 2018), verzerrt aber potentiell die Statistiken. Immer mehr rückblickende Studien, die vergangene schwere und tödliche Infekte durch S. aureus nochmals untersuchen, kommen zu dem Schluss, dass die Rate bei S. argenteus für eine Sepsis oder Bakteriämie mindestens genauso hoch ist wie bei S. aureus (Eshaghi et al., 2021; Thaipadungpanit et al., 2015). Für S. schweitzeri hingegen sind bislang keine Krankheitsfälle bekannt und nach heutigem Stand sind nur wenige Menschen überhaupt besiedelt. Ein paar der bekannten Patienten arbeiteten in Gabun häufig mit Wildfleisch und wurden wahrscheinlich so zum Träger des Bakteriums (Akoua-Koffi et al., 2022; Grossmann et al., 2021).

Neben den bereits beschriebenen Virulenzfaktoren macht vor allem die Resistenz gegen Antibiotika im Umgang mit S. aureus Sorgen. Bis heute stellen β-Lactamantibiotika die Standardtherapie bei Staphylokokken-assoziierten Erkrankungen dar (Weis et al., 2017). Bereits 1944 gab es erste Penicillin-resistente Isolate, die mit Hilfe des Enzyms β-Lactamase das Antibiotikum inaktivierten, indem sie den β-Lactamring spalteten (Austin et al., 1999; Shaffer 2013; Ventola 2015). Um der Resistenz entgegenzuwirken, entwickelte man die bestehenden β-Lactamantibiotika dadurch weiter, dass man den essentiellen β-Lactam-Ring sterisch abschirmte. Im Jahre 1959 wurde dann das erste β-Lactamase-feste Antibiotikum Methicillin eingeführt, woraufhin sich ab 1961 Methicillin-resistente Staphylococcus aureus (MRSA) erst in britischen Krankenhäusern und dann weltweit verbreiteten (Enright et al., 2002). Auch wenn das Methicillin mittlerweile durch Oxacillin und andere AB als Standardbehandlung abgelöst wurde, so werden die Isolate auch weiterhin als MRSA bezeichnet. Die Resistenz gegen Methicillin beruht auf der Expression eines veränderten Penicillinbindeproteins (PBP), dem PBP2a (Chambers, 2001). Dieses zeichnet sich durch eine sehr geringe Bindungsaffinität gegenüber β-Lactamantibiotika aus und verhindert die Blockierung des Enzyms durch den Wirkstoff. PBP2a wird durch das Gen mecA kodiert und findet in der Regel seinen Weg über SCCmec zu den Staphylokokken. Bei SCCmec handelt es sich um ein mobiles genetisches Element, das "staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec)". Die genomische Insel zeichnet sich prinzipiell durch die Rekombinasegene ccrA und ccrB, das Gen mecA und sog. "repeat-Sequenzen" aus. Diese Sequenzen bilden

jeweils die Enden und ermöglichen eine Integration in das Genom von *S. aureus* im *orfX*. Dort befindet sich normalerweise eine rRNA-Methyltransferase (Boundy et al., 2013). Neben diesen wesentlichen Elementen kann SCC*mec* noch viele weitere Gene enthalten, z. B. Resistenzgene gegen Aminoglykoside (Dissertation Kleinert, 2015) oder Schwermetalle, wie Cadmium, Kupfer, Arsen oder Zink (Li et al., 2011). Infolge der vielfältigen Resistenzgene, die eine SCC*mec* Kassette enthalten kann, sind MRSA häufig multiresistent und erschweren eine erfolgreiche Behandlung mit Antibiotika. SCC*mec* Kassetten kommen nicht nur bei *S. aureus* vor, sondern können bei Staphylokokken im Allgemeinen auftreten. Der Typstamm für *S. argenteus* MSHR1132 trägt z. B. eine SCC*mec* Kassette Typ IV (Schuster et al., 2017) und im schwedischen Uppsala wurde ein Isolat mit einer Typ II SCC*mec* Kassette gefunden (Kaden et al., 2018). Neben *S. argenteus* (Kaden et al., 2018; Schuster et al., 2017; Zhang et al., 2017) können auch *S. schweitzeri* (Zhang et al., 2017) und Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) SCCmec Kassetten tragen (Ibrahem et al., 2009; Fredheim et al., 2015).

# 1.10 Typisierung von bakteriellen Isolaten

Bei einer akuten Erkrankung eines Patienten oder einem Ausbruch auf der Station eines Krankenhauses ist der Faktor Zeit sehr entscheidend. Um schnell und spezifisch Gegenmaßnahmen einleiten zu können, ist es enorm wichtig den entsprechenden Erreger zu isolieren, identifizieren und charakterisieren. Im Folgenden wird S. aureus als Beispiel herangezogen, aber das zugrundeliegende Prinzip gilt für alle klinisch relevanten Bakterien. In der klassischen Mikrobiologie wurden Bakterien anhand ihrer Kolonie- und Stoffwechseleigenschaften beurteilt. Später kamen noch die Typisierung durch Phagen und durch die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) (Snell et al., 1986) hinzu. Mit der Einführung moderner molekularbiologischer Methoden konnten die Stämme immer genauer analysiert und typisiert werden. Anfang der 2000er Jahre kamen die bis heute noch üblichen Methoden zur Analyse von S. aureus Isolaten, wie die spa-Typisierung (Koreen et al., 2004) und MLST-Typisierung (Cookson et al., 2007) auf. Für die Bestimmung des spa-Typs wird bei S. aureus die sog. X-Region des Staphylococcus aureus Protein A (spa)-Gens vervielfältigt und sequenziert. Diese Region ist deshalb so geeignet, da sie aus bis zu 16 Repeats besteht, die je 24 bp lang sind. Die Auswertung der Sequenz erfolgt mit Hilfe eines Programms (Ridom Staph Type) und einer Datenbank (Ridom Spa Server). Der spa-Typ ergibt sich aus den verschiedenen Repeats und ihrer Reihenfolge (Koreen et al., 2004). Die MLST-Typisierung stützt sich auf die Analyse von sieben sog. House-Keeping Genen. Im Folgenden sind die sieben Genloci von S. aureus und deren Funktion in Klammern dargestellt: arcC (Carbamat-Kinase); aroE (Shikimat-Dehydrogenase); glpF (Glycerin-Kinase); gmk (Guanylat-Kinase); pta (Phosphat-Acetyltransferase); tpi (Triosephosphat-Isomerase); yqi (AcetylCoenzym A- Acetyltransferase). Nach der Sequenzierung der Gene werden die verschiedenen Varianten in die entsprechenden Allele eingeteilt. Aus den Ergebnissen für jedes Gen wird ein spezifisches Allel-Profil für jedes Isolat erstellt. Für eine schnellere Vergleichbarkeit wird jedem Profil ein Sequenz-Typ (ST) zugeordnet. Die ST werden dann wiederum in CC organisiert und fassen anhand eines Genotyps nahe verwandte ST zusammen (Enright et al., 2000; Maiden et al., 1998; Sullivan et al., 2005). Die CC zeigen also das gesamte Spektrum einer Art in ihren verschiedenen Ausprägungen. So war z. B. S. argenteus vor 2015 dem zwar weit entfernten, aber dennoch zu S. aureus gehörenden CC75 zugeteilt (Tong et al., 2015). In den 2010ern kam die Sequenzierung des gesamten Genoms (WGS, engl.: "whole genome sequencing") (Eyre et al., 2012; Prince et al., 2013) hinzu. Außerdem wurde die MLST zur core genome MLST (cgMLST) weiterentwickelt. Im Gegensatz zur MLST wird bei der cgMLST mit dem gesamten Genom gearbeitet und dieses nach der Sequenzierung anhand bestimmter Kriterien ausgewertet (Eyre et al., 2012; Maiden et al., 2014; Mellmann et al., 2011; Prince et al., 2013). Am Beispiel von S. aureus werden je nach Schema zwischen 700 und fast 2000 Genloci verglichen (Leopold et al., 2014). Darüber hinaus wird das WGS und die damit verbundenen Analysemöglichkeiten von manchen Experten als die einzige wirkliche Methode angesehen um S. argenteus zuverlässig von S. aureus in der klinischen Routinediagnostik unterscheiden zu können (Kaden et al., 2018; Johansson et al., 2019).

Heutzutage findet die Identifizierung der verschiedenen bakteriellen Isolate in der Regel nicht mehr per Bunter Reihe, sondern per Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) statt. Diese Methode stellt eine günstige, schnelle und durchsatzstarke Alternative in der modernen Routinediagnostik dar. Wie der Name bereits verrät, handelt es sich um ein Verfahren zur Massenbestimmung, bei dem kleine Moleküle durch eine Röhre fliegen. Hierfür werden die Proben auf einer planen Metallplatte, dem sog. Target, durch Kokristallisation in eine Matrix eingebunden. Die organischen Bestandteile der Matrix besitzen eine bessere Energieabsorption und sorgen für eine höhere Energetisierung der Probe. Dieses Target wird in eine Röhre hineingeschoben, an der ein elektrisches Feld anliegt und an deren gegenüberliegenden Seite sich ein Detektor befindet. Nach der Evakuierung der Luft aus der Röhre werden die Proben mit kurzen Laserimpulsen beschossen. Durch die hochenergetischen Laserimpulse verdampft die kristallisierte Matrix rapide und regt die Teilchen zum Flug an. Außerdem wird die Probe ionisiert, was einerseits die Fragmentierung verhindert und andererseits den Flug im angelegten elektrischen Feld nachvollziehbar macht. Wenn die Teilchen nach ihrem Flug durch die Röhre auf den Detektor treffen, kann ihre Masse bestimmt werden. Die Analyse beruht auf der massen- und ladungsspezifischen Flugbahn und -zeit (Bernardo et al., 2002;

Böhme et al., 2012; Wolters et al., 2011). Für ein MALDI-TOF-MS-Spektrum werden entweder ganze Zellen oder Zellextrakte vermessen (Edwards-Jones et al., 2000; Walker et al., 2002). Dabei können hauptsächlich ribosomale Peptide, kleine Toxine, sowie Stressproteine zum Flug angeregt und detektiert werden (Josten et al., 2013). Jedes Peptid wird in einem MALDI-TOF-MS-Spektrum durch ein Signal repräsentiert. Die Gesamtheit der verschiedenen Signale in einem MALDI-TOF-MS-Spektrum ermöglichen die Identifikation der Art und einiger häufiger klonalen Komplexe (Josten et al., 2013). Bei nahe verwandten Arten und Subtypen spielen dabei die Verschiebungen von Maxima in den Spektren eine entscheidende Rolle. Die Verschiebung ist so definiert, dass das ursprüngliche Maximum ausbleibt und durch ein anderes ersetzt wird. Die Verschiebung des Maximums beruht auf verschiedenen Allelen und den daraus folgenden veränderten Aminosäuresequenzen der Proteine, die sich in einer veränderten Masse widerspiegeln (Josten et al., 2013).

# 1.11 Die bioinformatische Berechnung der Massen von Proteinen in vivo

Bei der Datenbankrecherche zur Identifizierung der Signale im MALDI-TOF-MS-Spektrum gilt es zu beachten, dass die Massen der Peptide bioinformatisch aus der Nukleotidseguenz berechnet sind. Die seltenen Startcodons TTG und CTG werden dabei oft als Leucin (L) oder Valin (V) übersetzt. Im Gegensatz dazu initiieren Prokaryoten die Translation grundsätzlich immer mit einem Formylmethionin (fM). Der zusätzlich vorhandene Formylrest wird nicht in der Rechnung berücksichtigt, ist aber immer bei der Proteinbiosynthese vorhanden. Diese Divergenz zwischen realem Protein und Proteinsequenz in der Datenbank muss immer beachtet werden und die Masse des Proteins entsprechend angepasst werden. Weiter muss berücksichtigt werden, dass der Formylrest oder gar das gesamte Formylmethionin nach der Proteinbiosynthese oft abgespalten wird. Der Formylrest wird normalerweise während der Proteinsynthese durch die Polypeptid-Deformylase entfernt (Bingel-Erlenmeier et al., 2008). Manche fertigen Proteine weisen aber dennoch zu Beginn einen Formylrest auf (Bingel-Erlenmeier et al., 2008), auch dies gilt es zu berücksichtigen. Bei den meisten Proteinen wird zusätzlich zum Formylrest noch das erste Methionin (M) von der Metalloprotease Methionin-Aminopeptidase abgeschnitten. Ob dies geschieht, hängt von der Seitenkette der zweiten AS im Peptid ab. Wenn diese eine große Seitenkette besitzt, wird das M nicht abgetrennt (Ben-Bassat et al., 1987; Hirel et al., 1989). Bei welcher AS an zweiter Position im Protein das Nterminale Methionin abgeschnitten wird und bei welchen AS es am Peptid verbleibt ist, in Tabelle 2 dargestellt (aus Schuster 2015).

Tabelle 2: Darstellung des Einflusses der zweiten Aminosäuren (AS) im Protein auf die Abtrennung des N-terminalen Methionins (M) durch die Metalloprotease Methionin-Aminopeptidase während der Proteinbiosynthese nach Ben-Bassat et al. (1987) und Hirel et al. (1989). Die AS sind im Einbuchstabencode dargestellt.

| AS an 2. Position | N-terminales M wird entfernt |
|-------------------|------------------------------|
| Α                 | Ja                           |
| G                 | Ja                           |
| С                 | Ja                           |
| Р                 | Ja                           |
| S                 | Ja                           |
| Т                 | Ja                           |
| V                 | Ja                           |
| R                 | Nein                         |
| N                 | Nein                         |
| D                 | Nein                         |
| Е                 | Nein                         |
| Н                 | Nein                         |
| I                 | Nein                         |
| L                 | Nein                         |
| K                 | Nein                         |
| M                 | Nein                         |
| F                 | Nein                         |
| Р                 | Nein                         |
| Υ                 | Nein                         |
| W                 | Nein                         |

# 1.12 Das Isolat Staphylococcus spec. BN75

Bei dem Isolat BN75 handelt es sich um einen Stamm, der aus einem Projekt im zentralafrikanischen Regenwald hervorging, welches zum Ziel hatte die Bakterien auf wildlebenden Affen näher zu untersuchen. Dabei ging es vor allem um die Frage, ob die bakterielle Flora von wildlebenden Menschenaffen aus neuen, noch unbekannten Arten besteht oder ob sie, wie zumeist bei Zootieren, auch mit Menschen assoziiert ist (Schuster et al., 2017). Im Zuge dieses Projekts wurde Isolat BN75, damals noch *S. aureus* Stamm 75, von einem westlichen Flachlandgorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) isoliert (Schuster et al., 2017). Schuster (2013) beschäftigte sich anschließend mit der Charakterisierung des Stammes und der Frage, ob es sich um einen *S. aureus* handelt oder nicht. In Abbildung 9 ist zu sehen, dass das Isolat BN75 graue bis weiße Kolonien bildete, statt der für einen *S. aureus* erwarteten gelben Kolonien.

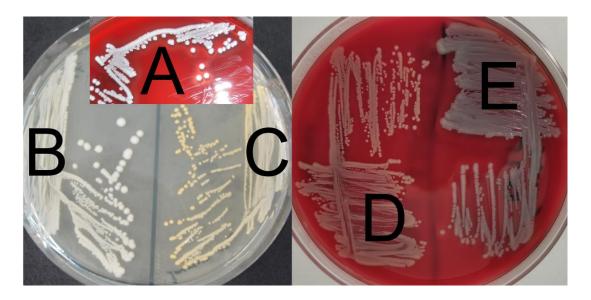


Abbildung 9: A/E: Staphylococcus argenteus BN75 (BN75) auf Columbia Blutagar nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C. B: BN75 auf Lysogeny Broth-Agar (LB) nach 48 Stunden Bebrütung bei 45 °C, C: Staphylococcus aureus Cowan I auf LB-Agar nach 48 Stunden Bebrütung bei 45 °C. D: S. aureus Cowan I auf Columbia Blutagar nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C. Abbildung modifiziert nach Schuster (2013).

Neben der Farbabweichung der Kolonien fiel das Isolat BN75 noch auf, da es mit den üblichen Primern für *S. aureus* weder spa- noch MLST-typisierbar war. Außerdem zeigte es außergewöhnliche Abweichungen im MALDI-TOF-MS-Spektrum. Nach der Erstellung neuer Primer am Vorbild von, damals noch *S. aureus* MSHR1132, gelang die vollständige Typisierung des Isolates. Der Stamm BN75 konnte dem spa-Typ t7462 und MSLT-Typ ST2198, CC75, zugeordnet werden. In den durchgeführten Antibiogrammen zeigte der Stamm keinerlei Resistenz gegen Antibiotika. Die biochemische Untersuchung im API®Staph-Test und die Sequenzierung der 16S-rRNA ergaben die Spezies *S. aureus*. Nach der Postulierung von *S. argenteus* im Jahre 2015 (Tong et al., 2015) kam die Frage auf, ob es sich bei Isolat BN75 tatsächlich um einen *S. aureus* handelt oder ob dieser, wie *S. argenteus* MSHR1132 auch der relativ neuen Spezies *S. argenteus* zuzuordnen sei.

#### 1.13 Ziel dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit besteht aus zwei Komponenten. Der erste Teil dieser Arbeit war im interdisziplinären Verbundprojekt HyReKA verortet. Dort sollte sie mit Laborwerten die Grundlage liefern, um die im Projekt gefundenen Antibiotikakonzentrationen im Abwasser besser bewerten zu können. Hierfür sollten MSCs von verschiedenen antimikrobiellen Substanzen ermittelt werden, denn zum Zeitpunkt der Arbeit gab es nur wenige Daten zu MSCs und diese waren nicht mit Umweltbakterien ermittelt worden. Dementsprechend galt es in dieser Arbeit Kriterien für ein passendes Testsystem zu erarbeitet. Anschließend sollte ein entsprechendes System erstellt und etabliert werden. Außerdem musste eine zu den Stämmen passende Methode zur Auswertung der MSC-Experimente gefunden werden.

Neben der Ermittlung der MSCs von AB sollten auch die Auswirkungen von Schwermetallen untersucht werden.

Der zweite Teil beschäftigte sich mit dem Isolat BN75, das vor dieser Arbeit der Art *S. aureus* zugeordnet wurde. Ein Ziel dieser Arbeit war es mittels WGS zu klären, ob das Isolat BN75 doch der Spezies *S. argenteus* zugeordnet werden muss und anhand einer Genomanalyse zu ermitteln, wie nahe verwandt es mit dem Typstamm *S. argenteus* MSHR1132 ist.

Ein weiteres Ziel war, es eine Möglichkeit zur schnellen Diskriminierung der im Jahr 2016 relativ neuen Art *S. argenteus* zu nah verwandten Spezies wie *S. aureus* und *S. schweitzeri* zu finden. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der klinischen Diagnostik, da hier eine schnellstmögliche Einordnung eines Isolates entscheidend sein kann. Hierfür wurde auf die Speziesidentifikation per MALDI-TOF-MS gesetzt, weil diese mittlerweile zum Standard in den Routinelaboren gehört. Deshalb wurde nach spezifischen Biomarkern für *S. argenteus* und *S. schweitzeri* gesucht, welche sich möglichst von denen für *S. aureus* abheben.

#### 2. Material und Methoden

Sofern nicht abweichend angegeben wurden alle verwendeten Lösungen sterilfiltriert, Medien autoklaviert und Glasgefäße sterilisiert.

# 2.1 Chemikalien, Antibiotika und Enzyme

α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure Sigma Aldrich, Steinheim Acetonitril Sigma Aldrich, Steinheim

Agar Becton & Dickinson, Heidelberg
Agarose Bio-Budget Technologies, Krefeld

Ameisensäure Sigma Aldrich, Steinheim Ampicillin Sigma Aldrich, Steinheim

Ampuwa® Fresenius Kabi, Bad Homburg
Bacto<sup>TM</sup>Trypton Becton & Dickinson, Heidelberg

Benzalkoniumchlorid VWR International GmbH, Darmstadt

Betain Sigma Aldrich, Steinheim Blei(II)-Acetat [Pb(CH<sub>3</sub>OO)] Sigma Aldrich, Steinheim

Bleicitrat Trihydrat [Pb<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>x3H<sub>2</sub>O] Serva Feinbiochemica GmbH&Co, Heidelberg

Cadmiumsulfat-Heptahydrat Sigma Aldrich, Steinheim

 $(3CdSO_4x8H_2O)$ 

Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>)

Merck KgaA, Darmstadt

Chloramphenicol

Merck KgaA, Darmstadt

Clindamycin

Sigma Aldrich, Steinheim

Sigma Aldrich, Steinheim

Dimethylsulfoxid (DMSO) Finnzymes, Vertrieb über New England Biolabs,

Ipswich(USA)

Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) Merck KgaA, Darmstadt

DNA Standards Gene Ruler<sup>™</sup> Thermo Scientific, Waltham (USA)
dNTPs Thermo Scientific, Waltham (USA)t

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) Sigma Aldrich, Steinheim Erythromycin Sigma Aldrich, Steinheim Merck KgaA, Darmstadt

FastDigest® Restriktionsenzyme Thermo Scientific, Waltham (USA)
FastDigest® Puffer Thermo Scientific, Waltham (USA)

Fixierlösung mit 4% Paraformaldehyd Biolegend, San Diego (USA)

Fosfomycin Thermo Scientific, Waltham (USA)

Glukose Merck KgaA, Darmstadt

Glycerin Merck KgaA, Darmstadt Guanidinhydrochlorid (CH₅N₃HCl) Merck KgaA, Darmstadt

Hefeextrakt Oxoid, Wesel Hirn-Herz-Infusions-Bouillon (BHI) Oxoid, Wesel

Hydrolysiertes Casein Carl Roth, Karlsruhe

Imidazol Sigma Aldrich, Steinheim

Isopropyl-β-D- Thermo Scientific, Waltham (USA)

Thiogalactopyranosid (IPTG)

Kaliumacetat (CH<sub>3</sub>COOK) Merck KgaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCI) Merck KgaA, Darmstadt
Kanamycin Sigma Aldrich, Steinheim
Kupfer(II)sulfat [Cu(II)SO<sub>4</sub>] Sigma Aldrich, Steinheim
Levofloxacin Sigma Aldrich, Steinheim
Magnesiumsulfat-Heptahydrat Sigma Aldrich, Steinheim

 $(MgSO_4x7H_2O)$ 

Magnesiumsulfat-Hexahydrat Sigma Aldrich, Steinheim

 $(MgSO_4x6H_2O)$ 

Mangan(II)-Chlorid (MnCl<sub>2</sub>) Merck KgaA, Darmstadt

Meropenem

MES (2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure) Sigma Aldrich, Steinheim MOPS (3-(N-Morpholino)- Sigma Aldrich, Steinheim

Propansulfonsäure

Müller-Hinton (MH)-Medium Oxoid, Wesel

 $\label{eq:local_norm} \mbox{Natriumchlorid (NaCl)} \qquad \mbox{Merck KgaA, Darmstadt} \\ \mbox{Natriumdihydrogenphosphat (NaH$_2PO$_4)} \qquad \mbox{Merck KgaA, Darmstadt} \\$ 

Oligonukleotide Microsynth, Balgach (Schweiz)
6 x Orange DNA Loading Dye Thermo Scientific, Waltham (USA)

Penicillin Sigma Aldrich, Steinheim

Phusion® Polymerase Finnzymes, Vertrieb über New England Biolabs,

Ipswich(USA)

Piperacillin Sigma Aldrich, Steinheim Rindfleischextrakt Sigma Aldrich, Steinheim SDS (Natriumdodecylsulfat) Sigma Aldrich, Steinheim Stärke Sigma Aldrich, Steinheim Streptomycin Sigma Aldrich, Steinheim

Sulfadiazin Cayman Chemical Company, Ann Arbor (USA)

Sulfamethoxazol Biomol GmbH, Hamburg

T4-DNA-Ligase Thermo Scientific, Waltham (USA)

Roche, Basel (Schweiz)

Tetracyclin Sigma Aldrich, Steinheim
Trehalose Sigma Aldrich, Steinheim
TRIS (2-Amino-2-(hydroxymethyl)- Merck KgaA, Darmstadt

propan-1,3-diol)

Zinksulfat-Heptahydrat (ZnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O) Sigma Aldrich, Steinheim

# 2.2 Materialien, Kits und Geräte

Agarosegelelektrophoresekammer Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Analysewaage Cp2P Sartorius, Göttingen

Brutraum mit Schüttelinkubator Heraeus, Langenselbold Brutschrank B6 Heraeus, Langenselbold

Chromagar ESBL-Platten Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld

Deckgläser Zeiss High Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH,

Performance 0,17 mm Oberkochen

DensiCHEK plus BioMérieux, Marcy l'Etoile (Frankeich)

Eismaschine, UBE 3-10 Ziegra, Isernhagen

Electrophoresis Powersupply Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Elektroporationsküvette #71-2020, Peqlab Biotechnologie, Erlangen

25 x 2 mm Elektrodenspalt

Epicentre© Masterpure™ Complete Lucigen, Middleton (USA)

DNA and RNA Purification Kit

Durchflusszytometer LSRFortessa<sup>™</sup> BD Life Sciences, Heidelberg
Durchflusszytometer CytoflexS Beckman Coulter GmbH, Krefeld
FACSflow BD Life Sciences, Heidelberg

Falcon-Reaktionsgefäße Greiner, Frickenhausen

FastGene Blue/Green LED Nippon Genetics Europe GmbH, Düren

Transilluminator XL

Filtereinheit mit MilliPak Millipore, Schwalbach

0,22 / 0,45 µm Filter

FlowClean Cleaning Agent Beckman Coulter GmbH, Krefeld

Gefrierschrank HFU (-70° C) Heraeus, Langenselbold

GeneJet<sup>™</sup> Gel Extraction Kit

GeneJet<sup>™</sup> PCR Purification Kit

GeneJet<sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit

GenePulser<sup>™</sup> PulseController<sup>™</sup>

Bio-Rad Laboratories, München

GeneRuler<sup>™</sup> 1kb DNA Ladder Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Heizmagnetrührer Janke & Kunkel Ika Labortechnik, Staufen

Inkubationsschüttler Infors HT Ecotron Infors, Bottmingen (Schweiz)

Kühlzentrifuge Sigma 2k15 B. Braun Biotech International, Melsungen Kühlzentrifuge Sigma 1-14k Sigma Laborzentrifugen, Osterode am harz

MALDI-TOF Massenspektrometer Bruker Bruker Daltonics, Bremen

**Biflex** 

Membranfilter Millipore, Schwalbach

Micronaut-S MDR MRGN Screening 3 Merlin Diagnistika GmbH, Bornheim-Hersel

Platten

Micronaut-S MDR MRGN Screening 3 Merlin Diagnistika GmbH, Bornheim-Hersel

System

Midori Green Direct Nippon Genetics Europe GmbH, Düren

Mikroreaktionsgefäße Eppendorf, Hamburg

Mikroskop Axio Observer Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH,

Oberkochen

Mikroskop-Objektträger VWR International GmbH, Darmstadt

MilliQ-Anlage Millipore, Schwalbach

MiniElute PCR Purification Kit Quiagen, Hilden

MiSeq Reagent KitV3 Illumina©, San Diego (USA)
MiSeq Illumina©, San Diego (USA)

Nalgene® Kryoröhrchen

Thermo Fisher Scientific, Dreieich

NanoDrop™ ND-1000

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

Nextera XT DNA Library Prep Kit Illumina©, San Diego (USA) Nextera XT Index Kit Illumina©, San Diego (USA)

PageRuler Unstained Protein Ladder Thermo Fisher Scientific, Dreieich

PCR express Thermal Cycler Hybaid, ThermoLifeScience, Engelsbach

pH-Meter pH522 Wissenschaftlich-Technische-

Werkstätten(WTW), Weilheim

Photometer UviLine 9400 SI Analytics, Mainz

Pipetten Kinesis vormals Abimed, Langenfeld

Gilson, Villiers le Bel (Frankreich)

Süd-Laborbedarf, Gauting

Platten-Reader Infinite©200PRO Tecan, Männerdorf (Schweiz)

Polyesterfilme zum Versiegeln von VWR International GmbH, Darmstadt

Mikrodilutionsplatten

Polypropylensäule (2 ml) Quiagen, Hilden PrestoSpin D Bug Molzym, Bremen

Probenröhre 75x12 mm, 5 ml

Qubit™ Flex Fluorometers

Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit

Schüttelwasserbad SW22

Sorvall® Dicovery M120SE

Sarstedt AG & CO. KG, Nümbrecht

Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Julabo Labortechnik, Seelbach

Thermo Scientific, Waltham (USA)

Sorvall® Evolution RC Heraeus, Langenselbold Sorvall® Multifuge 1S-R Heraeus, Langenselbold

Sterilbank Biowizard, Kojair UV-Illuminator Chroma 43 (302 nm) Vetter, Wiesloch

UV-Imager Image Master VDS Amersham Bioscience, Freiburg

Vitek MS Massenspektrometer BioMérieux, Marcy l'Etoile (Frankeich)

Vitek®2 XL (Antibiogramme) BioMérieux, Marcy l'Etoile (Frankeich)

Vitek®2 AST-P632-Karte BioMérieux, Marcy l'Etoile (Frankeich)

Vortexer Ika Labortechnik, Staufen

# 2.3 Stämme und Anzuchtbedingungen

Tabelle 3:Übersicht der in dieser Arbeit erstellten und verwendeten Stämme. Spec steht für das Antibiotikum Spectinomycin; Strep für Streptomycin; SDZ für Sulfadiazin und Tet für Tetracyclin. Bei den Nährmedien kann es sich, sofern nicht weiter spezifiziert, um feste oder flüssige Varianten handeln. Dabei steht LB für Lysogeny-Broth und MH für Müller-Hinton. LA-MRSA steht für Livestock-assoziierten Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*,

| Stamm              | Nährmedien             | Temperatur | Besonderheiten             | Referenz                  |
|--------------------|------------------------|------------|----------------------------|---------------------------|
| S. aureus<br>CC398 | Columbia               | 37 °C      | LA-MRSA (aus Schwein)      | Schuster et al.           |
| S. argenteus       | Blutagar<br>Columbia   | 07.00      | Isoliert von einem Gorilla | (2017)<br>Schuster et al. |
| BN75               | Blutagar               | 37 °C      | gorilla gorilla            | (2017)                    |
| A. baylyi          | LB oder MH             | 30 /37 °C  | natürliche Kompetenz       | Juni et al.(1969)         |
| BD413              |                        |            |                            |                           |
| A. baylyi          | LB oder MH             | 20 /27 00  | natürliche Kompetenz       | Diaga Ambait              |
| BD413 GFP          | mit Spec               | 30 /37 °C  | GFP im Genom               | Diese Arbeit              |
| A boydyi           | 150 mg/l<br>LB oder MH |            |                            |                           |
| A. baylyi<br>BD413 | mit Spec               | 30 /37 °C  | natürliche Kompetenz       | Diese Arbeit              |
| mCherry            | 150 mg/l               | 00707      | mCherry im Genom           | Blood / Wbolt             |
| A. baylyi          | ESBL-                  | 30 /37 °C  | natürliche Kompetenz       | Diese Arbeit              |

| BD413 GFP     | Platten      |           | GFP im Genom                   |               |
|---------------|--------------|-----------|--------------------------------|---------------|
| 652           |              |           | spontane Mutante               |               |
| A. baylyi     | ESBL-        |           | natürliche Kompetenz           |               |
| BD413         |              | 30 /37 °C | mCherry im Genom               | Diese Arbeit  |
| mCherry 652   | Platten      |           | spontane Mutante               |               |
| A. baylyi     | ESBL-        |           | natürliche Kompetenz           |               |
| BD413         | Platten      | 30 /37 °C | mCherry im Genom               | Diese Arbeit  |
| mCherry 777   | 1 latteri    |           | spontane Mutante               |               |
| A. baylyi     | ESBL-        |           | natürliche Kompetenz           |               |
| BD413 GFP     | Platten      | 30 /37 °C | GFP im Genom                   | Diese Arbeit  |
| 807           | 1 latteri    |           | spontane Mutante               |               |
| A. baylyi     | ESBL-        |           | natürliche Kompetenz           |               |
| BD413         | Platten      | 30 /37 °C | mCherry im Genom               | Diese Arbeit  |
| mCherry 807   | 1 lattori    |           | spontane Mutante               |               |
| K.            | ESBL-        |           | Isoliert aus Abwasser          | Müller et al. |
| pneumoniae    | Platten      | 37 °C     | Carbapenem-resistent           | (2018)        |
| <i>CU</i> 652 |              |           | ·                              | ( /           |
| A. baumannii  | ESBL-        |           | Isoliert aus Abwasser          | Müller et al. |
| CU777         | Platten      | 37 °C     | intrinsische Oxa <sub>51</sub> | (2018)        |
|               |              |           | Carbapenemase                  | ,             |
| K.            | ESBL-        |           | Isoliert aus Abwasser          | Müller et al. |
| pneumoniae    | Platten      | 37 °C     | Carbapenem-resistent           | (2018)        |
| <i>CU</i> 807 |              |           | •                              | ` ,           |
|               | LB oder MH   |           |                                |               |
| A. baylyi     | mit Strep 20 |           | natürliche Kompetenz           |               |
| BD413 GFP     | mg/I; SDZ    | 30 /37 °C | GFP im Genom                   | Diese Arbeit  |
| pHHV216       | 100 mg/l;    |           | pHHV216                        |               |
|               | Tet 5 mg/l   |           |                                |               |
| A. baylyi     | LB oder MH   |           |                                |               |
| BD413         | mit Strep 20 |           | natürliche Kompetenz           |               |
| mCherry       | mg/I; SDZ    | 30 /37 °C | mCherry im Genom               | Diese Arbeit  |
| pHHV216       | 100 mg/l;    |           | pHHV216                        |               |
| F 2.0         | Tet 5 mg/l   |           |                                |               |

# 2.4 Verwendete Plasmide

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Plasmide

| Plasmid | vermittelte          | Eigenschaften         | Referenz              |
|---------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
|         | Antibiotikaresistenz |                       |                       |
| pEPSA5  | Ampicillin ,         | S. aureus – E. coli   | Forsyth et al. (2002) |
|         | Chloramphenicol      | Shuttle-Vektor, durch |                       |
|         |                      | Xylose induzierbar    |                       |
| pHHV216 | Sulfonamide,         | Niedriger GC-Gehalt,  | Heuer et al. (2009)   |
|         | Tetracyclin,         | natürliches           |                       |
|         | Streptomycin         | Resistenzplasmid,     |                       |
|         | Chloramphenicol      |                       |                       |

#### 2.4.1 Der S. aureus / E. coli Shuttle-Vektor pEPSA5

Das 6858 bp umfassende Shuttle-Plasmid pEPSA5 nach Forsyth et al. (2002) wird in der Regel für den Knockdown eines Gens via Antisense-Ribonukleinsäure (RNA) verwendet. Der Vektor besitzt sowohl den ORI pC194 vom Plasmid pRN5548 (Novick 1991) für die Replikation in *S. aureus*, als auch den ORI p15a (Diedrich et al., 1994), für die Vervielfältigung in *E. coli*. In *S. aureus* erfolgte die Selektion mittels Chloramphenicol (34 mg/l). In *E. coli* hingegen erfolgte die Selektion mit Hilfe von Ampicillin (40 mg/l). Das Plasmid pEPSA5 verfügt neben seiner MCS über eine Vielzahl von anderen Enzymschnittstellen, was es sehr flexibel und individuell anpassbar macht. In diesem Plasmid wird der verwendete Bakteriophagenpromotor pT5x durch seinen Repressor *xylR* reguliert. Der Repressor wiederum kann seinerseits durch Bildung eines Komplexes mit Xylose inaktiviert werden, sodass die Gene hinter dem Promotor transkribiert werden können. Für diese Arbeit wurde lediglich der Promotor pT5x zur Erstellung einer neuen Genkassette verwendet. Die Vektorkarte für pEPSA5 ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Nukleotidseguenz befindet sich im Anhang 9.1.

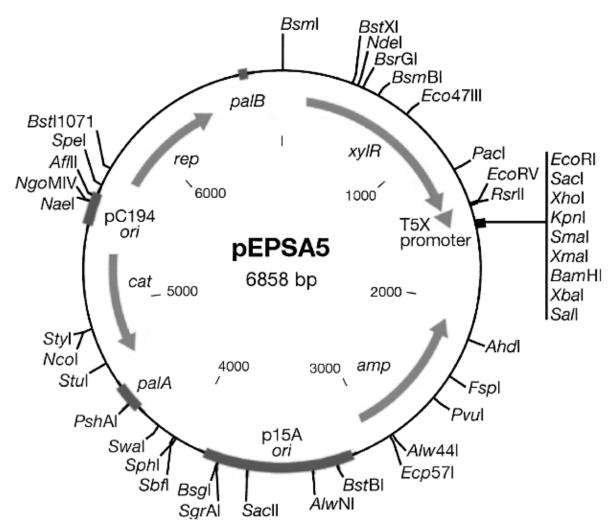


Abbildung 10: Vektorkarte des Plasmids pEPSA5. Abbildung modifiziert nach Forsyth et al., 2002.

#### 2.4.2 Das natürliche Resistenzplasmid pHHV216

Der 58274 bp große Vektor wurde im Rahmen einer Studie von Heuer et al. (2009) beschrieben. Auf der Suche nach Resistenzen gegen Sulfonamide wurde pHHV216 mit Hilfe von *E. coli* aus Gülle isoliert. Das Plasmid zeichnet sich durch seinen niedrigen GC-Gehalt und die vier Resistenzgene *sul2*, *str*AB, *tetH*, *florR* gegen Sulfonamide, Streptomycin, Tetracyclin, und Chloramphenicol aus. Es vervielfältigt sich in der Zelle aufgrund seiner enormen Größe durch die Rolling-Circle-Replikation (Heuer et al., 2009; Ali et al., 2014). Und trägt laut Heuer et al. (2009) zur Verbreitung von Resistenzen bei Bodenbakterien bei. Dabei handelt es sich um ein konjugatives Plasmid, welches in der Lage ist, sich mittels Konjugation von Zelle zu Zelle zu verbreiten. Hierfür sind die Transfergene (*tra*A etc.) und die Mobilitätsgene (*mob*C etc.) verantwortlich. Die entsprechenden Gene sitzen mit vielen weiteren in einem sog. Replikationsmodul. Dieses umfasst ca. 30 kb und enthält außerdem noch Gene für u. a. die Replikation der DNA und den ORI (Heuer et al., 2009). Obwohl das Plasmid nach der Methode von Heuer et al. (2007) mit Hilfe von *E. coli* isoliert wurde, gehört pHHV216 zu den Plasmiden mit enger Wirtsspezifität (Heuer et al., 2009). Diese Plasmide

können, im Gegensatz zu Plasmiden mit breiter Wirtsspezifität, nur in einem kleinen Spektrum von nahe verwandten Arten stabil propagiert werden (Tokuda et al., 2020). Das Plasmid pHHV216 kann am besten in den ursprünglichen *Acinetobacter* Spezies und in dem speziellen Wirt *E. coli* J53 persistieren (Heuer et al., 2009). In *A. baylyi* BD413 ist das Plasmid besonders stabil und blieb auch ohne Selektionsdruck über mehr als 100 Generationen hinweg unverändert erhalten (Jechalke et al., 2013). Die Vektorkarte für pHHV216 ist in Abbildung 11 dargestellt. Die Nukleotidsequenz ist im Anhang 9.2 zu finden.

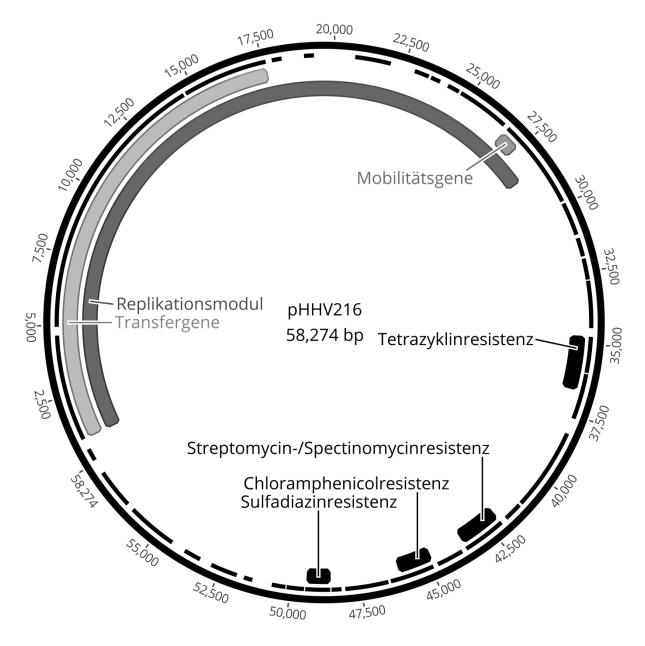


Abbildung 11: Vektorkarte des Plasmids pHHV216. Aufgrund der Größe von 58274 Basenpaaren (bp) und der Komplexität des Vektors wird hier nur eine stark reduzierte Darstellung gezeigt. Die vier Resistenzgene für Sulfadiazin, Chloramphenicol, Streptomycin/Spectinomycin und Tetracyclin sind in schwarz dargestellt. Das Replikationsmodul (dunkelgrau) umfasst neben den Genen für die Replikation noch die Gene für Transfer und Mobilisierung des Plasmids. Die Nukleotidsequenz befindet sich im Anhang 9.2. Abbildung modifiziert nach Heuer et al., 2009. Dort ist auch eine ausführliche Beschreibung zu finden.

# 2.5 Nährmedien

Eine Übersicht der verwendeten Nährmedien ist Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Nährmedien

| Nährmedium                                 | Zusammensetzung                                     |
|--|---|
| BHI (Hirn-Herz-Infusions-Bouillon )-Medium | <ul> <li>37 g dehydriertes BHI-Pulver</li> </ul>    |
|  | <ul> <li>ad 1 L A. dest.: pH 7,4</li> </ul>         |
| Columbia Blutagar                          | Fertignährboden, pH 7,3 (Becton &                   |
|  | Dickinson, Heidelberg)                              |
|  |   |
| LB (Lysogeny Broth) -Agar                  | - 10 g NaCl   |
|  | − 10 g Bacto <sup>™</sup> Trypton                   |
|  | <ul><li>5 g Hefeextrakt</li></ul>                   |
|  | – 18 g Agar   |
|  | <ul><li>ad 1 I A. dest.: pH 7,5</li></ul>           |
| LB-Medium                                  | - 10 g NaCl   |
|  | <ul> <li>− 10 g Bacto<sup>™</sup>Trypton</li> </ul> |
|  | <ul> <li>5 g Hefeextrakt</li> </ul>                 |
|  | <ul><li>ad 1 I A. dest.: pH 7,5</li></ul>           |
| MH-Agar                                    | <ul> <li>21 g dehydriertes MH-Pulver</li> </ul>     |
|  | – 18 g Agar   |
|  | − ad 1 I A. dest.: pH 7.                            |
| MH-Medium                                  | <ul> <li>21 g dehydriertes MH-Pulver</li> </ul>     |
|  | − ad 1 I A. dest.: pH 7.                            |
| TSA (Tryptic Soy Agar)                     | <ul> <li>15 g pankreatisch abgebautes</li> </ul>    |
|  | Casein  |
|  | <ul> <li>5 g enzymatisch abgebautes</li> </ul>      |
|  | Sojaprotein   |
|  | – 5 g NaCl  |
|  | – 18 g Agar   |
|  | <ul><li>ad 1 I A. dest.: pH 7,3</li></ul>           |
| TSB (Tryptic Soy Broth) -Medium            | <ul> <li>15 g pankreatisch abgebautes</li> </ul>    |
|  | Casein  |
|  | <ul> <li>5 g enzymatisch abgebautes</li> </ul>      |
|  | Sojaprotein   |

| – 5 g NaCl                                |
|---|
| <ul><li>ad 1 I A. dest.: pH 7,3</li></ul> |
| Fertignährboden (Mast Diagnostica         |
| GmbH, Reinfeld)                           |

# 2.6 Lösungen

Eine Übersicht der in dieser Arbeit benutzen Lösungen ist in Tabelle 6 zu sehen.

Tabelle 6: Verwendete Lösungen. DMSO steht für Dimethylsulfoxid.

| Lösung                                | Zusammensetzung              |
|---------------------------------------|------------------------------|
| Ampicillin [100 mg/ml]                | 100 mg/ml gelöst in A. dest. |
| Chloramphenicol [100 mg/ml]           | 100 mg/ml gelöst in Ethanol  |
| Natriumchloridlösung (NaCl-Lösung)    | 0,9 % (W/V) NaCl in A. dest. |
| (autoklaviert)                        |                              |
| Sulfadiazin                           | 50 mg/ml gelöst in DMSO      |
| Tetracyclin                           | 5 mg/ml gelöst in Ethanol    |
| Streptomycin                          | 50 mg/ml gelöst in A. dest   |
| Spectinomycin                         | 50 mg/ml gelöst in A. dest   |
| Piperacillin                          | 50 mg/ml gelöst in A. dest   |
| Fosfomycin                            | 50 mg/ml gelöst in A. dest   |
| Levofloxacin                          | 50 mg/ml gelöst in Methanol  |
| Meropenem                             | 50 mg/ml gelöst in DMSO      |
| Clindamycin                           | 50 mg/ml gelöst in A. dest   |
| Benzalkoniumchlorid                   | 100 mg/ml gelöst in A. dest  |
| Erythromycin                          | 20 mg/ml gelöst in Ethanol   |
| Sulfamethoxazol                       | 50 mg/ml gelöst in DMSO      |
| 3CdSO <sub>4</sub> x8H <sub>2</sub> O | 100 mg/ml gelöst in A. dest  |
| Cu(II)SO <sub>4</sub>                 | 100 mg/ml gelöst in A. dest  |
| ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O  | 100 mg/ml gelöst in A. dest  |
| Pb(CH₃OO)]                            | 100 mg/ml gelöst in A. dest  |
| $Pb_3(C_6H_5O_7)_2x3H_2O$             | 900 mg/ml gelöst in A. dest  |

# 2.7 Sterilisationsprozess

Glas- und Metallwaren wurden für 4 h bei 200° C im Sterilisator erhitzt. Pipettenspitzen, Nährmedien und alle anderen Gegenstände, die nicht so temperaturbeständig sind, wurden für 20 min bei 121° C und 1,2 bar autoklaviert.

# 2.8 Messung der DNA-Konzentration

Der Gehalt an DNA in einer Probe wurde mit Hilfe des NanoDrop™ ND-1000, NanoDrop™ One<sup>C</sup> oder Qubit™ Flex Fluorometers bestimmt. Nukleinsäuren absorbieren aufgrund ihrer aromatischen Ringstrukturen ultraviolette Strahlung der Wellenlänge λ=260 nm. Da diese Absorption direkt proportional zur vorhandenen Menge an Nukleinsäuren ist, kann so die vorhandene Konzentration ermittelt werden. Die Reinheit der Probe konnte über den Quotienten von 260 nm gegen 280 nm bestimmt werden.

# 2.9 Herstellung von genomischer DNA für die PCR

Für die Präparation von genomischer DNA wurde der angezeigte Stamm auf dem entsprechenden Agar ausgestrichen und über Nacht (ÜN) bei 37° C bebrütet. Am darauffolgenden Tag wurde eine Kolonie von der Platte gepickt und in 100  $\mu$ l Aqua ad iniectabilia (A. i.) resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden 10 min bei 95° C im Wasserbad erhitzt und anschließend 5 min bei 15000 g abzentrifugiert. 50  $\mu$ l des Überstandes wurden in ein frisches 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt.

# 2.10 Polymerasekettenreaktion(PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient der exponentiellen Vervielfältigung von kurzen, spezifischen DNA-Abschnitten. Dies erfolgt in einem Thermocycler mit Hilfe von Primern, dNTPs und DNA-Polymerase. Da die vervielfältigten DNA-Fragmente nach dem Aufreinigen teilweise zum Sequenzieren geschickt werden sollten, wurde die Phusion<sup>TM</sup>High-Fidelity DNA Polymerase verwendet. Diese Polymerase ist thermostabil und verfügt über eine Korrekturlesefunktion, weshalb sie eventuelle Fehlpaarungen während der PCR verringert und exakte Kopien der DNA-Fragmente anfertigen kann. Der Prozess kann in fünf Schritte unterteilt werden, wobei die Schritte zwei bis vier 30 Zyklen durchlaufen.

1. Initiale Denaturierung: Das Reaktionsgemisch aus DNA, Primern, dNTPs, Puffer und Polymerase wurde zunächst 10 min auf 98° C erhitzt, um die DNA zu denaturieren und sicher zu stellen, dass alle Wasserstoffbrücken zwischen den Basen aufgelöst sind. Dadurch wurde auch das eventuelle vorzeitige Binden der Primer an die DNA verhindert.

- 2. Denaturierung: Durch das Erhitzen auf 98° C wurden die Wasserstoffbrückenbindungen aus den vorausgegangenen Zyklen wieder gelöst und die DNA lag wieder als Einzelstrang vor.
- 3. Annealing: Durch Abkühlen des Reaktionsansatzes konnten die Primer an die komplementären DNA-Abschnitte binden.
- 4. Elongation: In dieser Phase fand die Verlängerung des neuen DNA-Abschnittes statt. Dabei bindet die Polymerase komplementäre dNTPs an die freien 3'OH-Enden der Primer und synthetisiert so den neuen DNA-Abschnitt.
- 5. Finale Elongation: Durch die finale zehnminütige Elongation wurde sichergestellt, dass die Polymerase genug Zeit hat die neuen DNA-Abschnitte zu synthetisieren.

Auf den fünften Schritt folgte eine Kühlphase von 4° C.

Die Zeiten und Temperaturen der verschiedenen PCR-Phasen wurden nach Herstellerangaben festgelegt.

Alle verwendeten Primer wurden bei der Firma Microsynth in Auftrag gegeben.

# PCR-Reaktionsansatz für die Phusion<sup>TM</sup> High-Fidelity DNA Polymerase

| Template-DNA [100 ng]          | xμl      |
|--------------------------------|----------|
| dNTPs [100 mM]                 | 1 μΙ     |
| 5xHF Puffer                    | 10 µl    |
| Primer (forward) [100 pmol/µl] | 0,5 μΙ   |
| Primer (reverse) [100 pmol/µl] | 0,5 μΙ   |
| Phusion Polymerase [2 u/µl]    | 0,5 μΙ   |
| A. i.                          | ad 50 µl |

Teilweise wurden die Substanzen DMSO, Betain oder Trehalose dem Reaktionsansatz zugegeben, da diese die Reaktion verstärken. DMSO senkt die Schmelztemperatur und kann eventuell hinderliche Sekundärstrukturen aufbrechen (Jensen et al., 2010). Es wurde entsprechend den Herstellerangaben mit der Endkonzentration von 100 mM dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Trehalose kann ebenfalls die Schmelztemperatur der DNA vermindern und darüber hinaus die Polymerase thermisch stabilisieren (Spiess et al., 2004). Betain kann auch die Schmelztemperatur senken, besonders bei GC-reichen DNA-Abschnitten und wie DMSO die Bildung von Sekundärstrukturen verhindern oder deutlich verringern (Jensen et al., 2010). Trehalose und Betain wurden jeweils bis zu einer Endkonzentration von 200 bis 400 mM dem Reaktionsansatz zugegeben.

Tabelle 7: PCR-Programm für Phusion-Polymerasen

| Reaktionsschritt  | Temperatur       | Zeit            | Zyklen |
|-------------------|------------------|-----------------|--------|
| Initiale          | 98° C            | 3 min           | 1      |
| Denaturierung     |                  |                 |        |
| Denaturierung     | 98° C            | 30 s            | 30     |
| Annealing         | Primerspezifisch | 30 s            | 30     |
| Elongation        | 72° C            | 1 kb in 15-30 s | 30     |
| Finale Elongation | 72° C            | 10 min          | 1      |
| Kühlphase         | 4° C             | ∞               | 1      |

**Tabelle 8: Verwendete Primer** 

| Drive          | Sequenz                 | T <sub>M</sub> | Deferen  |
|----------------|-------------------------|----------------|----------|
| Primer         | [5'-3']                 | [° C]          | Referenz |
| ( 0 110115     |                         |                | Schuster |
| forSpa MSHR    | TAAAGATGATCCTTCAGTAAGC  | 60             | (2015)   |
| TO CO O MOUD   |                         | 00             | Schuster |
| revSpa MSHR    | CAGCAGTTGTTCCATGTGCTT   | 62             | (2015)   |
|                |                         |                | Saunders |
| arcC-Up        | TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC | 62             | et al.   |
|                |                         |                | (2014)   |
|                |                         |                | Saunders |
| arcC-Dn        | AGGTATCTGCTTCAATCAGCG   | 59             | et al.   |
|                |                         |                | (2014)   |
| foraroE MSHR   | ATCGGTAGTCCAATTGAGCATTC | 59             | Schuster |
| IOIAIOE WOTIK  | AICGGIAGICCAAIIGAGCAIIC | 59             | (2015)   |
| revaroE MSHR   | GGAGTAGTATTTATCACAATATC | 50             | Schuster |
| Tevalor Mornix | GGAGIAGIAIIIAICACAAIAIC | 30             | (2015)   |
|                |                         |                | Saunders |
| glpF-Up        | CTAGGAACTGCAATCTTAATC   | 55             | et al.   |
|                |                         |                | (2014)   |
|                |                         |                | Saunders |
| glpF-Dn        | TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC | 58             | et al.   |
|                |                         |                | (2014)   |
| gmk-Up         | ATCGTTTTATCGGGACCATC    | 56             | Saunders |
| gillk-op       | AICGITTATCGGGACCATC     | 50             | et al.   |

|                 |                                   |    | (2014)   |
|-----------------|-----------------------------------|----|----------|
|                 |                                   |    | Saunders |
| gmk-Dn          | TCATTAACTACAACGTAATCGTA           | 54 | et al.   |
|                 |                                   |    | (2014)   |
|                 |                                   |    | Saunders |
| pta-Up          | GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG           | 53 | et al.   |
|                 |                                   |    | (2014)   |
|                 |                                   |    | Saunders |
| pta-Dn          | GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA           | 56 | et al.   |
|                 |                                   |    | (2014)   |
|                 |                                   |    | Saunders |
| tpi-Up          | TCGTTCATTCTGAACGTCGTGAA           | 61 | et al.   |
|                 |                                   |    | (2014)   |
|                 |                                   |    | Saunders |
| tpi-Dn          | TTTGCACCTTCTAACAATTGTAC           | 56 | et al.   |
|                 |                                   |    | (2014)   |
| yqiup           | CAGCATACAGGACACCTATTGGC           | 62 | Schuster |
| учир            | Chiefi Mendelle Mendelli Militare | 02 | (2015)   |
| yqidown         | CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC           | 59 | Schuster |
| yqidowii        |                                   |    | (2015)   |
| node_15_51_for  | AAGCAAGCTTGTTGGTTTGG              | 58 | Schuster |
| 11000_10_01_101 | -11-00-11-00-1-00-1-00            |    | (2015)   |
| node_15_51_rev  | GCTTAGCTCAGCTGGGAGAG              | 60 | Schuster |
| 11000_10_01_100 | 001110010110010010110             |    | (2015)   |
| node_15_52_for  | CTTTTCACCTTTCCCTCACG              | 57 | Schuster |
|                 |                                   |    | (2015)   |
| node_15_52_rev  | GGAGTTTACTTCTGTAAATGAGCA          | 57 | Schuster |
|                 |                                   |    | (2015)   |
| node_15_53_for  | TTCCCTCACGGTACTGGTTC              | 60 | Schuster |
|                 |                                   |    | (2015)   |
| node_15_53_rev  | AACAAAGCAGTATGCGAACG              | 58 | Schuster |
|                 |                                   |    | (2015)   |
| Node_1_9_for    | TTTCTGTCCCATTCCCTATCC             | 58 | Schuster |
|                 |                                   |    | (2015)   |
| Node_1_9_rev    | TTTGCTACCACTCCGAATTT              | 56 | Schuster |
|                 |                                   |    | (2015)   |
| Node_9_13_for   | TCAACGTTAATTCCAAAAACGTAA          | 56 | Schuster |

|                 |                               |    | (2015)   |
|-----------------|-------------------------------|----|----------|
| Node_9_13_rev   | TGAAGTGGTGCCATTCACTAA         | 58 | Schuster |
| 140dc_3_13_1cv  |                               |    | (2015)   |
| Node_3_4_for    | GCATTTGCTGGTTTGGAAAT          | 56 | Schuster |
| 140dc_0_4_101   | GeniiiGeiGdiiiGennii          |    | (2015)   |
| Node_3_4_rev    | CTCTTGCCCATGTGTTCTGA          | 58 | Schuster |
| 11000_0_1_101   | 010110000110101101            |    | (2015)   |
| Node_4_2cr_for  | TGAATGCAATAAACGGTGGA          | 56 | Schuster |
| 11000_1_201_101 | 16/11/186/11/11/11/1868/186/1 |    | (2015)   |
| Node_4_2cr_rev  | AAAATGCACTTGCAACAAGC          | 57 | Schuster |
| 11000_1_201_101 |                               |    | (2015)   |
| Node_2cr_6_for  | TTCAGGCGTCATTCTTTGAA          | 56 | Schuster |
| 11000_201_0_101 |                               |    | (2015)   |
| Node 2cr 6 rev  | GTGTTGCAGAGGCTTTTGGT          | 60 | Schuster |
| 11000_201_0_101 | 0.202.200.0002.2.2002         |    | (2015)   |
| Node_6_7_for    | GCCTGGCAACGTTCTACTCT          | 61 | Schuster |
| 11000_0_1_101   | 0001000110010101              |    | (2015)   |
| Node_6_7_rev    | AAAAGTCGTCAAACGGCACT          | 59 | Schuster |
| 11000_0_1_101   | THE HOLD COLUMN COCCIO        |    | (2015)   |
| Node_7_11_for   | TCTTGCCCATGTGTTCTGAG          | 58 | Schuster |
|                 |                               |    | (2015)   |
| Node_7_11_rev   | CAGAGTGGCGGAAAGTGAAT          | 59 | Schuster |
|                 |                               |    | (2015)   |
| Node_11_8_for   | GCCTGGCAACGTTCTACTCT          | 61 | Schuster |
|                 |                               |    | (2015)   |
| Node_11_8_rev   | CACCCGCTCCATAGATGAAT          | 58 | Schuster |
|                 |                               |    | (2015)   |
| Node_8_12cr_for | GCCTGGCAACGTTCTACTCT          | 61 | Schuster |
|                 |                               |    | (2015)   |
| Node_8_12cr_rev | TTGACTTCCAAAAATAAACGAAG       | 54 | Schuster |
|                 |                               |    | (2015)   |
| Node_12cr_5_for | TACGTCCCACTCCCTCATTC          | 59 | Schuster |
|                 |                               |    | (2015)   |
| Node_12cr_5_rev | CACTGCCTGCTTCTGTTACG          | 59 | Schuster |
|                 |                               |    | (2015)   |
| Node_5_1_for    | GCAGCGGTAAGTTGATTTCC          | 58 | Schuster |
| 14000_0_1_101   |                               |    | 2015     |

|                 |                                   |    | Schuster            |
|-----------------|-----------------------------------|----|---------------------|
| Node_5_1_rev    | AAGGTATGGCAGCAGTACCAG             | 60 | (2015)              |
| Node_13_10_for  | CCGCTAGTCTCCACCATTTT              | 58 | Schuster            |
| 11000_10_10_101 |                                   |    | (2015)              |
| Node_13_10_rev  | TCGACGCTATGGACCTTTCT              | 59 | Schuster            |
|                 |                                   |    | (2015)              |
| LipA1_for       | AAATGACCAACCCGATAAAAA             | 62 | Diese               |
| p>              |                                   |    | Arbeit              |
| LipA1_rev2      | AAAAAGGATCCTATGAGGATTGGTTGCACGA   | 60 | Diese               |
| . –             |                                   |    | Arbeit<br>Diese     |
| LipA2_for3      | AAAAAGGTACCTGGTCGACTCGAAATAGCTTT  | 60 | Arbeit              |
|                 |                                   |    | Diese               |
| LipA2_rev       | GCAATATCAGATGTGGTATGTTTTAG        | 61 | Arbeit              |
|                 |                                   |    | Diese               |
| BKon_for        | AAAAAGGATCCATAAAATAGATATCTCGGACCG | 57 | Arbeit              |
|                 |                                   |    | Diese               |
| Spec_rev2       | AAAAAGGTACCAAAAGTAAGCACCTGTTATTGC | 58 | Arbeit              |
| INT_Cherry_for1 | AGGTGAAGGTGAAGGTAGACC             |    | Diese               |
| INT_Cherry_fort | AGGIGHAGGIGHAGGIAGACC             | 59 | Arbeit              |
| INT_Cherry_rev1 | CACTTGAAGCTTCCCAACCC              | 60 | Diese               |
| iivi_onony_rovi | 61.6116.116.0116.01               | 60 | Arbeit              |
| INT_GFP_for1    | TTAGCGTTAGCGGTGAAGGT              | 60 | Diese               |
|                 |                                   | 00 | Arbeit              |
| INT_GFP_rev1    | TGTGTTATTCCAGCTGCTGTT             | 59 | Diese               |
|                 |                                   |    | Arbeit              |
| INT_pHHV216_for | TTTGCGCGAAACAGACAGAA              | 59 | Diese               |
|                 |                                   |    | Arbeit              |
| INT_pHHV216_rev | GCGCTGCATACGTCGATAAA              | 59 | Diese               |
|                 |                                   |    | Arbeit<br>Müller et |
| OXA48_For       | TTCGGCCACGGAGCAAATCAG             | 64 | al. (2018)          |
| OXA48_rev       | GATGTGGGCATATCCATATTCATCGCA       | 64 | Müller et           |
|                 |                                   |    | al. (2018)          |
|                 |                                   |    | Müller et           |
| Vim_for         | GATGAGTTGCTTTTGATTGATACAGC        | 60 | al. (2018)          |
| Vim_rev         | CCGACKCGRTCGTCAT                  | 60 | Müller et           |
| _               |                                   |    |                     |

|            |                                   |    | al. (2018)      |
|------------|-----------------------------------|----|-----------------|
| NDM_for    | CCCGACGATTGGCCA                   | 58 | Müller et       |
|            | CCCGACGAIIGGCCA                   |    | al. (2018)      |
| NDM_rev    | ATCCAGTTGAGGATCTGGGC              | 60 | Müller et       |
| INDIVI_IEV | ATCCAGTIGAGGATCTGGGC              | 00 | al. (2018)      |
| Tra1_for   | GATCCTTCGCCCAGATTGTA              | 58 | Diese           |
| 1141_101   |                                   |    | Arbeit          |
| Tra1_rev   | AAAAACCATGGTCTGGAAAAGCCTTAAAAACCA | 57 | Diese           |
|            |                                   |    | Arbeit          |
| Tra2_for   | AAAAATCCGGAGCGCATTAAGTACCAAGAACAA | 58 | Diese           |
|            |                                   |    | Arbeit          |
| Tra2_rev   | CACGATTAACCCCTATCGCA              | 58 | Diese           |
|            |                                   |    | Arbeit          |
| Tra3_for   | AGGCTGTTGATTTGCTGCTT              | 59 | Diese           |
| _          |                                   |    | Arbeit          |
| Tra3_rev   | AAAAACCATGGCGTGTCATTACTGGGGATATGA | 58 | Diese           |
| _          |                                   |    | Arbeit          |
| Tra4_for   | AAAAATCCGGAAACGGCTTAGATCCTCCTGT   | 59 | Diese           |
|            |                                   |    | Arbeit          |
| Tra4_rev   | GCTGTTGTTTCTGTCGCTCA              | 59 | Diese           |
|            |                                   |    | Arbeit          |
| LS_for     | CGGAGAGCTGGCTAGAATTT              | 58 | Diese           |
|            |                                   |    | Arbeit          |
| LS_rev     | CCCCAACATTTAGCAGAAGC              | 57 | Diese           |
|            |                                   |    | Arbeit          |
| DPL_for    | TTTCGAGTGGCTTTTAGGTCA             | 58 | Diese<br>Arbeit |
|            |                                   |    | Diese           |
| DPL_rev    | ACGTCATCAGCCTTTTCAGG              | 59 | Arbeit          |
|            |                                   |    | Diese           |
| ZdG1_for   | CGCTGTGAGAGGTGTTGATT              | 59 | Arbeit          |
|            |                                   |    | Diese           |
| ZdG1_rev   | CTCAATGCATCCCCAAAAAC              | 56 | Arbeit          |
|            |                                   |    | Diese           |
| HP1_for    | GCTGGGAGTTTATTCGTGGA              | 58 | Arbeit          |
|            |                                   |    | Diese           |
| HP1_rev    | CGTAAATCCTGCCAGTTTAGC             | 58 | Arbeit          |
|            | 51                                |    |                 |

|           |  |    | Diese           |
|-----------|--|----|-----------------|
| HP2_for   | GCCATATTTTGTACAAGTAAGCTTTTC            | 58 | Arbeit          |
| LIDO      |  |    | Diese           |
| HP2_rev   | GGCAGATCATTTGTATAGGTCAG                | 57 | Arbeit          |
| 7400 for  |  | 50 | Diese           |
| ZdG2_for  | TTGTTTTGTTGCTGGGATTG                   | 56 | Arbeit          |
| ZdG2_rev  | TACGACGACTCACCCAGTTG                   | 60 | Diese           |
| 2002_160  | TACGACGACTCACCCAGTTG                   | 00 | Arbeit          |
| ELF4_for  | ACCGATGCTGCTTTAATGGT                   | 58 | Diese           |
| 22.1_101  |  |    | Arbeit          |
| ELF4_rev  | TCTATGGCATCGGCTAAAAA                   | 55 | Diese           |
|           |  |    | Arbeit          |
| ABCT_for  | CAGGTGCTGTTGCACAGATT                   | 60 | Diese           |
|           |  |    | Arbeit          |
| ABCT_rev  | AACCCAGCGTGGAGAAGTC                    | 57 | Diese           |
|           |  |    | Arbeit          |
| BapA1_for | CTGTGACGCTCAGGTCATGT                   | 61 | Diese           |
|           |  |    | Arbeit          |
| BApA1_rev | CCATCAAAGATGGTGAGAGC                   | 59 | Diese<br>Arbeit |
|           |  |    | Diese           |
| BapA2_for | GGCATCTGCTGTTCCTGAGT                   | 61 | Arbeit          |
|           |  |    | Diese           |
| BApA2_rev | CGACTGCGACTGCAAGTTTA                   | 59 | Arbeit          |
|           |  |    | Diese           |
| ZdG3_for  | ATTGTTGCGCCACTTTTAGC                   | 58 | Arbeit          |
|           |  |    | Diese           |
| ZdG3_rev  | GGCGTTAGCCATGTGAGAGT                   | 61 | Arbeit          |
| TOL for   | CCD D D D CD D CD D CD C C C C C C C C | 57 | Diese           |
| TGL_for   | GCAAAAGATCAAGGACAAAGC                  |    | Arbeit          |
| TGL roy   | CCCA $ACTCA$ $CTCCCTA$ $CATCA$         | 58 | Diese           |
| TGL_rev   | CCCAAGTGACTGCTACATGA                   |    | Arbeit          |
| ZdG4_for  | ACTCAACCTGCCTTTCTGGA                   | 60 | Diese           |
|           | MOTO/MICCIGCOTITOTIGA                  |    | Arbeit          |
| ZdG4_rev  | ATCTGTGGGGAAAAGGGAGT                   | 59 | Diese           |
|           |  |    | Arbeit          |
| HAMP_for  | TGCATCGTGTGGTTCAAAAT                   | 57 | Diese           |

|            |                       |    | Arbeit |
|------------|-----------------------|----|--------|
| HAMP_rev   | CCAGAAGCACGTGTACGACT  |    | Diese  |
| TIAWI _ICV |                       |    | Arbeit |
| TetR_for   | GAGCCATGGTTACTCCACAA  | 58 | Diese  |
| TetK_101   | GAGCCATGGTTACTCCACAA  | 36 | Arbeit |
| TetR_rev   | TCTTATGGGGGTGCCAACTA  | 59 | Diese  |
|            | TETTATGGGGGTGCCAACTA  |    | Arbeit |
| GAF_for    | TGATGCTATCATTCACGCAAT | 57 | Diese  |
|            | IGAIGCIAICAIICACGCAAI |    | Arbeit |
| GAF_rev    | TGAGAAGGGATCAGGTTTGG  | 58 | Diese  |
|            | 1GAGAAGGG111GG        |    | Arbeit |

# 2.11 Aufreinigung von PCR- Produkten

Für die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das GeneJet<sup>TM</sup> PCR Purification Kit der Firma Thermo Scientific verwendet. Der Prozess diente dazu überschüssige dNTPs, Primer, Salze und Enzyme aus dem Ansatz zu entfernen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, allerdings wurde mit 30 µl A. i. statt mit 50 µl Elutionspuffer eluiert.

# 2.12 Sequenzierung von DNA

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden zur Firma Microsynth oder Eurofins Genomics geschickt und dort per Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) sequenziert. Ganze bakterielle Genome wurden mit dem MiSeq von Illumina sequenziert. Hierfür wurde das MiSeq Reagent Kit V3, das Nextera XT DNA Library Preparation Kit und das Nextera XT Index Kit nach Herstellerangaben verwendet.

# 2.13 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt werden. Für diese Arbeit wurden Gele mit 1% und 3,5 % Agarose gegossen. Hierzu wurde 1x TAE-Puffer verwendet, der auch als Laufpuffer diente. Die Gele mit 3,5 % Agarose wurden im Kolben direkt vor dem Gießen für ca. 30 s in ein Ultraschallbad eingetaucht, welches mit heißem Wasser gefüllt war. Die Ultraschallbehandlung diente der Entfernung von Luftblasen im Gel, die beim Aufkochen entstanden waren. Die Proben wurden vor dem Beladen der Gele mit 6 x Orange Loading Dye vermischt. Die Auftrennung erfolgte bei 80-110 V. Anschließend wurden die Gele für 30 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 μg / ml) gefärbt. Dabei interkaliert das Ethidiumbromid in die DNA und erhöht die Fluoreszenz bei Anregung mit UV-Strahlung, da sich das Absorptionsspektrum der DNA verändert. Durch die

erhöhte Fluoreszenz können die DNA-Fragmente im Gel sichtbar gemacht werden. Im Anschluss wurden die Gele im ImageMaster VDS fotografiert.

Um das toxische Ethidiumbromid und die UV-Strahlung möglichst zu vermeiden, wurde ein Teil der Proben alternativ vor dem Beladen des Agarosegels mit MidoriGreen Direct vermischt und nach der Auftrennung auf dem FastGene Blue/Green LED Transilluminator XL fotografiert. Dieser nutzt im Gegensatz zum Imagemaster VDS nur LED- statt UV-Beleuchtung.

#### Verwendete Puffer und Lösungen

#### **50X TAE**

Tris: 121,14 g  $Na_2EDTAx2H_2O$  9,31 g Essigsäure 27 ml A. dest. ad 500 ml

→ pH 8,5

#### 2.14 MALDI-TOF-MS

Die Probenvorbereitung erfolgte mit den unten aufgeführten Methoden. Für die Kokristallisation wurde eine α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure-Matrix-Lösung verwendet. Zur Herstellung dieser wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß 1 ml einer Lösung aus 50 % Acetonitril, 2,5 % Trifluoressigsäure und 47,5 % A. i. vorgelegt, in die α-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure bis zur Sättigung gegeben wurde. Für diese Arbeit kam ein automatisiertes Vitek MS mit der Myla Software zum Einsatz. Von ausgewählten Stämmen wurden manuelle MALDI-TOF-MS-Spektren zur Überprüfung mit einem Bruker Biflex III mit der flexAnalysis Software v. 2.0 angefertigt.

#### 2.14.1 Peptid-Extraktion

Für die Peptid-Extraktion wurde eine 5 ml Vorkultur über Nacht bebrütet und in einem Eppendorfgefäß bei 15000 g für 2 min abzentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen, sodass ca. 10 mg Zellmaterial pelletiert wurden. Das Pellet wurde anschließend mit 300  $\mu$ l A. i. resuspendiert. Nach der Zugabe von 900  $\mu$ l Ethanol wurde abermals vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde die Probe zwei Mal bei 15000 g für 2 min abzentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Das Pellet wurde zuerst mit 50  $\mu$ l 70%iger Ameisensäure resuspendiert und danach mit 50  $\mu$ l Acetonitril vermischt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 15000 g für 2 min. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Für die Messung wurde 1  $\mu$ l dieses Überstandes auf das MALDI-Target aufgetragen. Direkt nachdem der Tropfen an der Luft getrocknet war,

wurde dieser schließlich mit 2 µl Matrix-Lösung überschichtet und erneut an der Luft getrocknet

### 2.14.2 Direkte Applikation von Zellmaterial

Für die direkte Applikation von Zellmaterial nach Josten et al. (2014) hingegen wurden auf zwei Spots des Targets je ein bis zwei Kolonien einer über Nacht gewachsenen Vorkultur direkt aufgetragen. Nachdem die Proben auf den beiden Spots getrocknet waren, wurde eine der Proben direkt mit 2 μl Matrix-Lösung überschichtet und an der Luft getrocknet. Die andere Probe hingegen wurde mit 1 μl Acetonitril und 1μl Ameisensäure überschichtet. Nach dem erneuten Trocknen an der Luft wurde auch diese Probe mit 2 μl Matrix-Lösung überschichtet und erneut an der Luft getrocknet.

### 2.15 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Um das Wachstum einer Kultur in flüssigen Medien zu dokumentieren, kann die optische Dichte (OD) herangezogen werden. Die Messung der OD beruht auf der Streuung eines Lichtstrahls, hervorgerufen durch Partikel, respektive Bakterien, in der vermessenen Lösung in einer Küvette. Die durch die Bakterienzellen abgelenkten Lichtstrahlen können nicht mehr detektiert werden und die so verminderte Lichtintensität wird als Extinktion bezeichnet. Die Differenz der Extinktionswerte, gemessen bei 600 nm, von Nullwert und Probe ergeben den so genannten OD<sub>600nm</sub>-Wert (OD<sub>600nm</sub>). Dieser Wert lässt Rückschlüsse auf die in der Probe vorhandene Zellzahl zu und gilt somit als Einheit für die Zellzahl bzw. Zellmasse in einer wässrigen Bakterienlösung.

# 2.16 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurde das GeneJet<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit von Thermo Scientific verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, allerdings wurde zum Zellaufschluss von Staphylokokken eine zusätzliche Lyse der Probe mit Lysostaphin durchgeführt. Hierfür wurde das nach Herstellerangaben abgeerntete Pellet in 250 μl Resuspensionspuffer gelöst und mit 50 μg/ml Lysostaphin für mindestens 30 min bei 37 °C inkubiert. Außerdem wurde mit 30 μl A. i. statt mit 50 μl Elutionspuffer eluiert.

### 2.17 Isolierung genomischer DNA

Für die Präparation von genomischer DNA wurde das PrestoSpin D Kit von Molzym verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, allerdings wurde zum Zellaufschluss von Staphylokokken eine zusätzliche Inkubation der Probe mit Lysostaphin durchgeführt. Hierfür wurde das Pellet in 50 µl RS-Puffer resuspendiert und anschließend mit 50 µg/ml Lysostaphin für mindestens 30 min bei 37 °C lysiert. Außerdem wurde mit A. i. statt

mit Elutionspuffer eluiert. Alternativ kam das Epicentre© Masterpure<sup>™</sup> Complete DNA and RNA Purification Kit von Lucigen nach Herstellerangaben zum Einsatz.

#### 2.18 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind von Bakterien produzierte Enzyme, die eigentlich dem Schutz vor Bakteriophagen dienen, indem sie artfremde DNA abbauen. In der Molekularbiologie werden Restriktionsendonukleasen verwendet, da sie in der Lage sind spezifische, palindromische Sequenzen z. B. in PCR-Produkten oder Plasmiden zu erkennen und die Phosphodiesterbindung der dsDNA zu hydrolysieren. Besonders Restriktionsenzyme des Typs II sind für die Molekularbiologie interessant, da diese kein ATP benötigen, um eine Sequenz zu hydrolysieren. Die Enzyme können beim Verdau der dsDNA zwei auf den Einzelsträngen gegenüberliegende oder zueinander versetzte Schnittstellen generieren. Dem entsprechend entstehen glatte (blunt) oder überhängende (sticky) Enden. Für die Restriktionsverdaue in dieser Arbeit wurden FastDigest® Enzyme von Thermo Scientific verwendet.

# Restriktionsansatz für Fermentas FastDigest® Enzyme

|                       | Plasmid-DNA | via PCR amplifizierte DNA |
|-----------------------|-------------|---------------------------|
| 10X FastDigest Puffer | 2 µl        | 3 μΙ                      |
| DNA                   | 1000 ng     | 500ng                     |
| Restriktionsenzym(e)  | 1 μΙ        | 1 μΙ                      |
| A. i.                 | ad 20 µl    | ad 30 µl                  |

Die Ansätze wurden bei 37 °C für 30 min (Plasmid-DNA) bzw. für 60 min (PCR-Produkte) im Wasserbad inkubiert und anschließend je nach Enzym hitzeinaktiviert.

Tabelle 9: Verwendete Restriktionsendonukleasen (FastDigest®, Thermo Scientific)

| Enzym | Quelle                     |               | Erkennungssequenz |
|-------|----------------------------|---------------|-------------------|
| BamHI | Bacillus amyloliquefaciens | ATCC 23350    | 5'-G^GATCC-3'     |
| Kpnl  | Klebsiella pneumoniae      | ATCC BAA-2473 | 5'-GGTAC^C-3'     |

# 2.19 Ligation

Bei der Ligation werden zwei DNA-Fragmente zwischen dem 3'-Hydroxy- und dem 5'-Phosphat-Ende mit Hilfe einer Phosphodiesterbindung verknüpft. Dieser Vorgang wird durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert. Um die Insert-DNA in den Vektor einbauen zu können, wurden Insert und Vektor zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut.

Anschließend wurde der Ligationsansatz mit dem NEBioCalculator so berechnet, dass Vektor und Insert im Verhältnis 1:5 gemischt vorlagen.

#### <u>Ligationsansatz</u>

Vektor-DNA 1 Teil
Insert-DNA 5 Teile  $10x T4\text{-DNA-Ligase-Puffer} \qquad 2 \ \mu \text{I}$   $T4\text{-DNA-Ligase} \qquad 1 \ \mu \text{I}$ A. i. ad 20  $\mu \text{I}$ 

Zunächst wurden Vektor, Insert und A. i. zusammengegeben und 15 min bei 45 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen des Ansatzes wurden der Ligase-Puffer und die Ligase hinzugefügt. Wurde die T4-Ligase von Fermentas verwendet, wurde der nun vollständige Ansatz 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und danach bei 70 °C für 5 min hitzeinaktiviert. Wenn dem entgegen die T4-Ligase von Roche Anwendung fand, wurde der nun vollständige Ligationsansatz über Nacht bei 5 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Unabhängig vom Fabrikat der Ligase wurde nach der Hitzeinaktivierung der Ansatz direkt zur Transformation von chemokompetenten Zellen weiterverwendet oder per PCR vervielfältigt.

# 2.20 Natürliche Kompetenz von Acinetobacter baylyi BD413

Das angewendete Verfahren zur Transformation von *A. baylyi* BD413 mittels natürlicher Kompetenz wurde in dieser Arbeit nach Palmen et al., 1993 modifiziert. *A. baylyi* BD413 kann dank seiner Kompetenz natürlich transformiert werden. Hierfür werden, wie in Abbildung 6 gezeigt, die Zellen in einen kompetenten Zustand versetzt. *A. baylyi* BD413 wird kompetent, sobald man eine stationäre Kultur mit frischem Medium verdünnt. Hat das Bakterium die stationäre Phase verlassen, verbleibt es in diesem Zustand natürlicher Kompetenz bis zur nächsten späten Log-Phase (https://barricklab.org/twiki/bin/view/Lab/ProtocolsAcinetobacterTransformation Stand 05.01.2025). Anschließend wird der Stamm mit der gewünschten doppelsträngigen DNA inkubiert, so dass er genügend Zeit hat um die DNA zu binden und aufzunehmen. Die so akquirierte DNA wird normalerweise innerhalb 1h ins Genom integriert und abgelesen (Palmen et al., 1993)

Für die Transformation per natürlicher Kompetenz wurde der entsprechende Stamm von *A. baylyi* BD413 in einer Übernachtkultur von 5 ml LB bei 37 °C und 170 Umdrehungen pro Minute (rpm) bebrütet. Um die Bakterien in den Status der Kompetenz zu versetzen, wurde 1 ml der stationären Vorkultur in einem sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 25 ml frischem LB-Medium verdünnt und für 2 Stunden (h) bei 30 °C, 170 rpm geschüttelt. 500 µl der nun

kompetenten Zellen wurden in einem sterilen 5 ml Glasröhrchen mit 2 µg DNA versetzt. Hierfür eignet sich am besten aufgereinigte DNA, alternativ kann auch eine entsprechende Menge ganzer Zellen für 10 min bei 100 °C aufgekocht und eingesetzt werden. Für den eigentlichen Vorgang der natürlichen Transformation wurden die Bakterien je nach Länge der aufzunehmenden DNA bei 30 °C und 170 rpm bebrütet. Typischerweise ergab sich eine Zeitspanne von ca. 2 h, inklusive einer zusätzlichen Stunde Zeit für den Stamm die neu aufgenommenen Gene abzulesen und eventuell vorhandene Resistenzgene zu exprimieren (AR etc.). Anschließend wurden die Zellen auf geeigneten Selektionsmedien ausplattiert und für 24 h im 30 °C warmen Brutschrank inkubiert.

#### 2.21 Puddle-Transformation

Als Alternative zu der Methode von Palmen et al. (1993) wurde in dieser Arbeit die sog. Puddle-Transformation verwendet. Das hier beschriebene Protokoll ist modifiziert nach Suárez et al. (2020). Aus einer Kultur von *A. baylyi*, angezogen bei 30 °C und 170 rpm ÜN, wurden 50 µl entnommen und mit 2 µg DNA in einem frischen 1,5 ml Eppendorfgefäß vermischt. Eine sterile Filtermembran mit einem Durchmesser von 47 mm und einer Porengröße von 0,2 µm wurde zur Vorbereitung auf eine MH- oder LB-Agarplatte ohne Antibiotikazusatz gelegt. Das Gemisch wurde nun vorsichtig auf die Membran getropft. Dabei ist darauf zu achten, dass die Tropfen sich nicht vereinigen. Die geschlossene Agarplatte wurde anschließend ÜN bei 30 °C inkubiert. Die Tropfen wurden am nächsten Tag mit der Pipette wieder abgenommen und in 200 µl MH- oder LB-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden daraufhin auf Nähragarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen zur Selektion ausplattiert und ÜN bei 30 °C bebrütet.

### 2.22 Vorbereitungen für die Fluoreszenzmikroskopie

Für die Mikroskopie der Proben werden beschichtete Objektträger benötigt. Hierfür wurde eine 1% Agaroselösung aufgekocht und 350 µl auf einen sterilen Objektträger gegeben. Ein zweiter, ebenfalls steriler Objektträger, wurde auf den ersten gelegt, so dass sich die Agarose gleichmäßig und ohne Luftblasen verteilte. Das Konstrukt wurde für ca. 30 min bei RT getrocknet und die beiden Hälften anschließend wieder vorsichtig voneinander getrennt. Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien benötigten weder einen Stimulus noch einen externen Fluoreszenzfarbstoff, da die Zellen bereits selbständig und dauerhaft GFP bzw. mCherry produzieren. Von einer Vorkultur ausgehend, wurde eine Hauptkultur der entsprechenden Bakterien in 50 ml LB-Medium bis zur einer OD<sub>600nm</sub> zwischen 0,1 und 0,2 (frühe exponentielle Phase) angezogen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 170 rpm in einem zuvor sterilisierten 100 ml Erlenmeyerkolben. Auf die mit Agarose beschichteten

Objektträger wurden 0,5 µl Bakteriensuspension pipettiert, ein Deckgläschen aufgelegt und die Probe anschließend mikroskopiert.

# 2.23 Antibiogramme

Zur Ermittlung der MHK einer Substanz wurden in dieser Arbeit fünf verschiedene Arten der Antibiogramme durchgeführt. Die MHK stellt die Konzentration der inhibierenden Substanz dar, bei der die getesteten Bakterien gerade nicht mehr wachsen können. Die Ergebnisse wurden nach den Richtlinien des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2021 ausgewertet. Da die EUCAST 2021 nicht für alle Antibiotika spezifische Werte für *Acinetobacter* vorgibt, wurden die entsprechenden Werte aus der "nicht Spezies spezifischen Tabelle" miteinbezogen. EUCAST ist auf die klinische Relevanz der Testungen ausgelegt. Substanzen, die für die klinische Anwendung bei dieser Spezies keine Verwendung finden oder gegen die die entsprechende Gattung als intrinsisch resistent für die Anwendung am Patienten gilt, werden folglich nicht berücksichtigt. Auch wenn die maschinell angefertigten Antibiogramme zunächst nach EUCAST 2015 ausgewertet worden waren, wurden sie nachträglich nach den Richtlinien der EUCAST 2021 bewertet. Die Ergebnisse der Agardiffusionstests mit Plättchen wurden abweichend hiervon nach den Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2002/ 2005), sowie der DIN-Norm 58940-4,1989 ausgewertet (Tabelle 10).

#### 2.23.1 Vitek®2-System

Ein Teil der Antibiogramme in dieser Arbeit wurde mit dem Vitek®2-System der Firma Biomerieux (Marcy l'Etoile [Frankreich]) in einem automatisierten Verfahren angefertigt. Hierfür wurde mit einem sterilen Wattetupfer Koloniematerial einer Vorkultur in 2 ml 0,45 %ige NaCl-Lösung resuspendiert, bis eine optische Dichte von ca. 0,5 Mc-Farland erreicht wurde. Die optische Dichte 0,5 nach Mc-Farland entspricht in etwa 150 Millionen Keimen pro ml und wurde mit Hilfe eines DensiCHEK plus der Firma BioMérieux (Marcy l'Etoile [Frankeich]) gemessen. Die so angefertigte Lösung wurde anschließend in einem speziellen Ständer, zusammen mit einer sog. Vitek®2-Karte für Antibiogramme, in das Vitek®2-System hineingestellt. Für diese Arbeit wurden Karten des Typs AST-P632 verwendet, da diese Karten speziell für Staphylokokken entworfen wurden. Die Maschine stellte nun eigenständig eine geeignete Kultur für die nachfolgenden Tests her, indem sie die eingegebene Keimsuspension in die Kammern der Karte saugte. In diesen Kammern war bereits eine bestimmte Menge eines Antibiotikums als Pulver vorgelegt. Die Karten wurden nun für die nächsten 15 h bei 37 °C bebrütet. Für die Ermittlung der Antibiogramme wurde das bakterielle Wachstum in den Kammern der Karte zu verschiedenen Zeitpunkten aufgrund der eintretenden Trübung optisch gemessen. Aus diesen Messwerten errechnete das System, nach Eingabe der Art des zu analysierenden Keims, dessen Empfindlichkeit gegenüber folgenden Antibiotika: Oxacillin, Gentamicin, Tetracyclin, Tigecycline, Erythromycin, Clindamycin, Fosfomycin, Trimethoprim / Sulfamethoxazol, Vancomycin, Teicoplanin, Linezolid, Daptomycin, Fusidinsäure, Levofloxacin und Rifampicin. Vereinzelt wurde zusätzlich die Empfindlichkeit gegenüber Benzylpenicillin ermittelt.

#### 2.23.2 Micronaut-System

Ein weiterer Teil der Antibiogramme in dieser Arbeit wurde mit dem halbautomatisierten Micronaut-S MDR MRGN Screening 3 System von Merlin Diagnostika erstellt. Nach Herstellerangaben wurde eine verdünnte Vorkultur in Mikrodilutionsplatten gegeben und für 48 h bei 30 °C und 170 rpm bebrütet. In den 96-Well-Platten war bereits eine bestimmte Menge getrockneter, pulverförmiger Antibiotika vorgelegt. Nach 24 h Bebrütung der Platten wurden diese mit der geräteeigenen MCN-6 Software nach EUCAST 2015 ausgewertet. Nach weiteren 24 h Inkubation wurden die Platten erneut ausgewertet.

### 2.23.3 Mikrodilutionsmethode

In dieser Arbeit wurde eine modifizierte Version der Mikrodilutionsmethode nach Andrews (2001) zur Ermittlung der MHK verwendet. Für eine manuelle Empfindlichkeitsbestimmung wurde eine Vorkultur der zu testenden Bakterien ÜN in 5 ml MH angezogen. Aus dieser Übernachtkultur wurde ein Inokulum von  $OD_{600nm}$  1 erzeugt, was ca.  $5x10^8$  Zellen pro ml entspricht. Dieses wurde mit frischem MH-Medium zunächst 1:10 und im zweiten Schritt 1:100 auf insgesamt 1:1000 verdünnt. In eine sterile 96-Well-Mikrodilutionsplatte wurde eine Konzentrationsreihe der zu testenden Substanz in je 100  $\mu$ l je Well vorgelegt. Die höchste Konzentration wurde dabei immer 1:2 weiter verdünnt, so dass z. B eine Konzentrationsreihe von 1024; 512; 256; 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5 mg/l entstand. Von der vorbereiteten Bakteriensuspension wurden in jedes Well 100  $\mu$ l pipettiert. Zur Kontrolle wurde mindestens ein Well mit 100  $\mu$ l Bakteriensuspension und 100  $\mu$ l frischem MH-Medium beschickt. Die Mikrodilutionsplatte wurde anschließend mit einem Polyesterfilm verschlossen und bei 30 °/ 37 °C, 170 rpm inkubiert. Die Platten wurden nach 24 h und 48 h nach den Richtlinien des EUCAST 2021 ausgewertet.

#### 2.23.4 Agardiffusionstest mit Plättchen

Für einen Agardiffusionstest nach Bauer et al., 1966 wurde der zu testende Stamm am Vortag frisch ausgestrichen und ÜN bebrütet. Von dieser Platte wurde eine Kolonie mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers gepickt und in 10 ml NaCl-Lösung resuspendiert. Aus der so gewonnenen Bakteriensuspension wurden 100 µl in weitere 10 ml NaCl-Lösung überführt und gut durchmischt. Mit dieser Lösung wurde eine Müller-Hinton Agar Platte überspült und unter der Sterilbank getrocknet. Hiernach wurden mittels eines Stempels mehrere verschiedene Antibiotikaplättchen auf die Platte aufgebracht und diese über Nacht bei 37° C inkubiert. Die antibiotikahaltigen Plättchen enthielten eine definierte Menge Antibiotika und

diese diffundierte kreisförmig in den Agar. Durch die Diffusion entstand ein nach außen hin abnehmender Antibiotikagradient. Ab einer bestimmten Konzentration an AB können die Bakterien trotzdem auf der Platte wachsen. Die Antibiotikakonzentration, die gerade noch ausreicht um das Wachstum der Bakterien zu unterbinden, wird Minimale Hemmkonzentration genannt und ist proportional zum gebildeten Hemmhof um das Plättchen. Nach 16 h Bebrütung wurden die Hemmhöfe in mm ausgemessen und für *S. aureus* nach Richtlinien des CLSI (2002/ 2005), sowie des DIN\* (58940-4,1989) ausgewertet.

Tabelle 10: Im Agardiffusionstest verwendete Antibiotika, Antibiotikakonzentrationen und laut CLSI/DIN\* vorgegebene Hemmhofgrößen für *Staphylococcus aureus*.

| Antibiotikum  | Ø Hemmhof [mm] |             | Plättchenbezeichnung | Dosis |         |  |
|---------------|----------------|-------------|----------------------|-------|---------|--|
|               | resistent      | intermediär | sensitiv             |       | [units] |  |
| Stempel 1     |                |             |                      |       |         |  |
| Penicillin    | ≤ 28           |             | ≥ 29                 | Р     | 10      |  |
| Ampicillin    | ≤ 28           |             | ≥ 29                 | AMP   | 10      |  |
| Sulbactam/    | ≤ 11           | 11-15       | ≥ 15                 | SAM   | 20      |  |
| Ampicillin    |                |             |                      |       |         |  |
| Oxacillin     | ≤ 15*          |             | ≥ 16*                | OX    | 5       |  |
| Cephazolin    | ≤ 19*          | 19-22*      | ≥ 22*                | KZ    | 30      |  |
| Cefoxitin     | ≤ 20*          | 20-26*      | ≥ 26*                | FOX   | 30      |  |
|               | l              | Ste         | mpel 2               |       |         |  |
| Gentamicin    | ≤ 14*          | 14-21*      | ≥ 21*                | CN    | 10      |  |
| Netilmicin    | ≤ 16*          | 16-22*      | ≥ 22*                | NET   | 10      |  |
| Erythromycin  | ≤ 16*          | 16-21*      | ≥ 21*                | E     | 10      |  |
| Clindamycin   | ≤14*           | 14-17*      | ≥ 17*                | DA    | 1510    |  |
| Imipenem      | ≤ 19*          | 19-24*      | ≥ 24*                | IPM   | 10      |  |
| Ciprofloxacin | ≤ 18*          | 18-23*      | ≥ 23*                | CIP   | 5       |  |
| Fusidinsäure  | ≤ 19*          |             | ≥ 20*                | FD    | 10      |  |
| Doxycyclin    | ≤ 12           | 12-16       | ≥ 16                 | DO    | 30      |  |
| Stempel 3     |                |             |                      |       |         |  |
| Fosfomycin    | ≤ 13*          | 13-20*      | ≥ 20*                | FOS   | 50      |  |
| Vancomycin    |                |             | ≥ 15                 | VA    | 30      |  |
| Teicoplanin   | ≤ 10           | 10-14       | ≥ 14                 | TEC   | 30      |  |
| Mupirocin     | ≤ 9            |             |                      | MUP   | 5       |  |
| Moxifloxacin  | ≤ 20           | 20-24       | ≥ 24                 | MFX   | 5       |  |
| Linezolid     |                |             | ≥2 1                 | LZD   | 30      |  |

| Rifampicin | ≤ 16 | 16-20 | ≥ 20 | RD  | 2  |
|------------|------|-------|------|-----|----|
| Co-        | ≤ 10 | 10-16 | ≥16  | SXT | 25 |
| Trimoxazol |      |       |      |     |    |

#### 2.23.5. Agardiffusionstest mit Aussparungen

Für einen Agardiffusionstest nach Balouiri et al. (2016) mit Aussparungen wird die Agarplatte wie für einen Plättchentest in Abschnitt 2.24.4 vorbereitet. Anschließend wurden Löcher mit einem Ø 6 mm sterilisierten Korkbohrer in den Agar gestanzt. Die getesteten Schwermetalle wurden in Wasser gelöst und entsprechend 20 µl in jedes Loch pipettiert. Die Bebrütung der Agarplatten und das Ausmessen der Hemmhöfe wurden wieder wie in Abschnitt 2.24.4 durchgeführt.

# 2.24 Checkerboard-Assay

Um die Synergie zweier antibiotisch wirksamer Stoffe zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Checkerboard-Assay aus einer Kombination von Ozbek et al. (2014), Pillai et al. (2005) und Sopirala et al. (2010) verwendet. Dabei werden zwei Antibiogramme in einer 96-Well-Mikrotiterplatte gleichzeitig ausgeführt. Das hierfür verwendete Schema ist in Abbildung 12 zu sehen. Die Beschickung der einzelnen Näpfchen mit den zu testenden Substanzen und der Bakteriensuspension in MH-Medium geschieht dabei grundsätzlich gleich wie bei einem Antibiogramm nach der Mikrodilutionsmethode (siehe Abschnitt 2.24.3). Die gelösten Testsubstanzen umfassen dabei pro Well zusammen 100 µl und werden mit 100 µl Bakterien aufgefüllt. Für eine MHK der jeweiligen Substanz A oder B wird, wie in Abbildung 12 dargestellt, in die Reihe H und Spalte 12 je nur eine der beiden Substanzen gegeben. Um etwas über die Synergie der beiden Substanzen aussagen zu können, wird die fraktionierte Hemmkonzentration oder engl.: "Fractional Inhibitory Concentration" (FIC) herangezogen. Der FIC-Index berechnet sich aus den Werten der beiden sich Antibiogramme überschneidenden nach folgender Formel:

$$\frac{A}{MHK_A} + \frac{B}{MHK_B} = FIC_A + FIC_B = FIC$$

A und B stehen für die MHK der einzelnen Substanzen im entsprechenden kombinierten Well, z. B: grünes Well in Abbildung 12. MHK<sub>A</sub> und MHK<sub>B</sub> stehen für die in Reihe H und Spalte 12 separat ermittelten MHKs der einzelnen Substanzen. Ein FIC-Index von <0,5 spricht für eine Synergie der Substanzen, Werte >4 für einen Antagonismus und ein FIC-Index zwischen 0,5 und 4 zeigt ein additives oder indifferenten Ergebnis an.

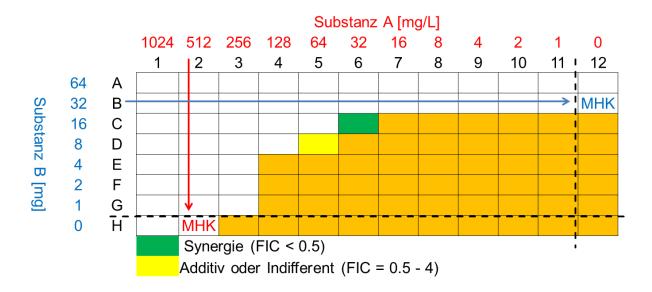


Abbildung 12: Dargestellt ist ein Checkerboard-Assay. FIC (engl.: "Fractional Inhibitory Concentration") steht für den FIC-Index. Dieser dient zur Quantifizierung der Interaktion von antimikrobiell aktiven Substanzen. Die orange hinterlegten Kästchen stehen für bakterielles Wachstum, während die nicht farbigen Kästchen keinen Bewuchs aufweisen. Das Grüne und gelbe Kästchen stehen entsprechen für eine Synergie der beiden getesteten Substanzen oder für ein additives oder indifferentes Ergebnis. Abbildung modifiziert nach Pillai et al., 2005.

## 2.25 Minimale Selektive Konzentration (MSC)

Unter anderem Gullberg et al. (2011) und Khan et al. (2017) zeigten auf, dass es auch unterhalb der MHK zu selektiven Prozessen durch Antibiotika kommen kann. Deshalb wurde die MSC eingeführt. Diese beschreibt die Konzentration eines Stoffes, ab der ein resistenter Stamm einen Wachstumsvorteil gegenüber einem isogenen empfindlichen Stamm hat. Die Hemmung des Wachstums durch die inhibierende Substanz gleicht an diesem Punkt die Wachstumsnachteile durch die Resistenz aus, wie in Abbildung 7 dargestellt. Resistente Stämme haben oft ein langsameres Wachstum, z. B. durch ein großes Resistenzplasmid, entsprechende Mutationen etc. Für die Bestimmung einer MSC wurde von den zwei konkurrierenden Stämmen je eine einzelne Vorkultur in 5 ml MH ÜN bei 30 °C und 170 rpm angezogen. Aus jeder stationären Übernachtkultur wurde eine Bakteriensuspension von OD<sub>600nm</sub> 1 hergestellt und in zwei Schritten 1:10 und 1:100 auf insgesamt 1:1000 mit frischem MH-Medium verdünnt. In sterile Glasröhrchen wurden 5 ml MH-Medium vorgelegt und die entsprechende antimikrobielle Substanz oder Substanzkombination zugegeben. Von jedem Stamm wurde je 10 µl in die Röhrchen pipettiert und über Nacht bei 37 °C, 170 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die ganze Kultur durch mehrmaliges pelletieren in einem 2 ml Eppendorfgefäß bei 15000 g für 2 min abzentrifugiert und dreimal gewaschen, zweimal mit je 1 ml sterilem 10% Glycerin und einmal mit 1 ml MilliQ. Nach dem erneuten Abzentrifugieren wurde das Pellet in 100 µl Fixierlösung mit 4 % Paraformaldehyd resuspendiert und für 60 min in dunkler Umgebung bei RT inkubiert. Die fixierten Zellen konnten nun bei 4 °C im Kühlschrank gelagert oder direkt mittels Durchflusszytometrie

gezählt werden. Hierfür wurden je 10 µl fixierte Zellen mit 2 ml MilliQ in einer 5 ml Probenröhre 1:200 verdünnt und anschließend im Zytometer ausgezählt. Zur Kontrolle wurde stichprobenartig aus unterschiedlichen MSCs je 100 µl entnommen und auf Selektionsplatten mit 100 mg/ml Sulfadiazin, 150 mg/ml Spectinomycin, 20 mg/ml Tetracyclin, sowie 20 mg/ml Streptomycin zur Selektion ausplattiert. Diese wurden bei 30 °C bebrütet und nach 24 h und 48 h auf Wachstum geprüft. Ausgehend von den MHKs der Stämme wurde ein erster Konzentrationsbereich der jeweiligen Substanz abgedeckt und in nachfolgenden Experimenten weiter eingegrenzt. Unterhalb von 0,5 mg/ml wurde zunächst in Verdünnungsschritten von 1:10 die Konzentration verändert, so dass eine typische Konzentrationsreihe 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml etc. umfasste. Oberhalb von 0,5 mg/ml wurden zu Beginn die Konzentrationsreihen wie in einer MHK gestaltet. Wie z. B. 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml, 8, mg/ml 16 mg/ml, 32 mg/ml etc. Nach der ersten groben MSC wurde die genaue Konzentration in diesem Bereich in weiteren Experimenten in Einer-Schritten, also z. B. 15 ng/ml, 14 ng/ml, 13 ng/ml, 12 ng/ml, 11 ng/ml, 10 ng/ml, 9 ng/ml etc. ermittelt

## 2.26 Durchflusszytometrie

Die Bakterien wurden in dieser Arbeit entweder mit einem Beckman Coulter CytoflexS mit der Software CytExpert Version 1.2 oder mit einem BD LSRFortessa mit der Software BD FACSDiva Version 8.0.1 gezählt. Bei beiden Geräten handelt es sich um Durchflusszytometer mit hydrodynamischer Fokussierung. Die Zellen werden bei diesem Verfahren mit einem Volumenstrom nach dem Prinzip der Laminarströmung vereinzelt. Im Beispiel des CytoflexS diente A. dest. als Hüllstrom. Die fixierten Bakterien wurden von dem entsprechenden Gerät mittels einer feinen Nadel aus einem 5 ml Probenröhrchen entnommen. Durch den Einsatz eines Durchflusszytometers können in kurzer Zeit viele Zellen gezählt werden. Der Durchschnitt liegt je nach Gerät bei ca. 10.000 Zellen pro Minute. Die gewonnenen Ergebnisse werden typischerweise in einem Dotplot dargestellt. Aus der Kombination der drei Informationen der Detektoren FSC, SSC und der Fluoreszenz konnten die Zellzahlen ermittelt werden. SCC und FSC dienten darüber hinaus noch der Kontaminationskontrolle, da sich die beiden Bakterienstämme nur durch das jeweils eingesetzte Fluorophor unterschieden.

#### 2.27 Wachstumskurven

Die Wachstumskurven für diese Arbeit wurden einerseits mit dem Plattenlesegerät Tecan Infinite©200PRO mit der Software Tecan i-control Version 2.0.10.0 angefertigt. Je Bakterienstamm wurde eine Übernachtkultur in 5 ml MH bei 37 °C und 170 rpm herangezogen. Von dieser Vorkultur wurde, wie beim Mikrodilutionstest durch Verdünnen ein

Inokulum mit einer Zellzahl von ca. 5x10<sup>5</sup> Zellen erzeugt. Je Stamm wurden drei Näpfchen mit je 100 µl Bakteriensuspension und 100 µl frischem MH-Medium befüllt. Zur Kontrolle wurde in mindestens ein Well nur 200 µl frisches MH-Medium pipettiert. Nach dem Versiegeln der Platte mit einem Polyesterfilm wurde diese für 24 h im Plattenlesegerät bei 30 °C inkubiert. Die optische Dichte wurde alle drei Minuten bei 600 nm gemessen und die Platte in der Zwischenzeit geschüttelt. Nach dem gleichen Verfahren wurden auch Wachstumskurven mit LB-Medium statt MH angefertigt.

Andererseits wurden auch Wachstumskurven über 4 h in 500 ml Erlenmeyerkolben mit LB-Medium angefertigt. Hierfür wurde eine Übernachtkultur in 5 ml LB-Medium bei 37 °C und 170 rpm angezogen und damit 200 ml frisches, vorgewärmtes LB-Medium in einem entsprechenden Erlenmeyerkolben inokuliert. Die Kolben wurden für 4 h bei 180 rpm im Schüttelwasserbad SW22 bei 30 °C inkubiert. Die Gefäße wurden mit einem Wattestopfen und Aluminiumfolie verschlossen. Es wurde jede Stunde 1 ml entnommen und im Photometer UviLine 9400 bei 600 nm gegen 1 ml steriles LB-Medium vermessen.

## 2.28 Bestimmung des Spa-Typs

Bei der Bestimmung des Spa-Typs werden *S. aureus* Isolate durch die Sequenzierung der so genannten X-Region des *Staphylococcus* Protein A (*spa*)-Gens klassifiziert. Diese Region besteht aus bis zu 16 Repeats, die je 24 bp umfassen. Die Auswertung findet mittels eines Programms (Ridom Staph Type) und einer Datenbank (Ridom Spa Server) statt. Der spa-Typ ergibt sich aus den verschiedenen Repeats und ihrer Reihenfolge (Koreen et al., 2004).

## 2.29 MLST-Typisierung

Bei der MLST-Typisierung wird ein Isolat anhand der Sequenz von sieben House-Keeping Genen charakterisiert (Spratt et al., 1998). Bei S. aureus werden hierfür Teile der sieben folgenden Gene verwendet: arcC (Carbamat-Kinase); aroE (Shikimat Dehydrogenase); glpF (Glycerin-Kinase); gmk (Guanylat-Kinase); pta (Phosphat-Acetyltransferase); tpi (Triosephosphat-Isomerase) und (AcetylCoenzymA-Acetyltransferase). Die yqi entsprechenden Gene wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Für die PCR wurden die passenden Primer aus Tabelle 8 verwendet. Wenn bereits das volle Genom sequenziert vorlag, wurde mittels der Primer aus Tabelle 8 in der Software Geneious direkt die entsprechende Sequenz ermittelt. Die Auswertung erfolgte, wie in Tabelle 11 zu sehen, je nach Art mit MLST-Home oder MLST-1.8

#### 2.30 APIStaph -Test

Der Apistaph-Test dient u. a. der Identifikation von Mikroorganismen mittels biochemischer Standard- und Fermentationsreaktionen innerhalb der Gattung *Staphylococcus*. Für den Test

wurden Kolonien von einer am Vortag ausgestrichenen und ÜN inkubierten Columbia Agar Platte verwendet. Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und ausgewertet.

#### 2.31 Verwendete Online-Tools und Software

Tabelle 11. Verwendete Online-Tools oder Software (Stand 30.09.2020) und deren Verwendung in dieser Arbeit

| BD FACSDiva Version 8.0.1  Blast http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/  CARD http://card.mcmaster.ca/ Clustal W2 http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/  CRISPRfinder https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/ CytExpert Version 1.2  EMBOSS Needle http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html Proteine  ExPASy http://web.expasy.org/translate/ flexAnalysis 2.0  MLST-Home (Stand November 2016) http://saureus.mlst.net  MLST-1.8 (Stand November 2016) http://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/   | Name des Online-Tools und dessen Verlinkung                  | Verwendung                 |
|--|--|----------------------------|
| Blast http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/  CARD http://card.mcmaster.ca/ Clustal W2 http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/  CRISPRfinder https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/ CytExpert Version 1.2  EMBOSS Needle http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html ExPASy http://web.expasy.org/translate/ flexAnalysis 2.0  Geneious 10.2.3 http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/ MLST-Home (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  Vorhersage von kurzen Sequenzvergleiche Norhersage von kurzen sich wiederholenden Abschnitten (CRISPR)  Bedienung des Beckman Coulter CytoflexS  Sequenzvergleiche: Nukleotide Proteine  Translatieren  Translatieren  Bioinformatik Software zur Sequenzanalyse  MLST-Typisierung  MLST-Typisierung | BD FACSDiva Version 8.0.1                                    | Bedienung des BD           |
| http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/  CARD  http://card.mcmaster.ca/  Clustal W2  http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/  CRISPRfinder  https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/  CytExpert Version 1.2  EMBOSS Needle  http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html  http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html  ExPASy  http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html  ExPASy  http://web.expasy.org/translate/  flexAnalysis 2.0  Geneious 10.2.3  http://www.geneious.com/  Plugin Mauve (Darling et al., 2010)  http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  |  | LSRFortessa                |
| CARD http://card.mcmaster.ca/ Clustal W2 http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/  CRISPRfinder https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/ CytExpert Version 1.2  EMBOSS Needle http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html ExPASy http://web.expasy.org/translate/ flexAnalysis 2.0  Auswertung von MALDI-TOF-MS-Spektren  Geneious 10.2.3 http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016) MLST-Typisierung  MLST-Typisierung  MLST-Typisierung   | Blast  | Sequenzanalyse             |
| http://card.mcmaster.ca/ Clustal W2 http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/  CRISPRfinder https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/ CytExpert Version 1.2  EMBOSS Needle http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html  ExPASy http://web.expasy.org/translate/  flexAnalysis 2.0  Auswertung von MALDI- TOF-MS-Spektren  Geneious 10.2.3 http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016) http://saureus.mlst.net  MLST-Typisierung  | http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/                               |                            |
| Clustal W2 http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/  CRISPRfinder https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/  CytExpert Version 1.2  EMBOSS Needle http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html Proteine  ExPASy http://web.expasy.org/translate/  flexAnalysis 2.0  Auswertung von MALDI- TOF-MS-Spektren  Geneious 10.2.3 http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016) MLST-Typisierung  MLST-Typisierung  MLST-Typisierung  | CARD   | Vorhersage von             |
| http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/  CRISPRfinder https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/  CytExpert Version 1.2  EMBOSS Needle http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html Proteine  ExPASy http://web.expasy.org/translate/  flexAnalysis 2.0  Geneious 10.2.3  Requenting des Beckman Coulter CytoflexS  Sequenzvergleiche: Nukleotide Proteine  Translatieren  Auswertung von MALDI-TOF-MS-Spektren  Geneious 10.2.3  Bioinformatik Software zur Sequenzanalyse  Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  MLST-Typisierung  | http://card.mcmaster.ca/                                     | Resistenzgenen             |
| CRISPRfinder https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/ https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/  CytExpert Version 1.2  EMBOSS Needle http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html  ExPASy http://web.expasy.org/translate/  flexAnalysis 2.0  Geneious 10.2.3 http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  Vorhersage von kurzen sich wiederholenden Abschnitten (CRISPR)  Bedienung des Beckman Coulter CytoflexS  Sequenzvergleiche: Nukleotide Proteine  Proteine  Proteine  Auswertung von MALDI- TOF-MS-Spektren  Bioinformatik Software zur Sequenzanalyse  MLST-Typisierung  MLST-Typisierung  | Clustal W2   | Sequenzvergleiche          |
| https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/  CytExpert Version 1.2  EMBOSS Needle http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html Proteine  ExPASy http://web.expasy.org/translate/  flexAnalysis 2.0  Geneious 10.2.3 http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016) MLST-Typisierung  sequenzung des Beckman Coulter CytoflexS  Sequenzvergleiche: Nukleotide Proteine Proteine  Translatieren  Auswertung von MALDI- TOF-MS-Spektren  Sequenzanalyse  Bioinformatik Software zur Sequenzanalyse  MLST-Typisierung  | http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/                    |                            |
| CytExpert Version 1.2  EMBOSS Needle http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html Proteine  ExPASy http://web.expasy.org/translate/ flexAnalysis 2.0  Geneious 10.2.3 http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016) MLST-Typisierung  Abschnitten (CRISPR) Bedienung des Beckman Coulter CytoflexS  Sequenzergleiche: Nukleotide Proteine Translatieren  Auswertung von MALDI- TOF-MS-Spektren Sequenzanalyse  Bioinformatik Software zur Sequenzanalyse  | CRISPRfinder   | Vorhersage von kurzen      |
| CytExpert Version 1.2  EMBOSS Needle http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html  ExPASy http://web.expasy.org/translate/  flexAnalysis 2.0  Geneious 10.2.3  Hup://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  Bedienung des Beckman Coulter CytoflexS  Sequenzvergleiche: Nukleotide Proteine  Translatieren  Auswertung von MALDI- TOF-MS-Spektren  Bioinformatik Software zur Sequenzanalyse  MLST-Typisierung  MLST-Typisierung   | https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/                  | sich wiederholenden        |
| EMBOSS Needle http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html  ExPASy http://web.expasy.org/translate/  flexAnalysis 2.0  Auswertung von MALDI-TOF-MS-Spektren  Geneious 10.2.3 http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016) http://saureus.mlst.net  MLST-Typisierung  MLST-Typisierung   |  | Abschnitten (CRISPR)       |
| EMBOSS Needle http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html Proteine  ExPASy http://web.expasy.org/translate/  flexAnalysis 2.0 Auswertung von MALDI-TOF-MS-Spektren  Geneious 10.2.3 http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016) MLST-Typisierung  MLST-Typisierung  MLST-Typisierung   | CytExpert Version 1.2  | Bedienung des Beckman      |
| http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html  ExPASy http://web.expasy.org/translate/  flexAnalysis 2.0  Geneious 10.2.3 http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016)  MLST-1.8 (Stand November 2016)  Nukleotide Proteine  Auswertung von MALDI- TOF-MS-Spektren  Bioinformatik Software zur Sequenzanalyse  MLST-Typisierung  MLST-Typisierung   |  | Coulter CytoflexS          |
| http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html Proteine  ExPASy http://web.expasy.org/translate/  flexAnalysis 2.0     Auswertung von MALDI-TOF-MS-Spektren  Geneious 10.2.3     Bioinformatik Software zur http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016) http://saureus.mlst.net  MLST-1.8 (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  | EMBOSS Needle  | Sequenzvergleiche:         |
| ExPASy http://web.expasy.org/translate/  flexAnalysis 2.0 Auswertung von MALDI- TOF-MS-Spektren  Geneious 10.2.3 http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016) http://saureus.mlst.net  MLST-1.8 (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  | http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html | Nukleotide                 |
| http://web.expasy.org/translate/  flexAnalysis 2.0  Auswertung von MALDI- TOF-MS-Spektren  Geneious 10.2.3  http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010)  http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  MLST-1.8 (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  | http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/index.html      | Proteine                   |
| flexAnalysis 2.0  Auswertung von MALDI- TOF-MS-Spektren  Bioinformatik Software zur  http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  MLST-Typisierung  MLST-Typisierung  | ExPASy   | Translatieren              |
| TOF-MS-Spektren  Geneious 10.2.3  http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010)  http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016)  http://saureus.mlst.net  MLST-1.8 (Stand November 2016)  MLST-Typisierung   | http://web.expasy.org/translate/                             |                            |
| Geneious 10.2.3  http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010)  http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016)  http://saureus.mlst.net  MLST-1.8 (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  MLST-Typisierung  | flexAnalysis 2.0   | Auswertung von MALDI-      |
| http://www.geneious.com/ Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016) http://saureus.mlst.net  MLST-1.8 (Stand November 2016)  MLST-Typisierung   |  | TOF-MS-Spektren            |
| Plugin Mauve (Darling et al., 2010) http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016) http://saureus.mlst.net  MLST-1.8 (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  | Geneious 10.2.3  | Bioinformatik Software zur |
| http://darlinglab.org/mauve/  MLST-Home (Stand November 2016)  http://saureus.mlst.net  MLST-1.8 (Stand November 2016)  MLST-Typisierung   | http://www.geneious.com/                                     | Sequenzanalyse             |
| MLST-Home (Stand November 2016)  http://saureus.mlst.net  MLST-1.8 (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  MLST-Typisierung   | Plugin Mauve (Darling et al., 2010)                          |                            |
| http://saureus.mlst.net  MLST-1.8 (Stand November 2016)  MLST-Typisierung  | http://darlinglab.org/mauve/                                 |                            |
| MLST-1.8 (Stand November 2016) MLST-Typisierung  | MLST-Home (Stand November 2016)                              | MLST-Typisierung           |
| , , ,  | http://saureus.mlst.net                                      |                            |
| http://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/   | MLST-1.8 (Stand November 2016)                               | MLST-Typisierung           |
|  | http://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/                         |                            |

| MOTIFfinder  | Vorhersage von             |
|--|----------------------------|
| https://www.genome.jp/tools/motif/                   | Sequenzmotiven             |
| Myla™  | Auswertung von MALDI-      |
|  | TOF-MS-Spektren und        |
|  | Speziesidentifikation im   |
|  | Vitek-System               |
| NCBI (Altschul et al., 1990)                         | Sequenzanalyse             |
| http://www.ncbi.nlm.nih.gov/                         | Sequenzvergleiche          |
| NEBioCalculator                                      | Berechnung von             |
| https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation          | Ligationsansätzen          |
| ORFfinder  | Vorhersage von             |
| http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/               | OpenReadingFrames          |
|  | (ORF)                      |
| ProtParam  | Berechnung von             |
| http://web.expasy.org/protparam/                     | Molekulargewichten der     |
|  | Proteine                   |
| Primer3 tool   | Entwerfen von Primern      |
| http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi |                            |
| PSORT  | Vorhersage der             |
| http://www.psort.org/                                | Lokalisation von Proteinen |
|  | in der Zelle               |
| Resfinder 3.2  | Vorhersage von             |
| https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/           | Resistenzgenen             |
| Ridom Staph Type                                     | Spa-Typisierung            |
| http://www.ridom.de/staphtype/index.shtml            |                            |
| Swiss-Model  | 3D-Modellierung von        |
| https://swissmodel.expasy.org/interactive            | Proteinen                  |
| VirulenceFinder 2.0                                  | Vorhersage von             |
| https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/     | Virulenzgenen              |

## 3. Ergebnisse

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle durchgeführten MALDI-TOF-MS-Messungen durch direkte Applikation des zu untersuchenden Zellmaterials auf das MALDI-Target erzeugt. Metalle und ihre Verbindungen wie z. B ZnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O werden im Folgenden vereinfacht als Zinksulfat oder Zink bezeichnet, für den vollständigen Namen und die ausführliche Formel siehe Kapitel 2.1. In Alignments sind die Aminosäuren und Nukleobasen im Einbuchstabencode dargestellt.

## 3.1 Evaluation der Anforderungen an das erstrebte Testsystem

Geplant war die Konstruktion eines Testsystems zur Evaluation von MSCs im HyReKA-Verbund. Es sollten zwei farblich markierte gramnegative Stämme jeweils abwechselnd ein Resistenzplasmid tragen, um in Kompetitionsexperimenten zu prüfen, bei welcher Inhibitorkonzentration sich der plasmidtragende Stamm durchsetzen kann. Anschließend sollten diese im Labor erzeugten Werte mit den tatsächlich im Abwasser gefundenen Werten verglichen werden, um eine erste Aussage treffen zu können, ob eine Selektion von resistenten Stämmen im Abwasser stattfinden könnte oder nicht.

Für das angestrebte Testsystem wurde ein Modellorganismus gesucht, der folgende Kriterien möglichst gut abbildete: Das gesuchte Bakterium sollte gramnegativ sein und im Zuge des One Health Ansatzes die Bereiche Umwelt, Abwasser, nosokomiale Infektionen und Veterinärmedizin, sowie deren Resistome, gut repräsentieren. Dabei war es wichtig, dass der Organismus ubiquitär und damit sowohl im Krankenhaus, im Abwasser, im Tierstall und in der Umwelt vorkommt. Der Bakterienstamm sollte für die Arbeit im Labor geeignet und mit den üblichen Nährmedien und Laborgerätschaften anzüchtbar sein. Eine niedrige Risikogruppe nach der Biostoffverordnung war gewünscht. Auch wenn für diese Arbeit eine gentechnische Anlage mit der Sicherheitsstufe 2 zu Verfügung stand, ist ein geringeres Risiko für die Arbeit und Reproduzierbarkeit immer zu bevorzugen. Für die angestrebten gentechnischen Arbeiten wurde ein möglichst gut zu transformierender Stamm gesucht. Außerdem musste eine Möglichkeit gefunden werden, die Stämme zu unterscheiden und die Bakterien zählen zu können.

Die Entscheidung welcher Modellorganismus für das aufzubauende Testsystem am besten geeignet war, fiel auf *A. baylyi* BD413. Dieses Bakterium ist natürlich kompetent und damit sehr gut zu transformieren (Barbe et al., 2004; Ellision et al., 2008; Palmen et al., 1993; Palmen et al., 1997; Stuanis et a., 2014). Als R1 Organismus darf mit ihm in jedem Labor ab der niedrigsten Sicherheitsstufe 1 gearbeitet werden. Er ist gut für die Arbeit im Labor geeignet, da er z. B. auf den Standartmedien LB und MH kultivierbar ist und bei den üblichen

37°C wächst. *A. baylyi* BD413 ist ein Modellorganismus für *A. baumannii* und erfüllt damit die gestellten Ansprüche an den Lebensraum. Außerdem gilt *A. baumannii* als einer der wichtigsten Erreger in der Human- und Veterinärmedizin (Nocera et al., 2021). Er gehört als Teil der ESKAPE Erreger zu den wichtigsten resistenten, nosokomialen, bakteriellen Pathogenen (Jadimurthy et al., 2022; Mulani et al., 2019). Da sowohl *A. baumannii* als auch *A. baylyi* ubiquitär vorkommen, sind sie nicht so eingeschränkt in ihrer Aussagekraft, wie z. B. das übliche *E. coli*-Modellsystem, welches typischerweise auf den Verdauungstrakt beschränkt ist. *A. baumannii* ist ein Umweltkeim, der sich aber auch sehr gut an die Bedingungen in Krankenhäusern angepasst hat. Er gehört zu den multiresistenten Erregern, die nicht nur resistent gegen die üblichen AB sein, sondern auch eine Panresistenz ausbilden können (Wong et al, 2017).

Um viele Zellen automatisiert zählen zu können, wurde ein Durchflusszytometer eingesetzt. Dementsprechend wurden zur Markierung der Stämme zwei Fluorophore gesucht, die möglichst verschiedene Spektren aufweisen, gut mit den handelsüblichen Zytometern und deren Lasern kompatibel sind, kräftig leuchten, mit ihren Spektren nicht im Bereich der Autofluoreszenz liegen und eine möglichst ähnliche metabolische Last ausüben. Da laut Literatur Grün und Rot ideal in Zweifarbexperimenten sind (Bevis et al., 2002), fiel die Wahl auf GFP (GenBank: AAA27721.1) und mCherry (GenBank: PWI63952.1). Beide erfüllen die gesetzten Kriterien möglichst gut, insbesondere deshalb, weil die entsprechenden Gene sich nur um 6 bp in ihrer Länge unterscheiden. Da mCherry ein rot fluoreszierender Farbstoff ist, befindet er sich mit seinem Wellenlängenspektrum weit außerhalb der üblichen bakteriellen Autofluoreszenzen, um eine Überschneidung zu vermeiden (Ramson et al., 2015). Auch GFP ist laut Literatur bei den Autofluoreszenzen von Acinetobacter spp. unbedenklich (Frickmann et al., 2011, Godeux et al., 2018).

Für die eigentlichen Experimente wurde neben dem Modellorganismus noch ein natürliches Resistenzplasmid gesucht. Dieses sollte möglichst viele Resistenzen vermitteln und ein größtmögliches Wirtsspektrum aufweisen. Dabei war für die Fragestellung wichtig, dass das Plasmid nicht während der Experimente von einem Stamm zum anderen übertragen wird. Die Wahl fiel nach intensiver Suche auf das natürliche Resistenzplasmid pHHV216. Es wurde von Heuer et al., 2009 aus Gülle isoliert und ist sehr stabil in *A. baylyi* BD413. Obwohl es mit über 58 kb eine substanzielle metabolische Last auf die Zelle ausübt, wird es dennoch in *A. baylyi* BD413 auch ohne Selektionsdruck für mehr als 100 Generationen stabil propagiert (Heuer et al., 2009). Es vermittelt vier Resistenzen gegen Sulfonamide, Tetracyclin, Chloramphenicol und Streptomycin/Spectinomycin. Allerdings besitzt es *tra* Gene und wurde im Labor auch per Konjugation von *E. coli* J53 auf *A. baylyi* BD413

übertragen. Eine direkte Übertragung innerhalb des MSC-Experiments konnte also nicht ausgeschlossen werden.

## 3.2 Konstruktion der Genkassetten für Acinetobacter baylyi

Wie in Abbildung 13 zu sehen, enthalten die Genkassetten entweder das Fluorphor GFP oder mCherry, um die Stämme unterscheiden zu können. Vor dem Fluoreszenzgen sitzt jeweils der pT5x Bakteriophagenpromotor aus dem Plasmid pEPSA5 mit einer entsprechenden ribosomalen Bindestelle (RBS), um eine dauerhafte und starke Expression zu garantieren. Hinter dem Fluoreszenzgen liegt noch eine Resistenzkassette für Spectinomycin. Sie bringt ihre eigene TATA-Box und RBS mit und kodiert eine Aminoglykosid-Nukleotidyl-Transferase des Typ Ia [ANT(9)-la] (ANT(9))(Kleinert et al., 2017; Ramirez et al., 2010). Die Resistenzkassette für Spectinomycin entstammt ursprünglich S. aureus und erlaubt die Selektion nach erfolgreicher Transformation (Dissertation Kleinert, 2015). Die Restriktionsschnittstellen BamHI und KpnI am Anfang und am Ende der Zweck gesamten Genkassette dienen dem weitere Genfragmente Expressionskassette ligieren zu können. Die beiden Konstrukte für GFP und mCherry wurden von der Firma Baseclear (BaseClear B.V., Leiden in den Niederlanden) auf die Codonverwendung von A. baylyi angepasst und de novo synthetisiert. Fluoreszenzkassetten für GFP und mCherry sind in Abbildung 13 dargestellt und ihre Nukleotidsequenzen befinden sich im Anhang 9.3.

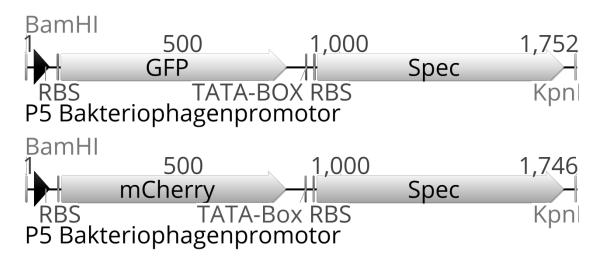


Abbildung 13:Die konstruierten Genkassetten mit dem Spectinomycin Resistenzgen (Spec) und entweder dem Fluorophor GFP oder mCherry. Die Kassette ist 1746 bzw. 1752 Basenpaare (bp) lang und besitz an ihren Enden jeweils eine BamHI- oder KpnI-Restriktionsschnittstelle. Das Fluoreszenzgen steht in beiden Konstruktionen jeweils unter der Kontrolle des pT5x (P5) Bakteriophagenpromotors aus dem Vektor pEPSA5. Zur besseren Übersicht ist die Position der TATAAT(TATA)-Box des Promotors der Spectinomyinresistenz eingezeichnet, genauso wie die ribosomalen Bindestellen (RBS) vor den beiden Genen

Neben den beiden hier beschriebenen Genkassetten wurde mittels verschiedener Vektoren versucht die Fluorophore in *A. baylyi* BD413 zu transformieren. Hierfür wurden verschiedene

Plasmide erzeugt und auch unterschiedliche Bakterien ausprobiert. Unter anderem kamen die Plasmide pIMAY und pEPSA5 zum Einsatz. Als potentielle Wirte wurden sowohl Staphylococcus carnosus, S. aureus als auch verschiedene E. coli, wie z.B. E. coli Gold eingesetzt. Aber es gelang weder unserer Arbeitsgruppe noch der Firma Baseclear (BaseClear B.V., Leiden in den Niederlanden). Vermutlich liegt das daran dass der verwendete Promotor pT5x sehr aktiv ist. Normalerweise steht er unter der Kontrolle eines Repressors, wie z.B. xylR, in pEPSA5. In diesem Konstrukt gibt es allerdings keinen Repressor für den sehr starken Promotor und in Verbindung mit einem Multi-Copy-Plasmid könnte es zu toxischen Konzentrationen von GFP und mCherry führen und einer erfolgreichen Transformation entgegenstehen (Ansari et al., 2016; Ganini et al., 2017). Eine Kontrollklonierung ohne RBS gelang auf Anhieb (pers. Mitteilung Bierbaum) und auch der Firma Baseclear gelang die Erzeugung eines Klons, der die RBS teilweise deletiert hatte. Obwohl es sich bei pIMAY bereits um ein Low-Copy-Plasmid handelt, waren es wohl dennoch zu viele Kopien gleichzeitig in einer Zelle, wodurch toxische Konzentrationen der Fluorophore entstanden sein könnten. Die Lösung bestand darin, das Konstrukt direkt ins Genom von A. baylyi BD413 mittels natürlicher Kompetenz einzubringen, so dass nur ca. zwei Kopien gleichzeitig pro Zelle vorlagen.

## 3.3 Klonierung der Fluoreszenz-Gene in Acinetobacter baylyi BD413

Die in Abschnitt 3.2 beschriebenen Genkassetten für GFP (1752 bp) und mCherry (1746 bp) wurden jeweils in das Gen lipA des Stammes A. baylyi BD413 kloniert. Die Kassetten wurden hierfür beide mit den Primern BKon\_for und Spec\_rev2 amplifiziert, sowie die beiden flankierenden Fragmente von lipA mit den Primern LipA1 for und LipA1 rev2, bzw. mit LipA2\_for3 und LipA2\_rev. Als Template dienten dabei die von Baseclear de novo synthetisierte Genkassetten und aufgereinigte genomische DNA von A. baylyi BD413. Die beiden Fragmente von lipA sorgten dabei für eine punktgenaue Integration der Kassette in gewünschte Gen. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden, vorrausgegangenen Verdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI, ligiert. Die so entstandenen neuen Genkassetten mit 2735 und 2729 bp sind in Abbildung 16 zu sehen und ihre Sequenz ist im Anhang 9.4 hinterlegt. Für die eigentliche Transformation des Stammes wurden die aufgereinigten Ligationsprodukte per PCR mit den Primern LipA\_for und LipA2 rev vermehrt. Unter Ausnutzung der natürlichen Kompetenz wurde A. baylyi BD413 direkt mit den aufgereinigten PCR-Produkten transformiert und auf LB-Agar mit 150 mg/l Spectinomycin ÜN bebrütet. Die erfolgreichen Transformanten A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry konnten am nächsten Tag neben dem Wachstum auf den Selektionsplatten anhand der Färbung ihrer Kolonien bereits mit bloßem Auge ausgewählt werden. Zusätzlich wurde ihre Fluoreszenz unter UV-Licht bei 305 nm überprüft. Die

unterschiedliche Koloniefärbung und die Fluoreszenz sind in Abbildung 14 und Abbildung 15 dargestellt. Die richtige Integration der Genkassette ins Genom der beiden Stämme wurde mit Hilfe der beiden Primer LipA\_for und LipA2\_rev überprüft.

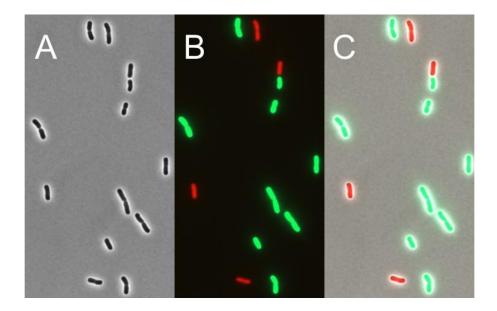


Abbildung 14:Mikroskopische Aufnahmen einer Co-Kultur von *Acinetobacter baylyi* BD413 GFP und *A. baylyi* BD413 mCherry. Aufgenommen mit einem Axio Observer. Bild A zeigt die Zellen im Phasenkontrast. Abbildung B gibt die unterschiedliche Fluoreszenz der Bakterien wieder: das grün fluoreszierende Protein (GFP) leuchtet grün und mCherry rot. Legt man A und B übereinander erhält man die Kombination, die in Bild C zu sehen ist.

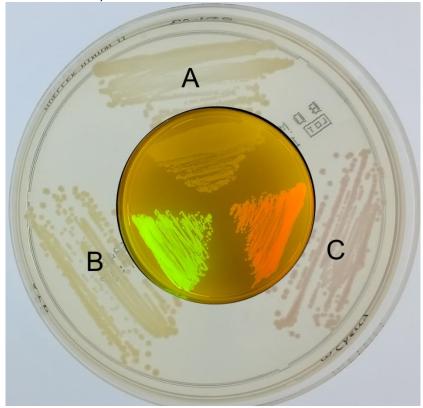


Abbildung 15: Gegenüberstellung der Stämme *Acinetobacter baylyi* BD413 (A), *A. baylyi* BD413 GFP (B) und *A. baylyi* BD413 mCherry (C) auf Müller-Hinton Agar. Um die Fluoreszenz zu verdeutlichen, wurden im mittleren Ausschnitt die Stämme flächig ausgestrichen und unter UV-Licht (305 nm) fotografiert.

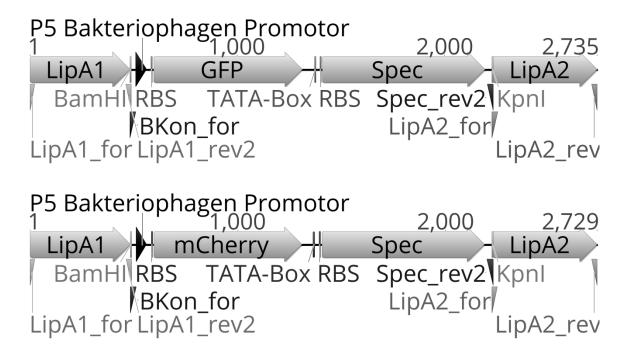


Abbildung 16: Gesamtkonstrukt der Genkassetten mit den beiden Fragmenten des Lipasegens *lip*A zur Integration in das Genom von *Acinetobacter baylyi* BD413. Die beiden Fluoreszenzgenkassetten aus Abbildung 13 werden vorne und hinten an den Restriktionsschnittstellen BamHI und KpnI um ein 500 Basenpaare (bp) großes Stück aus *lip*A ergänzt. Die gesamte Genkassette umfasste nun 2729 bzw. 2735 bp.

## 3.4 Selektion von spontanen multiresistenten Mutanten

Nachdem im vorherigen Kapitel erfolgreich die fluoreszenzmarkierten Stämme A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry erzeugt werden konnten, wurde nach weiteren passenden natürlichen Resistenzplasmiden gesucht. Hierfür wurden aus einem anderen Projekt aus dem HyReKA-Verbund (Müller et al., 2018) mögliche Isolate aus einer Stammsammlung ausgewählt. Die in dieser Arbeit verwendeten Isolate aus dieser Sammlung stammen direkt aus Abwasser, einer Kläranlage oder deren Vorfluter. Die Hauptkriterien für die Auswahl der Kandidaten waren, dass es sich um Carbapenemase positive Klebsiella oder Acinetobacter handeln musste, da diese eine hohe Chance auf ein kompatibles Resistenzplasmid boten. Für die Transformation per natürlicher Kompetenz in A. baylyi BD413 wurden für 10 min bei 100 °C aufgekochte Zellen des jeweiligen Donors verwendet. Die Auswertung der Transformation erfolgte auf Chromagar ESBL-Platten ÜN. Alle Kolonien, die cremefarben waren und unter UV-Licht entsprechende Fluoreszenz zeigten, wurden als erfolgreiche Transformanten angesehen. Von folgenden Donorstämmen konnten erfolgreich resistente Kolonien auf ESBL-Agar angezogen werden: CU777 ein A. baumannii-Stamm, sowie die beiden K. pneumoniae-Stämme CU652 und CU807. Alle drei Umwelt-Isolate waren sehr resistent, die beiden Klebsiellen wurden sogar als 4 MRGN eingestuft. CU777 wies eine OXA-51 Carbapenemase auf, die beiden K. pneumoniae zeigten jeweils sogar ein positives PCR-Ergebnis für eine NDM und eine OXA-48Carbapenemase (Müller et al., 2018). Die vollständige Liste der getesteten Antibiotika kann Tabelle 12 entnommen werden.

Tabelle 12: Antibiogramme der verwendeten Isolate aus Müller et al. (2018). Zusätzlich sind die per PCR-Test nachgewiesenen Carbapenemasen eingetragen. NDM steht für Neu-Delhi-Metallo-β-Lactamase. MHK bezeichnet die Minimale Hemmkonzentration.

| MHK [mg/l] (24h)               | CU652   | CU807  | CU777        |
|--------------------------------|---------|--------|--------------|
| Spezies                        | K. pneu | moniae | A. baumannii |
| Koloniefarbe auf ESBL-         | blau    | blau   | cremefarben  |
| Chromagar                      |         |        |              |
| Antibiotisch wirksame Substanz |         |        |              |
| Piperacillin/Tazobactam        | >64/4   | >64/4  | ≤4/4         |
| Cefotaxim                      | >2      | >2     | >2           |
| Ceftazidim                     | >128    | >128   | 8            |
| Imipenem                       | 4       | 4      | ≤1           |
| Meropenem                      | 8       | 32     | 1            |
| Ciprofloxacin                  | 2       | 1      | ≤0,25        |
| Colistin                       | 64      | 64     | ≤1           |
| Temocillin                     | >128    | >128   | >128         |
| Piperacillin                   | >16     | >16    | >16          |
| Ceftazidim/Avibactam           | >16/4   | >16/4  | 4/4          |
| Ceftolozan/Tazobactam          | >8/4    | >8/4   | ≤1/4         |
| Amikazin                       | >32     | >32    | ≤4           |
| Tigecyclin                     | 0,5     | 0,5    | ≤0,25        |
| Levofloxacin                   | 2       | 1      | ≤0,5         |
| Chloramphenicol                | >16     | >16    | >16          |
| Trimethoprim/Sulfamethoxazol   | >4/76   | >4/76  | ≤1/19        |
| Fosfomycin                     | ≤16     | 32     | >64          |
| Carbapenemase                  | NDM +   | OXA-48 | OXA-51       |
|                                |         |        | chromosomal  |

Für CU777 konnte die Kolonie *A. baylyi* BD413 mCherry 777 erfolgreich isoliert werden. Von CU652 ausgehend konnten die Stämme *A. baylyi* BD413 GFP 652 und *A. baylyi* BD413 mCherry 652 erzeugt werden. Die Stämme *A. baylyi* BD413 GFP 807 und *A. baylyi* BD413 mCherry 807 wurden von den Selektionsplatten von CU807 isoliert. Wie Tabelle 13 zu entnehmen ist, wurden die fünf Varianten von *A. baylyi* BD413 auf ihre Resistenz gegen verschiedene Antibiotika und Schwermetalle getestet.

Tabelle 13: Antibiogramme von verschiedenen *Acinetobacter baylyi* BD413 Varianten gegen diverse, antibiotisch wirksame Subtanzen. *A. baylyi* BD413 ist der Elternstamm für die folgenden Isolate: *A. baylyi* BD413 GFP 652, *A. baylyi* BD413 GFP 807, *A. baylyi* BD413 mCherry 652, *A. baylyi* BD413 mCherry 777 und *A. baylyi* BD413 mCherry807. Damit bei dem eingesetzten Antibiotikasalz oder Metallhydrat etc. nur der aktive Stoff in die Berechnung mit einfließt, wurde das Gewicht aller verwendeten Substanzen vor der Einwaage bereinigt. Nicht getestete Substanzen sind mit einem "-" gekennzeichnet. MHK bezeichnet die Minimale Hemmkonzentration. 3-APB steht für 3-Amino-Phenyl-Borat.

|   | Acinetobacter baylyi BD413 |       |        |       |         |        |
|---|----------------------------|-------|--------|-------|---------|--------|
| MHK [mg/l] (24h)  |                            | G     | FP     |       | mCherry |        |
| Antibiotisch wirksame<br>Substanz   |                            | 652   | 807    | 652   | 777     | 807    |
| Ciprofloxacin   | <0,0165                    | 0,5   | ≤0,25  | ≤0,5  | 0,25    | ≤0,25  |
| Levofloxacin  | ≤0,5                       | ≤0,5  | ≤0,5   | ≤0,5  | 0,031   | ≤0,5   |
| Amikacin  | ≤4                         | ≤4    | ≤4     | ≤4    | ≤4      | ≤4     |
| Colistin  | ≤1                         | ≤1    | ≤1     | ≤1    | ≤1      | ≤1     |
| Chloramphenicol   | ≤8                         | >16   | ≤8     | 16    | ≤8      | ≤8     |
| Fosfomycin  | 32                         | 64    | 64     | 64    | 16      | <16    |
| Tigecyclin  | ≤0,25                      | 0,5   | ≤0,25  | ≤0,25 | ≤0,25   | ≤0,25  |
| Trimethoprim/Sulfamethoxazol  | ≤1/19                      | ≤1/19 | ≤1/19  | ≤1/19 | 2/38    | ≤1/19  |
| Piperacillin  | ≤8                         | 16    | ≤8     | 16    | >16     | ≤8     |
| Piperacillin/Tazobactam   | ≤4/4                       | 8/4   | ≤4/4   | 8/4   | >64/4   | ≤4/4   |
| Cefotaxim   | >2                         | >2    | >2     | >2    | >2      | >2     |
| Ceftazidim  | 4                          | 16    | 8      | 16    | >128    | 8      |
| Ceftazidim/3-APB  | 4                          | 16    | 8      | 16    | >32     | 8      |
| Ceftazidim/Avibactam  | 4/4                        | 16/4  | 8/4    | 16/4  | >16/4   | 8/4    |
| Ceftolozan/Tazobactam   | ≤1/4                       | 2/4   | 2/4    | 2/4   | >8/4    | 2/4    |
| Imipenem  | 1                          | ≤1    | 1      | ≤1    | ≤1      | ≤1     |
| Meropenem   | ≤0,125                     | 2     | ≤0,125 | 0.5   | 2       | ≤0,125 |
| Meropenem/3-APB   | ≤0,25                      | 2     | ≤0,25  | 2     | 2       | ≤0,25  |
| Meropenem/EDTA  | ≤0,25                      | 2     | ≤0,25  | 2     | 0,5     | ≤0,25  |
| Temocillin  | 128                        | >128  | >128   | >128  | >128    | >128   |
| Clindamycin   | 2                          | -     | 8      | 64    | 64      | 8      |
| Tetracyclin   | 0,5                        | -     | 0,5    | 8     | 8       | 0,5    |
| Sulfadiazin   | 2                          | -     | >32    | 16    | 2       | 2      |
| Sulfamethoxazol   | 2                          | -     | -      | -     | >32     | -      |
| Benzalkoniumchlorid   | 2                          | _     | 4      | 8     | 8       | 4      |
| 3CdSO <sub>4</sub> x8H <sub>2</sub> O   | 16                         | 16    | 16     | 16    | 16      | -      |
| Cu(II)SO <sub>4</sub>   | 128                        | 128   | 128    | 128   | >256    | -      |
| ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O  | 64                         | 128   | 128    | 128   | 128     | -      |
| Pb <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> x3H <sub>2</sub> O | >512                       | >512  | >512   | >512  | >512    | -      |

Die in der Diagnostik üblichen Standardantibiotika wurden maschinell mit einem Vitek2- oder Mikronaut-System bearbeitet. Die klinisch eher ungebräuchlicheren AB und Schwermetalle wurden mit manuellen Antibiogrammen nach der Mikrodilutionsmethode angefertigt. Bei

einem Großteil der in Tabelle 13 getesteten Substanzen zeigten die Varianten keine oder nur um eine Stufe abweichende Werte von A. baylyi BD413. Deshalb werden im Folgenden nur die Substanzen näher betrachtet, bei denen die Varianten im Vergleich zu BD413 eine erhöhte Resistenz aufwiesen. Nach den Richtlinien der EUCAST 2021 zeigte keine der getesteten Varianten klinisch bedeutsame MHK-Werte, wobei in der Tabelle viele Antibiotika für Acinetobacter nicht bewertet werden. Hierfür wurden im Folgenden dann die PK/PD Grenzwerte verwendet. Die Varianten A. baylyi BD413 GFP 807, A. baylyi BD413 mCherry 777 und A. baylyi BD413 mCherry 807 zeigten bei Ciprofloxacin im Gegensatz zum Elternstamm BD413 15-fach erhöhte MHK-Werte, A. baylyi BD413 GFP 652 und A. baylyi BD413 mCherry 652 sogar 30-fach höhere Werte. Alle Varianten blieben mit höchstens 0,5 mg/l für A. baylyi BD413 GFP 652 jedoch weit unter der Schwelle von >2 mg/l für eine Resistenz gegen das Antibiotikum Ciprofloxacin. Bei Chloramphenicol zeigten A. baylyi BD413 GFP 652 und A. baylyi BD413 mCherry 652 eine mindestens doppelt so hohe MHK auf wie der Elternstamm und sind mit >16 mg/l als resistent anzusehen. Für Fosfomycin zeigten die drei Isolate A. baylyi BD413 GFP 652, A. baylyi BD413 mCherry 652 und A. baylyi BD413 GFP 807 mit 64 mg/l einen mindestens doppelt so hohen MHK-Wert als A. baylyi BD413 und gelten als resistent. Ebenfalls als resistenter gelten die Stämme A. baylyi BD413 GFP 652, A. baylyi BD413 mCherry 652 und A. baylyi BD413 mCherry 777 bezogen auf Piperacillin, denn dort zeigten sie mit 16 mg/l eine mindestens doppelt so hohe Schwelle für die Hemmung. Bei der Kombination von Piperacillin mit dem β-Lactamaseinhibitor Tazobactam hingegen, war nur noch A. baylyi BD413 mCherry 777 mit >64/4 mg/l als resistenter einzustufen. Die beiden anderen Varianten erreichten zwar immer noch eine doppelt so hohe MHK, blieben aber wie A. baylyi BD413 empfindlich gegen die Kombination der beiden Substanzen. Bei Cefotaxim war zwar bereits der Ursprungsstamm A. baylyi BD413 mit >2 mg/l resistent, aber auch alle Varianten behielten die Resistenz bei. Für Ceftazidim war A. baylyi BD413 hingegen wieder empfindlich, obwohl es sich bei beiden Stoffen um ein Cephalosporin der dritten Generation handelt. A. baylyi BD413 GFP 807 und A. baylyi BD413 mCherry 807 zeigten für Ceftazidim mit 8 mg/l einen doppelt so hohen MHK-Wert wie A. baylyi BD413, sind aber nur als intermediär einzustufen, denn erst ab einem Wert >8 mg/l gilt ein Stamm nach EUCAST 2021 als resistent gegen Ceftazidim. Mit 16 mg/l und damit einer 4-fach so hohen MHK erreichen A. baylyi BD413 GFP 652 und A. baylyi BD413 mCherry 652 diese Stufe und sind als resistent einzuordnen. A. baylyi BD413 mCherry 777 sticht mit einem mehr als 32-fach höheren MHK-Wert zu A. baylyi BD413 jedoch hervor und gilt ebenfalls als resistent gegenüber Ceftazidim. Bei der Kombination von Ceftazidim und 3-Amino-Phenyl-Borat (3-APB) handelt es sich um den Nachweis einer AmpC β-Lactamase. Wenn die MHK der Kombination gegenüber der MHK mit Ceftazidim alleine um ein 8-faches reduziert ist, kann von einer AmpC β-Lactamase ausgegangen

werden (Yagi et al., 2005). Bis auf A. baylyi BD413 mCherry 777 zeigte keines der getesteten Isolate einen Unterschied in der MHK und dieser auch nur eine 4-fache Reduktion des MHK-Wertes. Bei der Kombination von Ceftazidim mit dem β-Lactamaseinhibitor Avibactam überschritten A. baylyi BD413 GFP 652 und A. baylyi BD413 mCherry 652 mit 16/4 mg/l die Schwelle zu Resistenz von 8/4 mg/l. A. baylyi BD413 mCherry 777 zeigte mit >16/4 mg/l sogar noch eine gesteigerte Resistenz. Bei der Kombination Ceftolozan und Tazobactam zeigte nur A. baylyi BD413 mCherry 777 mit einer 4-fachen Steigerung eine Resistenz. Bei Meropenem zeigten A. baylyi BD413 GFP 652, A. baylyi BD413 mCherry 652 und A. baylyi BD413 mCherry 777 eine 16-fache Steigerung auf 2 mg/l, aber auch mit diesem gesteigerten MHK-Wert gelten sie wie die anderen Stämme als sensibel. Für eine Resistenz gegenüber Meropenem wäre ein Wert von >8 mg/l notwendig und davon sind alle hier getesteten Isolate weit entfernt. Auch bei Meropenem wurde mit dem Zusatz 3-APB wieder auf das Vorhandensein einer aktiven AmpC β-Lactamase gescreent. Die Kombination Meropenem mit dem Komplexbildner Ethylendiamintetraacetat (EDTA) dient dem Nachweis von Metallo-β-Lactamasen (Manoharan et al., 2010). Da mit der Kombination Ceftazidim/3-APB bereits eine aktive AmpC β-Lactamase ausgeschlossen wurde und bei keinem der Stämme eine Resistenz gegen Meropenem vorliegt, spielen diese beiden Substanzkombinationen keine Rolle. Bei Temocillin steigerte sich für alle Varianten der MHK-Wert von den intermediären 128 mg/l des Elternstammes zur Resistenz bei >128mg/l. Für Clindamycin zeigen A. baylyi BD413 GFP 807 und A. baylyi BD413 mCherry 807 eine Vervierfachung der MHK. Der MHK-Wert von A. baylyi BD413 mCherry 652 und A. baylyi BD413 mCherry 777 ist mit 64 mg/l sogar 32-fach höher als der von A. baylyi BD413. Bei den Werten von Tetracyclin übertraf A. baylyi BD413 mCherry 652 den Elternstamm um das 8-fache und A. baylyi BD413 mCherry 777 steigerte dies nochmal auf das 16-fache. Bei Sulfadiazin zeigte nur A. baylyi BD413 GFP 807 als einziger der Varianten ebenfalls eine 16fache Steigerung des MHK-Wertes im Gegensatz zu A. baylyi BD413. Mit dem anderen Sulfonamid, Sulfamethoxazol, wurden nur A. baylyi BD413 und A. baylyi BD413 mCherry 777 getestet, letzterer zeigte aber eine Steigerung der MHK um das 16-fache, bezogen auf den Wert von A. baylyi BD413. Für Benzalkoniumchlorid zeigten A. baylyi BD413 GFP 807 und A. baylyi BD413 mCherry 807 eine Verdoppelung, sowie A. baylyi BD413 mCherry 652 und A. baylyi BD413 mCherry 777 sogar eine Vervierfachung der MHK gegenüber A. baylyi BD413. Bei den Schwermetallen zeigte lediglich A. baylyi BD413 mCherry 777 bei Kupfer eine erwähnenswerte Steigerung des MHK-Wertes. Nach der artspezifischen Tabelle von EUCAST 2021 erreichte kein Stamm die für eine Resistenz notwendigen MHK-Werte bei den klinisch relevanten Antibiotika Ciprofloxacin, Colistin, Imipenem, Meropenem und der Kombination Sulfamethoxazol mit Trimethoprim. Sulfonamid von Gegen das Sulfamethoxazol alleine hingegen zeigte A. baylyi BD413 mCherry 777 einen stark erhöhten

MHK-Wert. Dies gilt ebenfalls für Clindamycin, Tetracyclin und Kupfer. Bei allen getesteten β-Lactamantibiotika und ihren Kombinationen mit Ausnahme der Carbapeneme zeigte sich *A. baylyi* BD413 mCherry 777 resistent. *A. baylyi* BD413 mCherry 807 wies lediglich gegen Temocillin eine zusätzliche Resistenz im Vergleich zu *A. baylyi* BD413 auf und zeigte bei Clindamycin und Ceftazidim leicht erhöhte MHKs. *A. baylyi* BD413 GFP 807 zeigte das gleiche Resistenzprofil, mit der Besonderheit, dass das Isolat noch zusätzlich gegen Fosfomycin resistent war und der MHK-Wert bei Sulfadiazin stark erhöht war. Auch *A. baylyi* BD413 GFP 652 und *A. baylyi* BD413 mCherry 652 zeigten die gleichen Resistenzen gegen Chloramphenicol, Fosfomycin, Piperacillin, Ceftazidim und Temocillin. Gegen Clindamycin, Tetracyclin, Sulfadiazin und Benzalkoniumchlorid wurde jedoch nur *A. baylyi* BD413 mCherry 652 getestet und dieser wies dort jeweils eine leichte Erhöhung der MHK auf. Bei Clindamycin zeigte sich sogar eine starke Steigerung des MHK-Wertes gegenüber *A. baylyi* BD413.

Bei der Auswertung der Antibiogramme fiel auf, dass die Varianten zwar zusätzliche Resistenzen im Vergleich zum Elternstamm zeigten, aber keiner der Stämme gegen die Carbapeneme Imipenem oder Meropenem resistent war, obwohl sie ein Carbapenemase-Resistenzplasmid bzw. –Gen aufgenommen haben sollten. Deshalb wurden alle Varianten mit den Primern, die bereits von Müller et al., 2018 zur Charakterisierung der Stammsammlung dienten, auf β-Lactamasen hin untersucht. Keiner der Stämme zeigte dabei ein Amplifikat für die PCR mit den Primern: OXA48\_for, OXA48\_rev, VIM\_for, VIM\_ref, NDM\_for, NDM\_ref. Damit konnte bestätigt werden, dass keine der erzeugten Varianten ein Resistenzplasmid mit Carbapenemase von einem Donor aufgenommen hatte. Der Verdacht lag nahe, dass die vorhandenen zusätzlichen Resistenzen auf Mutationen in den unterschiedlichen Stämmen zurückzuführen waren. Deshalb wurden die Mutanten *A. baylyi* BD413 mCherry 652, *A. baylyi* BD413 mCherry 777 und *A. baylyi* BD413 mCherry 807, wie in Abschnitt 3.6 zu sehen, sequenziert.

## 3.5 Agardiffusionstest mit Schwermetallen

Neben den Antibiogrammen im Mikrodilutionsverfahren in Abschnitt 3.8 wurden die entsprechenden Mutanten zusätzlich in einem Agardiffusionstest auf ihre Empfindlichkeit gegen Schwermetalle getestet. Die Hemmhofdurchmesser für die getesteten Cadmium-, Kupfer-, Zink- und Bleiverbindungen sind in Tabelle 14 zu sehen. Bei der getesteten Bleiverbindung Bleiacetat war bei allen Stämmen keinerlei Hemmung zu sehen. Nur *A. baylyi* BD413 mCherry 652 und *A. baylyi* BD413 mCherry 777 zeigten eine ganz leicht erhöhte Empfindlichkeit gegen Blei. Bei den anderen drei getesteten Schwermetallverbindungen zeigte zwar der Elternstamm eine Inhibierung, aber die getesteten Mutanten waren auch im gleichen Maße empfindlich. Im Agardiffusionstest mit Schwermetallen konnte keine

wesentliche Veränderung der Empfindlichkeit der Mutanten gegenüber dem Elternstamm *A. baylyi* BD413 festgestellt werden.

Tabelle 14: Hemmhofdurchmesser verschiedener Schwermetallverbindungen in einem Agardiffusionstest mit Ausstanzungen für die Stämme Acinetobacter baylyi BD413 GFP, A. baylyi BD413 GFP 652, A. baylyi BD413 GFP 807, A. baylyi BD413 mCherry, A. baylyi BD413 mCherry 652, A. baylyi BD413 mCherry 777, A. baylyi BD413 mCherry 80. Der Elternstamm A. baylyi BD413, die Varianten A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry wurden aufgrund der gleichen Werte zusammengefasst. Die Konzentrationen der Schwermetalle sind bereinigt und die Hemmhöfe in Millimeter (mm) abzüglich des 6 mm Durchmessers des Korkbohrers dargestellt.

|                                     |                  | A. baylyi BD413 |         |         |     |     |
|-------------------------------------|------------------|-----------------|---------|---------|-----|-----|
| Schwermetall                        | GFP / mCherry    | GFP             |         | mCherry |     |     |
|                                     | Of 1 / Inionerry | 652             | 807     | 652     | 777 | 807 |
| CdSO <sub>4</sub>                   | Her              | mmhofd          | urchmes | ser [mm | n]  | ı   |
| 10 mg/ml                            | 11               | 11              | 11      | 10      | 14  | 11  |
| 20 mg/ml                            | 15               | 18              | 16      | 18      | 17  | 16  |
| 30 mg/ml                            | 18               | 20              | 20      | 20      | 18  | 20  |
| 40 mg/ml                            | 19               | 21              | 21      | 22      | 24  | 21  |
| Pb(CH <sub>3</sub> OO) <sub>2</sub> |                  |                 |         |         |     |     |
| 10 mg/ml                            | 0                | 0               | 0       | 0       | 0   | 0   |
| 20 mg/ml                            | 0                | 0               | 0       | 0       | 0   | 0   |
| 30 mg/ml                            | 0                | 0               | 0       | 0       | 0   | 0   |
| 40 mg/ml                            | 0                | 0               | 0       | 3       | 3   | 0   |
| Cu(II)SO <sub>4</sub>               |                  |                 |         |         |     |     |
| 10 mg/ml                            | 0                | 0               | 0       | 0       | 0   | 0   |
| 20 mg/ml                            | 1                | 1               | 1       | 1       | 1   | 1   |
| 30 mg/ml                            | 2                | 2               | 2       | 2       | 3   | 2   |
| 40 mg/ml                            | 4                | 4               | 4       | 4       | 4   | 4   |
| ZnSO <sub>4</sub>                   |                  |                 |         |         |     |     |
| 10 mg/ml                            | 4                | 3               | 4       | 3       | 4   | 4   |
| 20 mg/ml                            | 6                | 5               | 5       | 6       | 6   | 5   |
| 30 mg/ml                            | 7                | 7               | 6       | 7       | 7   | 7   |
| 40 mg/ml                            | 8                | 8               | 9       | 8       | 8   | 9   |
|                                     |                  | 1               | 1       |         | 1   | 1   |

#### 3.6 Sequenzierung ausgewählter Stämme von Acinetobacter baylyi

Drei der in den vorausgegangenen Kapiteln beschriebenen spontanen Mutanten sollten vollständig sequenziert werden, um zu untersuchen ob ein Resistenzplasmid/-Gen aufgenommen wurde oder ob die festgestellten erhöhten Resistenzen auf Mutationen beruhen. Von A. baylyi BD413 mCherry 652, A. baylyi BD413 mCherry 777 und A. baylyi BD413 mCherry 807 wurde genomische DNA mit dem Epicentre Masterpure Complete DNA

and RNA Purification Kit von Lucigen nach Herstellerangaben isoliert, in einem MiSeg von Illumina sequenziert und de novo mit Geneious Vers. 10.2.3 assembliert. Als Vergleich diente das Genom von A. baylyi BD413 in der Datenbank (GenBank: CR543861). Ergab sich ein Unterschied zwischen WGS und Datenbank wurde zusätzlich die entsprechende Stelle im Elternstamm A. baylyi BD413 per PCR vervielfältigt und nach Sanger sequenziert, um Datenbankfehler auszuschließen. Wichtige Stellen wurden in den Mutantenstämmen mit der gleichen Methode überprüft. Hierfür wurde die gleiche genomische DNA und die folgenden Primer verwendet: LS\_for, LS\_rev, DPL\_for, DPL\_rev; ZdG1\_for, ZdG1\_rev, ZdG2 for, ZdG2\_rev, ZdG3\_for, ZdG3\_rev, ZdG4\_for, ZdG4\_rev, HP1\_for, HP1\_rev, HP2\_for, HP2 rev, ELF4 for, ELF4 rev, ABCT for, ABCT rev, BapA1 for, BapA1 rev, BapA2 for, BapA2\_rev, TGL\_for, TGL\_rev, HAMP\_for, HAMP\_rev, TetR\_for, TetR\_rev, GAF\_for, GAF\_rev. Die Veränderungen in den Genomen der drei Mutanten A. baylyi BD413 mCherry 652, A. baylyi BD413 mCherry 777 und A. baylyi BD413 mCherry 807 im Vergleich zu A. baylyi BD413 sind in Tabelle 15 dargestellt. Da die drei Mutanten auf dem Stamm A. baylyi BD413 mCherry basieren, hier aber mit dem Genom des Grundstammes A. baylyi BD413 verglichen werden, enthalten diese die mCherry Genkassette aus Abschnitt 3.2. Dieser Bereich wird mit den Primern LS for und LS rev abgedeckt und war bei allen drei sequenzierten Stämmen vollständig vorhanden. Die Teilsequenzierung bestätigte neben der WGS nochmals, dass die in Abschnitt 3.3 eingebaute Kassette am richtigen Ort sitzt. Dementsprechend ist die für die Fluoreszenz verantwortliche Genkassette in Tabelle 15 nicht aufgeführt, da hier nur die zusätzlichen Mutationen der unterschiedlichen Isolate dargestellt werden sollten.

Tabelle 15: Veränderungen in den Genomen der verschiedenen spontanen Mutanten von *Acinetobacter baylyi* BD413 nach Auswertung der Illumina-Sequenzierung. Das A steht für die Nukleobase Adenin, G für Guanin, C für Cytosin und T für Thymin. Die Abkürzung bp steht für Basenpaare. G→A stellt den Austausch einer Nukleobase durch eine andere dar, in diesem Fall wird ein G durch ein A im Genom ersetzt. AS steht für Aminosäuren. Markierte Änderungen wurden im Nachhinein durch PCR und Sequenzierung bestätigt (Holstein, 2021).

| Stelle im               | Mutation            | Effekt der Mutationen auf kodierte OpenReadingFrames, PCR- |
|-------------------------|---------------------|--|
| Genom                   | iviulation          | Ergebnisse   |
| A. bayly                | i BD413             |  |
| mChe                    | rry 652             |  |
| 1276195<br>-<br>1276223 | 29 bp<br>Deletion   | Keine, nicht durch PCR bestätigt (Holstein, 2021)          |
| 1356416<br>-<br>1364972 | 8556 bp<br>Deletion | 9 Gene fehlen, durch PCR bestätigt                         |
| 1771507                 | 73 bp               | Keine, nicht durch PCR bestätigt (Holstein, 2021)          |

| _        | Deletion       |  |
|----------|----------------|--|
| 1771579  | DOIGHOIT       |  |
|          |                |  |
| 2081567  | 11 bp          | (  |
| -        | Deletion       | Keine, nicht durch PCR bestätigt (Holstein, 2021)                  |
| 2081577  |                |  |
|          | i BD413        |  |
| mChei    | rry 777        |  |
| 713010   | 2 bp           | Leserahmenverschiebung, vorzeitiges Stoppcodon bei 478 AS statt    |
|          | Deletion       | 546 AS in Histidinkinase BfmS, durch PCR bestätigt                 |
|          |                | Basenaustausch von A zu G führt zu einem Aminosäureaustausch       |
| 1362849  | A→G            | vom Leucin zu Serin in einem Transkriptionsregulator der TetR/AcrR |
|          |                | Familie, AdeN, durch PCR bestätigt                                 |
| 2466908  | 69 bp          |  |
| -        | ·              | Keine, nicht durch PCR bestätigt (Holstein, 2021)                  |
| 2466977  | Deletion       |  |
| 2531011  | G→A            | Basenaustausch von G zu A, stille Mutation, durch PCR bestätigt    |
| 0000000  | 97 bp          | Main a minks downly DOD has still set (Halastain, 2004)            |
| 3239283  | Deletion       | Keine, nicht durch PCR bestätigt (Holstein, 2021)                  |
| A. bayly | <i>i</i> BD413 |  |
| mChei    | rry 807        |  |
| 531990-  | 17 bp          |  |
| 532006   | Deletion       | keine  |
| 1771492  | _              |  |
| -        | 68 bp          | keine  |
| 1771559  | Deletion       |  |
| 2296682  |                |  |
| _        | 4 bp           | keine  |
| 2296685  | Deletion       |  |
| 2662749  |                |  |
|          | 102 bp         | verkürztes hypothetisches Protein                                  |
| 2662850  | Deletion       | volkalization hypotholiconico i fotolii                            |
| 3238928  |                |  |
| 3230320  | 72 bp          | koina  |
| 2000000  | Deletion       | keine  |
| 3238999  |                |  |
| 3239382  | 4 bp           |  |
| -        | Deletion       | keine  |
| 3239385  |                |  |

| 3275343 | A→C | Basenaustausch von A zu C führt zu einem Aminosäureaustausch |
|---------|-----|--|
| 3273343 | A→C | von Phenylalanin zu Cystein in PBP3, durch PCR bestätigt     |

*A. baylyi* BD413 mCherry 652 weist vier Deletionen auf, wovon drei durch die PCR aber nicht bestätigt werden konnten. Die vierte Deletionen mit 8556 bp ist in Abbildung 17 dargestellt und sorgt für den teilweisen oder vollständigen Verlust der folgenden neun Gene: die letzten 427 von 1050 bp der N-Acetyl-Gamma-Glutamyl-Phosphat Reduktase, ein hypothetisches Protein, den ATP abhängigen Proteaseadapter *clpS*, die dazugehörige ATP Bindeinheit *clp*A, ein Protein aus der YnfA Familie, eine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase, die Ornithin-Carbamoyltransferase, einen Transkriptionsregulator der TetR/AcrR Familie, die ersten 1267 von 1550 bp des Stickstoffregulierungsproteins NR(I).

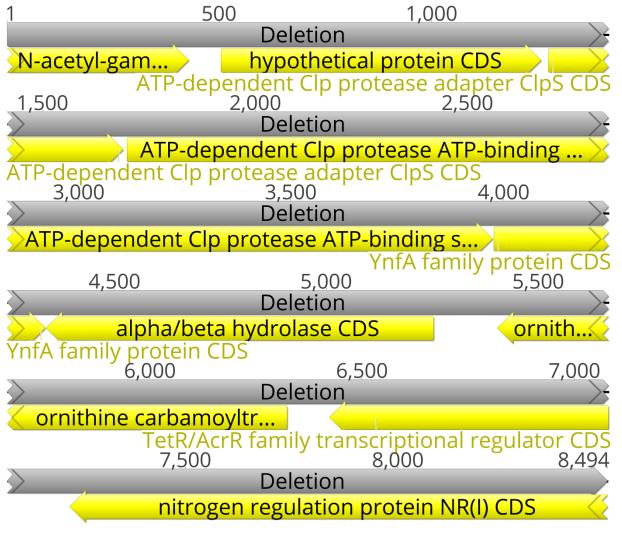


Abbildung 17: Deletion von 8494 Basenpaaren (bp) und die betroffenen Gene in *Acinetobacter baylyi* BD413 mCherry 652.

Bei *A. baylyi* BD413 mCherry 777 wurden in einer ersten Analyse zwei Punktmutationen und drei Deletionen festgestellt. Zwei Deletionen wurden nicht bestätigt und es hat nur die in Abbildung 18 dargestellte, 2 bp umfassende Deletion an der Stelle bei 713010 bp eine direkt sichtbare Konsequenz.

| BD413       | 1 GTGTTTAAACACAGTATTTTTTTGCGCATTTATGCAGGCTTGGTCGTTCT     | 50  |
|-------------|--|-----|
| AmCherry777 | 1 GTGTTTAAACACAGTATTTTTTTGCGCATTTATGCAGGCTTGGTCGTTCT     | 50  |
| BD413       | 51 GGTCATGTTGGTTGCTTTATTTGGCTACTTACTTGTACAGATTATTAACT    | 100 |
| AmCherry777 | 51 GGTCATGTTGGTTTATTTGGCTACTTACTTGTACAGATTATTAACT        | 100 |
| BD413       | 101 ACCAGCGTGCTCAAGAATATCGTGAATCATTGACCGATGGCATTTCTTAT   | 150 |
| AmCherry777 | 101 ACCAGCGTGCTCAAGAATATCGTGAATCATTGACCGATGGCATTTCTTAT   | 150 |
| BD413       | 151 GTCATTGGTGAAGGAATTGCTCGGCAGCCTACAAAACAACAACAAAATTAGA | 200 |
| AmCherry777 | 151 GTCATTGGTGAAGGAATTGCTCGGCAGCCTACAAAACAACAAAAATTAGA   | 200 |
| BD413       | 201 CTGGATATCAGATGCCTCTGATCTACTTGAGTTGCCCATCTATTATATCG   | 250 |
| AmCherry777 | 201 CTGGATATCAGATGCCTCTGATCTACTTGAGTTGCCCATCTATTATATCG   | 250 |
| BD413       | 251 ATGCCAGCAAAATCGAGTTATCACGTACAGAGAAGAAACGTCTGGATGAG   | 300 |
| AmCherry777 |  | 300 |
| BD413       | 301 CAAAAATCAGTTGTTCGTTATGATGCTGAAACCTCAATTGCTTATGTGGT   | 350 |
| AmCherry777 |  | 350 |
| BD413       | 351 CATTGGCTTAAAGGATGATCCAAAACACTTCCTTTATATTAAGGTAGATA   | 400 |
| AmCherry777 |  | 400 |
| BD413       | 401 AAATTGGTGAGCGTCAAATGAAGGCGCTGCCTATTTTTATCCTGGATTAT   | 450 |
| AmCherry777 |  | 450 |
| BD413       | 451 CTGATTTTTATCCTGGACAGGAAAAACAATACGTTCAAAAAATTCAGAA    | 500 |
| AmCherry777 | 451 CTGATTTTTATCCTGGACAGGAAAAACAATACGTTCAAAAAATTCAGAA    | 500 |
| BD413       | 501 ATATTTTCTTATCCAATTAATATTTATGATGTTAAAGATTTGAATTTGG    | 550 |
| AmCherry777 |  | 550 |
| BD413       | 551 ACTCGGAGCAGATCGGGCGTTTACGTCAGGATCAAAGTGTGATGCTCTAT   | 600 |
| AmCherry777 | 551 ACTCGGAGCAGATCGGGCGTTTACGTCAGGATCAAAGTGTGATGCTCTAT   | 600 |
| BD413       | 601 AAAGATAATGCGACCATTCGTGGAACCACGATTTCGATTATCTCACCCAT   | 650 |
| AmCherry777 |  | 650 |
| BD413       | 651 GCCAAACAATCCAATGCAAGCTTTGGTACTCGGGCCTGTGCCATTATTCA   | 700 |
| AmCherry777 |  | 700 |
| BD413       | 701 ACTGGATGCCATTTCAACTCTCTGCTGGAATTACCTTATTTAGTTTGTTT   | 750 |
| AmCherry777 |  | 750 |
| BD413       | 751 CTGCTTAGTCTGGGTGTTTATGGTTTAATTTTACCACTTGAACGAAAGAT   | 800 |

| AmCherry777 |   | 800  |
|-------------|---|------|
| BD413       | 801 TCGTCAGGTACGTTATGCACTCAACCGCATGAAGTCTGGTGATTTATCAT  | 850  |
| AmCherry777 | 801 TCGTCAGGTACGTTATGCACTCAACCGCATGAAGTCTGGTGATTTATCAT  | 850  |
| BD413       | 851 TACGTGTCCCGATTGAGGGAAGTGATGAAATGGCAAATCTGGCATCAAGT  | 900  |
| AmCherry777 | 851 TACGTGTCCCGATTGAGGGAAGTGATGAAATGGCAAATCTGGCATCAAGT  | 900  |
| BD413       | 901 TATAATAATATGTCGGATCATATTCAGCGTTTGATTGAGGCACAACGTGA  | 950  |
| AmCherry777 | 901 TATAATAATATGTCGGATCATATTCAGCGTTTGATTGAGGCACAACGTGA  | 950  |
| BD413       | 951 GTTGATGCGTGCAGTTTCCCATGAACTAAGAACACCTGTTGCACGTATTC  | 1000 |
| AmCherry777 | 951 GTTGATGCGTGCAGTTTCCCATGAACTAAGAACACCTGTTGCACGTATTC  | 1000 |
| BD413       | 1001 GTTTTGGAATGGAAATGCTCGCTGAAGAAGATGACTACAATTATCGTATT | 1050 |
| AmCherry777 | 1001 GTTTTGGAATGGAAATGCTCGCTGAAGAAGATGACTACAATTATCGTATT | 1050 |
| BD413       | 1051 CAGCAAATGGAAATGATTGACCGTGATATTGAGGCACTGAATACCTTAAT | 1100 |
| AmCherry777 | 1051 CAGCAAATGGAAATGATTGACCGTGATATTGAGGCACTGAATACCTTAAT | 1100 |
| BD413       | 1101 TGATGAAATCATGACCTATGCCAAGTTGGAGCAGGGTACACCTTCGCTTG | 1150 |
| AmCherry777 | 1101 TGATGAAATCATGACCTATGCCAAGTTGGAGCAGGGTACACCTTCGCTTG | 1150 |
| BD413       | 1151 ATTTTGAAGAGATCATACTGGTCGATCTGCTTAATCAGGTAGCCATTGAA | 1200 |
| AmCherry777 | 1151 ATTTTGAAGAGATCATACTGGTCGATCTGCTTAATCAGGTAGCCATTGAA | 1200 |
| BD413       | 1201 ACTGAAGCACTCAAAACCCAAAAAGAAATTGAACTCATTCCACCGCCCAC | 1250 |
| AmCherry777 | 1201 ACTGAAGCACTCAAAACCCAAAAAGAAATTGAACTCATTCCACCGCCCAC | 1250 |
| BD413       | 1251 TTATGTTATGGTCGATGCAGAGCGTCGTTATTTGCATCGTGTGGTTCAAA | 1300 |
| AmCherry777 | 1251 TTATGTTATGGTCGATGCAGAGCGTCGTTATTTGCATCGTGTGGTTCAAA | 1300 |
| BD413       | 1301 ATCTGGTAGGTAATGCCGTGCGTTACTGCAATGATAAGGTGCGAATTTCT | 1350 |
| AmCherry777 | 1301 ATCTGGTAGGTAATGCCGTGCGTTACTGCAATGATAAGGTGCGAATTTCT | 1350 |
| BD413       | 1351 GGTGGAATTCATCCAGATGGTCATGCATTTATCTGTGTGGAAGACGATGG | 1400 |
| AmCherry777 | 1351 GGTGGAATTCATCCAGATGGTCATGCATTTATCTGTGTGGAAGACGATGG | 1400 |
| BD413       | 1401 TGCGGGTATTGCTGAAGAAGATCGCGCGAGAGTATTTGAAGCATTTGCTC | 1450 |
| AmCherry777 | 1401 TGCGGGTATTGCTGAAGAAGATCGCGAGAGTATTTGAAGCATTTGCTC   | 1448 |
| BD413       | 1451 GTTTAGATGATAGTCGTACACGTGCTTCTGGCGGCTATGGTTTGGGGCTT | 1500 |
| AmCherry777 | 1449 GTTTAGATGATAGTCGTACACGTGCTTCTGGCGGCTATGGTTTGGGGCTT | 1498 |
| BD413       | 1501 TCGATTGTGAGTCGTATTGCCTATTGGTTTGGTGGAACCATCCAGGTAGA | 1550 |
| AmCherry777 | 1499 TCGATTGTGAGTCGTATTGCCTATTGGTTTGGTGGAACCATCCAGGTAGA | 1548 |

| BD413       | 1551 | TGAAAGTCCAGAATTAGGCGGCGCCCGCTTTGTGATGCAGTGG | CCTGCAA | 1600 |
|-------------|------|---|---------|------|
|             |      |   |         |      |
| AmCherry777 | 1549 | TGAAAGTCCAGAATTAGGCGGCGCCCGCTTTGTGATGCAGTGG | CCTGCAA | 1598 |
|             |      |   |         |      |
| BD413       | 1601 | AACGTTTTAATGAAAATAGTAAAAAGAAAAAATCGATATAG   | 1641    |      |
|             |      |   |         |      |
| AmCherry777 | 1599 | AACGTTTTAATGAAAATAGTAAAAAGAAAAAATCGATATAG   | 1639    |      |

Abbildung 18: Alignment von *ACIAD*0727 aus *Acinetobacter baylyi* BD413 (BD413) und A. baylyi BD413 mCherry 777 (AmCherry777). Das Alignment zeigt die Deletion von zwei Basenpaaren bei *A. baylyi* BD413 mCherry 777.

Durch die Deletion der 2 bp C und G ergibt sich eine Leserahmenverschiebung in einer HATPase-Domäne. Wie in Abbildung 19 zu sehen, führt diese Verschiebung zur Bildung eines neuen Stoppcodons und damit einem vorzeitigen Stopp bei 478 AS statt 546 AS.

| BD413       | 1   | VFKHSIFLRIYAGLVVLVMLVALFGYLLVQIINYQRAQEYRESLTDGISY |     | 50  |
|-------------|-----|--|-----|-----|
| AmCherry777 | 1   |  |     | 50  |
| BD413       | 51  | VIGEGIARQPTKQQKLDWISDASDLLELPIYYIDASKIELSRTEKKRLDE |     | 100 |
| AmCherry777 | 51  | VIGEGIARQPTKQQKLDWISDASDLLELPIYYIDASKIELSRTEKKRLDE |     | 100 |
| BD413       | 101 | QKSVVRYDAETSIAYVVIGLKDDPKHFLYIKVDKIGERQMKALPIFILDY |     | 150 |
| AmCherry777 | 101 | QKSVVRYDAETSIAYVVIGLKDDPKHFLYIKVDKIGERQMKALPIFILDY |     | 150 |
| BD413       | 151 | LIFYPGQEKQYVQKIQKYFSYPINIYDVKDLNLDSEQIGRLRQDQSVMLY |     | 200 |
| AmCherry777 | 151 | LIFYPGQEKQYVQKIQKYFSYPINIYDVKDLNLDSEQIGRLRQDQSVMLY |     | 200 |
| BD413       | 201 | KDNATIRGTTISIISPMPNNPMQALVLGPVPLFNWMPFQLSAGITLFSLE |     | 250 |
| AmCherry777 | 201 | KDNATIRGTTISIISPMPNNPMQALVLGPVPLFNWMPFQLSAGITLFSLE |     | 250 |
| BD413       |     | LLSLGVYGLILPLERKIRQVRYALNRMKSGDLSLRVPIEGSDEMANLASS |     | 300 |
| AmCherry777 |     | LLSLGVYGLILPLERKIRQVRYALNRMKSGDLSLRVPIEGSDEMANLASS |     | 300 |
| BD413       | 301 | YNNMSDHIQRLIEAQRELMRAVSHELRTPVARIRFGMEMLAEEDDYNYRI |     | 350 |
| AmCherry777 | 301 | YNNMSDHIQRLIEAQRELMRAVSHELRTPVARIRFGMEMLAEEDDYNYRI |     | 350 |
| BD413       | 351 | QQMEMIDRDIEALNTLIDEIMTYAKLEQGTPSLDFEEIILVDLLNQVAIE |     | 400 |
| AmCherry777 | 351 | QQMEMIDRDIEALNTLIDEIMTYAKLEQGTPSLDFEEIILVDLLNQVAIE |     | 400 |
| BD413       | 401 | TEALKTQKEIELIPPPTYVMVDAERRYLHRVVQNLVGNAVRYCNDKVRIS |     | 450 |
| AmCherry777 | 401 | TEALKTQKEIELIPPPTYVMVDAERRYLHRVVQNLVGNAVRYCNDKVRIS |     | 450 |
| BD413       | 451 | GGIHPDGHAFICVEDDGAGIAEEDRARVFEAFARLDDSRTRASGGYGLGI | _   | 500 |
| AmCherry777 | 451 | GGIHPDGHAFICVEDDGAGIAEEDRESI                       | -   | 478 |
| BD413       | 501 | SIVSRIAYWFGGTIQVDESPELGGARFVMQWPAKRFNENSKKKKSI     | 546 |     |
| AmCherry777 | 479 |  | 478 |     |

Abbildung 19: Alignment der Proteinsequenz von ACIAD0727 aus *Acinetobacter baylyi* BD413 (BD413) und A. baylyi BD413 mCherry 777 (AmCherry777). Das Alignment zeigt die Trunkierung nach 478 Aminosäuren.

Der Basenaustausch von A zu G bei 1362849 bp führt zu einem Aminosäureaustausch von L zu Serin (S) in ACIAD1376, einem Transkriptionsregulator der TetR/AcrR Familie. Genau dasselbe Gen ist in *A. baylyi* BD413 mCherry 652 deletiert. In Abbildung 20 ist der Aminosäureaustausch an Position 212 im Protein beispielhaft für die anderen einzelnen Aminosäureaustausche dargestellt.

| AmCherry777 | 1 MSKTVLSSLCPTGCELPLTRRGHERWLALLNSATELFLEKGYDAVSLDDV 5     | 0 |
|-------------|--|---|
| BD413       | 1 MSKTVLSSLCPTGCELPLTRRGHERWLALLNSATELFLEKGYDAVSLDDV 5     | 0 |
| AmCherry777 | 51 VNYAGGSKASIYKYFGSKEGLFTSICDYRRELFFKNICVSFDSERDDLRN 10   | 0 |
| BD413       | 51 VNYAGGSKASIYKYFGSKEGLFTSICDYRRELFFKNICVSFDSERDDLRN 100  | 0 |
| AmCherry777 | 101 FLIHTLIGFYQKITCDENAAFMRLIIEQSQRNPDLALYLHQKGPEHVQKT 150 | 0 |
| BD413       | 101 FLIHTLIGFYQKITCDENAAFMRLIIEQSQRNPDLALYLHQKGPEHVQKT 150 | 0 |
| AmCherry777 | 151 IAHALEQATLLGKIQCQKPYNSAMMFFGILRNIEWKILMGVPTTIDNDEV 200 | 0 |
| BD413       | 151 IAHALEQATLLGKIQCQKPYNSAMMFFGILRNIEWKILMGVPTTIDNDEV 200 | 0 |
| AmCherry777 | 201 VEHIEYCVDLFSNAHKVS 218                                 |   |
| BD413       | 201 VEHIEYCVDLFLNAHKVS 218                                 |   |

Abbildung 20: Alignment der Proteinsequenz von ACIAD1376 aus *Acinetobacter baylyi* BD413 (BD413) und A. baylyi BD413 mCherry 777 (AmCherry777). Das Alignment zeigt den Austausch von einem Leucin (L) gegen ein Serin (S) an Stelle 212 des Proteins.

Die zweite Punktmutation bei 2531011 bp im Genom von *A. baylyi* BD413 mCherry 777 von G zu A ist eine stille Mutation in einem hypothetischen Protein.

Die Assembly der Sequenz von *A. baylyi* BD413 mCherry 807 weist eine Punktmutation und sechs Deletionen auf. Nur die 102 bp umfassende Deletion in einem hypothetischen Protein hat vermutlich Auswirkungen. In diesem Protein fehlen ungefähr mittig 34 AS, wie in dem Alignment in Abbildung 21 zu sehen ist.

| BD413 | 1   | MDQIDLFKKYFNNFLLENSEKMLSRALIISTLNENCYLLMNAFKLCEYED | 50  |
|-------|-----|--|-----|
| 807   | 1   | MDQIDLFKKYFNNFLLENSEKMLSRALIISTLNENCYLLMNAFKLCEYED | 50  |
| BD413 | 51  | DRIVFYGESMKNRIERLFNEVMKYSYTISKPSDFFTNEYDSNFDKKFDFI | 100 |
| 807   | 51  | DRIVFYGESMKNRIERLFNEVMKYSYTISKPSDFFTNEYDSNFDKKFDFI | 100 |
| BD413 | 101 | RKIPDDYYLKFNIYQKKLYEYYWNNLNSEKKFFFSEKTKKYIKINGEAYA | 150 |

| 807   | 101 | RKIPDDYYLKFNIYQKKLYEYYWNNLNSEK     |                   | 130 |
|-------|-----|------------------------------------|-------------------|-----|
| BD413 | 151 | NFLHFSLGKEFSIVKTKGNFIIKKYIKEDTYFFI |                   | 200 |
| 807   | 131 |                                    |                   | 166 |
| BD413 | 201 | LPPFPIFIIGGMYIDSYQFIFNRIDHPAIENLGE | 'QHGLYQEGISSELKWL | 250 |
| 807   | 167 | LPPFPIFIIGGMYIDSYQFIFNRIDHPAIENLGE | 'QHGLYQEGISSELKWL | 216 |
| BD413 | 251 | FILCDISAYYIKMCFDFYEESLLSYIKKYS     | 280               |     |
| 807   | 217 | FILCDISAYYIKMCFDFYEESLLSYIKKYS     | 246               |     |

Abbildung 21: Alignment der Proteinsequenz eines hypothetischen Proteins in *Acinetobacter baylyi* BD413 (BD413) und der Variante des gleichen Proteins aus *A. baylyi* BD413 mCherry 807 (807) mit einer Deletion von 102 Basenpaaren. Die fehlenden 34 Aminosäuren sind mit "-" dargestellt und liegen etwa mittig im Protein.

Die Abbildung 22 zeigt die Punktmutation von A zu C an der Stelle 3275343 bp im Genom von *A. baylyi* BD413 mCherry 807 zieht einen Aminosäureaustausch von F zu Cystein im PBP3 nach sich.

| BD413    | 1 MIDKRIKQTRKKQQSISEKPSLAFDMWRFYLLWGVVLLCFVVLIARAFYV | 50  |
|----------|--|-----|
| 807      | 1 MIDKRIKQTRKKQQSISEKPSLAFDMWRFYLLWGVVLLCFVVLIARAFYV | 50  |
| BD413 5  | 1 QVINKDFLQNKANANILRTEKIKAMRGVISDRHGVPLAISTPVMKVVIDP | 100 |
| 807      | 1 QVINKDFLQNKANANILRTEKIKAMRGVISDRHGVPLAISTPVMKVVIDP | 100 |
| BD413 10 | 1 RDYFETKKEYDDISAELRKDPNNRKLKRQLPDKNLNLDELADAVGMDRAE | 150 |
| 807 10   | 1 RDYFETKKEYDDISAELRKDPNNRKLKRQLPDKNLNLDELADAVGMDRAE | 150 |
| BD413 15 | 1 LKKQMYARPRSRYLVLQKEIPPQQADLILKRNFQGVYTEKNYKRYYPQPQ | 200 |
| 807 15   | 1 LKKQMYARPRSRYLVLQKEIPPQQADLILKRNFQGVYTEKNYKRYYPQPQ | 200 |
| BD413 20 | 1 PNAQIIGLTNSEGVGVEGLEMQLNKQLSGVDGEQKVIRDKRGNRLKISEV | 250 |
| 807 20   | 1 PNAQIIGLTNSEGVGVEGLEMQLNKQLSGVDGEQKVIRDKRGNRLKISEV | 250 |
| BD413 25 | 1 IREGEPGENITLSIDSRLQYIMYRELTAAGVANNARSASAIAVDVKTGEI | 300 |
| 807 25   | 1 IREGEPGENITLSIDSRLQYIMYRELTAAGVANNARSASAIAVDVKTGEI | 300 |
| BD413 30 | 1 LAMASWPSYNPNDKNGLSNKDAMRNRGAIDMFEPGSTMKPFTVSAALESG | 350 |
| 807 30   | 1 LAMASWPSYNPNDKNGLSNKDAMRNRGAIDMFEPGSTMKPFTVSAALESG | 350 |
| BD413 35 | 1 QYTPNTIVNTSPGSMRLGWHTIRDTHNYGALTLTGVIVKSSNVGSAKIAL | 400 |
| 807 35   |  | 400 |
| BD413 40 | 1 SLPKDALPTFYRRVGFGQRSAVHFPGESGGLILPNSKLTPSQIGTMAYGY | 450 |
| 807 40   |  | 450 |
| BD413 45 | 1 GLNATILQLAQGYAMLANHGVKMPLSLRKLDEPPKGEQVLNPKIADQVLS | 500 |

| 807   |  |
|-------|--|
| BD413 | 501 MLEQVTMPGGTATQANIPGYRVGGKTGTAHKLRPDGKGYAQNQYRALFAG 550 |
| 807   | 501 MLEQVTMPGGTATQANIPGYRVGGKTGTAHKLRPDGKGYAQNQYRALCAG 550 |
| BD413 | 551 VAPVSDPRLAMIIVVENPQGRYYGGLVAAPVFTRIMQESLRLMNVPLDKP 600 |
| 807   | 551 VAPVSDPRLAMIIVVENPQGRYYGGLVAAPVFTRIMQESLRLMNVPLDKP 600 |
| BD413 | 601 LDTPSNPILKRQ 612                                       |
| 807   | 601 LDTPSNPILKRQ 612                                       |

Abbildung 22: Alignment der Proteinsequenz des Penicillinbindeproteins 3 (ACIAD3366) in *Acinetobacter baylyi* BD413 (BD413) und der Variante des gleichen Proteins aus *A. baylyi* BD413 mCherry 807 (807). Das Alignment zeigt den Austausch von einem Phenylalanin (F) gegen ein Cystein (C) an Stelle 548 des Proteins.

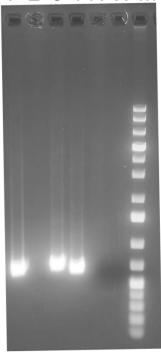
Die Sequenzierung der Genome von *A. baylyi* BD413 mCherry 652, *A. baylyi* BD413 mCherry 777 und *A. baylyi* BD413 mCherry 807 zeigte, dass diese kein Resistenzplasmid aufgenommen hatten. Folglich beruhen die veränderten MHK-Werte vermutlich auf den gefundenen Veränderungen der Genome.

Die Daten der drei sequenzierten Genome sind im Europäischen Nukleotidarchiv (ENA) unter "PRJEB50487" hinterlegt.

# 3.7 Transformation des Plasmids pHHV216 in *Acinetobacter baylyi* BD413 GFP und in *Acinetobacter baylyi* BD413 mCherry

Das Konzept sah die Konstruktion von insgesamt vier verschiedenen Stämmen für das Testsystem vor, d.h. ein Stamm je Fluorophor, der ein Resistenzplasmid trägt und je einer der keines besitzt. Das ausgewählte natürliche Resistenzplasmid pHHV216 wurde per Puddle-Transformation in die Stämme A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry transformiert. Als Plasmiddonor dienten abgetötete E. coli J53 pHHV216. Die Selektion erfolgte auf einer MH-Nähragarplatte mit 100 mg/ml Sulfadiazin, 150 mg/ml Spectinomycin, 20 mg/ml Tetracyclin, sowie 20 mg/ml Streptomycin ÜN. Sichtbare Kolonien wurden als erfolgreiche Transformanten angesehen und wie in Abbildung 23 zu sehen, noch per PCR mit den Primern Tra1\_for/rev, Tra2\_for/rev, Tra3\_for/rev, Tra4\_for/rev INT\_pHHV216\_for/rev überprüft. So konnten die plasmidtragenden Stämme A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 erzeugt werden.

# 1 2 3 4 N W M



1: A. baylyi BD413 GFP pHHV216 Tra1\_for/rev

2: A. baylyi BD413 GFP pHHV216 Tra2\_for/rev2

3: A. baylyi BD413 GFP pHHV216 Tra3\_for/rev

4: A. baylyi BD413 GFP pHHV216 Tra4 for/rev

N: Negativkontrolle

W: Wasserkontrolle

M: 1 kb plus Marker von Thermo Fisher Scientific™

700 bp 500 bp

Abbildung 23:1% Agarosegel nach einer Laufzeit von 30 Minuten bei 120 Volt mit den PCR-Produkten aus der Puddle-Transformation von *Acinetobacter baylyi* BD413 GFP mit dem Plasmid pHVV216. Tra1\_for/rev steht dabei jeweils für die verwendeten Primer Tra1\_for und Tra1\_rev. Bei Bahn 1, 3 und 4 ist ein Amplifikat zwischen 500 Basenpaaren (bp) und 700 bp zu sehen. Auf Spur 2, N und W ist kein Produkt der PCR zu erkennen. Die erwartete Produktgröße lag bei 550 bp. Für das Primerpaar Tra2\_for/rev konnte durch Wiederholung der PCR am nächsten Tag ein Amplifikat erzeugt werden. Somit gilt die Puddle-Transformation von pHHV216 in *A. baylyi* BD413 GFP als erfolgreich.

#### 3.8 Antibiogramme

Für eine grundlegende Charakterisierung und um mit der MHK einen Vergleichspunkt zur MSC zu haben, wurden von allen Stämmen Antibiogramme angefertigt. Außerdem sollte überprüft werden, ob die Genkassetten mit dem Fluorophor Auswirkungen auf die Resistenz gegen die getesteten Substanzen hatten. Wie in Abschnitt 3.11 gezeigt, wurden die in der Diagnostik üblichen Standardantibiotika maschinell mit einem Vitek2- oder Mikronaut-System bearbeitet. Die klinisch eher ungebräuchlicheren AB und Schwermetalle wurden mit manuellen Antibiogrammen nach der Mikrodilutionsmethode angefertigt. Die ermittelten MHK-Werte von A. baylyi BD413 und seinen verschiedenen Varianten können Tabelle 13 und Tabelle 16 entnommen werden. Dabei wurden die Tests mindestens dreimal wiederholt und bei abweichenden Werten jeweils der höchste Wert berücksichtigt. Die Stämme A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry wurden aufgrund ihrer gleichen Ergebnisse zusammengefasst, genauso wie A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216. Nicht getestete Stämme oder Substanzen sind mit einem "-" gekennzeichnet. Bei den automatisiert ermittelten MHKs kam immer nur eine begrenzte Anzahl an Konzentrationen zum Einsatz, die sich an klinisch relevanten Werten orientiert.

Deshalb sind dort, wie beim Bsp. Piperacillin/Tazobactam, nur Zahlen zwischen 4/4 und 64/4 berücksichtigt. Alles außerhalb dieses Spektrums ist <4/4 oder >64/4. Bei den manuell erstellten MHKs konnten manche Werte aufgrund der Löslichkeitsgrenze und der in dieser Methode der Mikrodilution maximal eingesetzten Menge von 200 µl pro Well nicht erhöht werden. So wurde z. B. bei Blei mit Pb<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>x3H<sub>2</sub>O eine maximale Konzentration von 512 mg/ml getestet, entsprechend sind die Stämme, die bei dieser Konzentration noch Wachstum zeigten als >512 ausgewiesen. In Tabelle 16 sind die Antibiogramme mit BD413, A. baylyi BD413 GFP, A. baylyi BD413 mCherry, A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 zu sehen. Die MHK-Werte von A. baylyi BD413, A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry zeigten keine Abweichungen. Die MHKs der beiden fluoreszierenden Stämme A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry waren gleich mit der des Elternstammes A. baylyi BD413, trotz der eingebauten Resistenzkassette gegen Spectinomycin. Die in der Genkassette integrierte Sequenz von ANT(9) nahm keinen Einfluss auf die Ergebnisse der anderen getesteten Substanzen. A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 mit ihrem Resistenzplasmid hingegen zeigten abweichende MHK-Werte im Vergleich zum Elternstamm A. baylyi BD413. Die beiden plasmidtragenden Stämme zeigten sich resistenter gegen Chloramphenicol, Sulfadiazin, Sulfamethoxazol und Tetracyclin. Dies entspricht den durch pHHV216 vermittelten Resistenzen gegen Sulfonamide, Streptomycin, Tetracyclin, Chloramphenicol. Die restlichen MHKs von A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 entsprachen jenen des Ausgangsstammes A. baylyi BD413.

Tabelle 16: Antibiogramme von verschiedenen *Acinetobacter baylyi* BD413-Varianten gegen diverse, antimikrobiell wirksame Subtanzen. *A. baylyi* BD413 ist der Elternstamm für die folgenden Varianten mit Fluorophor oder mit Fluorophor und dem natürlichem Resistenzplasmid pHHV216: *A. baylyi* BD413 GFP, *A. baylyi* BD413 mCherry, *A. baylyi* BD413 GFP pHHV216, *A. baylyi* BD413 mCherry pHHV216. Die eingewogenen Mengen aller verwendeten Substanzen wurden so berechnet, dass die angegebene Konzentration sich nur auf die aktive Komponente bezieht. Nicht getestete Substanzen sind mit einem "-" gekennzeichnet. MHK bezeichnet die minimale Hemmkonzentration.

|                                | Acinetobacter baylyi BD413 |                 |                 |  |
|--------------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|--|
| MHK [mg/l] (24h)               |                            | GFP/<br>mCherry | GFP/<br>mCherry |  |
| Antibiotisch wirksame Substanz |                            |                 | pHHV216         |  |
| Ciprofloxacin                  | <0,0165                    | <0,0165         | <0,0165         |  |
| Levofloxacin                   | ≤0,5                       | 0,031           | 0,031           |  |
| Amikacin                       | ≤4                         | ≤4              | ≤4              |  |
| Colistin                       | ≤1                         | ≤1              | ≤1              |  |
| Chloramphenicol                | ≤8                         | ≤8              | >16             |  |
| Fosfomycin                     | 32                         | 32              | ≤16             |  |
| Tigecyclin                     | ≤0,25                      | ≤0,25           | ≤0,25           |  |
| Trimethoprim/Sulfamethoxazol   | ≤1/19                      | ≤1/19           | ≤1/19           |  |
| Piperacillin                   | ≤8                         | ≤8              | ≤8              |  |
| Piperacillin/Tazobactam        | ≤4/4                       | ≤4/4            | 4/4             |  |

| Cefotaxim   | >2     | >2     | ≤1     |
|---|--------|--------|--------|
| Ceftazidim  | 4      | 4      | ≤1     |
| Ceftazidim/3-APB  | 4      | 4      | ≤0.25  |
| Ceftazidim/Avibactam  | 4/4    | 4/4    | ≤1/4   |
| Ceftolozan/Tazobactam   | ≤1/4   | ≤1/4   | ≤1/4   |
| Imipenem  | 1      | 1      | ≤1     |
| Meropenem   | ≤0,125 | ≤0,125 | ≤0,125 |
| Meropenem/3-APB   | ≤0,25  | ≤0,25  | ≤0,25  |
| Meropenem/EDTA  | ≤0,25  | ≤0,25  | ≤0,25  |
| Temocillin  | 128    | 128    | <32    |
| Clindamycin   | 2      | 2      | 8      |
| Tetracyclin   | 0.5    | 0.5    | >256   |
| Sulfadiazin   | 2      | 2      | >512   |
| Sulfamethoxazol   | 2      | 2      | >32    |
| Erythromycin  | -      | 4      | 4      |
| Benzalkoniumchlorid   | 2      | 2      | 16     |
| 3CdSO <sub>4</sub> x8H <sub>2</sub> O   | 16     | 16     | 64     |
| Cu(II)SO <sub>4</sub>   | 128    | 128    | >256   |
| ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O  | 64     | 64     | 128    |
| Pb <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>2</sub> x3H <sub>2</sub> O | >512   | >512   | >512   |

# 3.9 Checkerboard-Assay

Mit den in Abschnitt 3.8 durchgeführten Antibiogrammen wurde jeweils für eine Substanz eine MHK festgelegt. Aber in der Realität treten im Abwasser und in Flüssen auch mehrere Stoffe gleichzeitig auf. Um sich der Frage anzunähern, ob bestimmte Antibiotika eine Synergie aufweisen oder nicht, wurden mehrere Checkerboard-Assays Wirkstoffkombinationen angesetzt und ausgewertet. Es wurden die Stämme A. baylyi BD413 GFP, A. baylyi BD413 mCherry, A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 mit der Substanzkombination Sulfadiazin und Erythromycin getestet. In Abbildung 24 ist beispielhaft das Wachstum von A. baylyi BD413 GFP gegen Erythromycin und Sulfadiazin nach der Inkubation durch graue Markierungen dargestellt. Nach der Formel für den FIC-Index ergibt sich für Erythromycin aus der MHK von 4 mg/l und dem höchsten Wert von 1 mg/l am Kreuzungspunkt ein FIC<sub>A</sub> von (1/4)=0,25. FIC<sub>B</sub>= (0,125/0,25)=0,5 für die zweite Substanz Sulfadiazin ergibt sich aus dem Wert 0,125 mg/l und der MHK von 0,25 mg/l. FIC<sub>A</sub>+FIC<sub>B</sub> ergibt einen FIC-Wert von 0,25+0,5=0,75 und damit ein indifferentes Ergebnis.

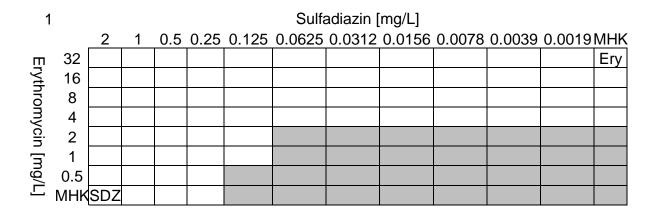


Abbildung 24: Checkerboard-Assay mit *Acinetobacter baylyi* BD413 GFP gegen Erythromycin (Ery) und Sulfadiazin (SDZ). Die grauen Markierungen symbolisieren bakterielles Wachstum nach 24 Stunden Inkubation in einer 96-Well-Mikrotiterplatte.

Die Checkerboard-Assays wurden an zwei Versuchstagen in Tripletts pro Stamm angesetzt. Im Anhang 9.5 befinden sich die restlichen Auswertungen, dabei wird nur das zusammengefasste Ergebnis pro Tag und Stamm dargestellt, da sich die Ergebnisse der jeweiligen drei Tests entsprachen. Die zusammengefassten Ergebnisse der beiden Versuchstage sind in Tabelle 17 abgebildet. Bei keinem der vier getesteten Stämme konnte eine Synergie der getesteten Antibiotika Sulfadiazin und Erythromycin festgestellt werden, alle zeigten mit einem FIC-Index zwischen 0,5 und 4 ein indifferentes Ergebnis.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Checkerboard-Assays, sowie die entsprechenden FIC (Fractional Inhibitory Concentration)-Indizes der Stämme *Acinetobacter baylyi* BD413 GFP, *A. baylyi* BD413 mCherry, *A. baylyi* BD413 GFP pHHV216 und *A. baylyi* mCherry pHHV216 mit den beiden Antibiotika Sulfadiazin (SDZ) und Erythromycin (Ery).

| Substanz [mg/l] | A. baylyi BD413 |                |              |                    |
|-----------------|-----------------|----------------|--------------|--------------------|
| SDZ+Ery         | GFP             | mCherry        | GFP pHHV216  | mCherry<br>pHHV216 |
| Vertikal Ery    |                 |                |              |                    |
| MHK             | 4               | 4              | 4            | 4                  |
| Höchste Konz    |                 |                |              |                    |
| im              | 32              | 32             | 32           | 32                 |
| Checkerboard    |                 |                |              |                    |
| Horizontal SDZ  |                 |                |              |                    |
| MHK             | 0,25            | 0,25           | >1024        | >1024              |
| Höchste Konz    |                 |                |              |                    |
| im              | 2               | 2              | 1024         | 1024               |
| Checkerboard    |                 |                |              |                    |
| FIC             | 0,125/0,25+1/4  | 0,125/0,25+1/4 | 128/2048+2/4 | 128/2048+2/4       |
|                 | = 0,75          | = 0,75         | = 0.5625     | = 0.5625           |
|                 | indifferent     | indifferent    | indifferent  | indifferent        |

#### 3.10 Wachstumskurven

Zur Charakterisierung der in dieser Arbeit erzeugten Varianten von *A. baylyi* BD413 wurden Wachstumskurven mit einem Plattenlesegerät angefertigt. Die Kontrollen bildeten je drei Näpfchen mit nur 200 µl sterilem MH- oder LB-Medium ohne Zellen. Die Wachstumskurven von *A. baylyi* BD413, *A. baylyi* BD413 GFP, *A. baylyi* BD413 mCherry, *A. baylyi* BD413 GFP 652, *A. baylyi* BD413 mCherry 652, *A. baylyi* BD413 mCherry 777, *A. baylyi* BD413 GFP 807, *A. baylyi* BD413 GFP pHHV216 und *A. baylyi* BD413 mCherry pHHV216 sind in Abbildung 25 dargestellt.

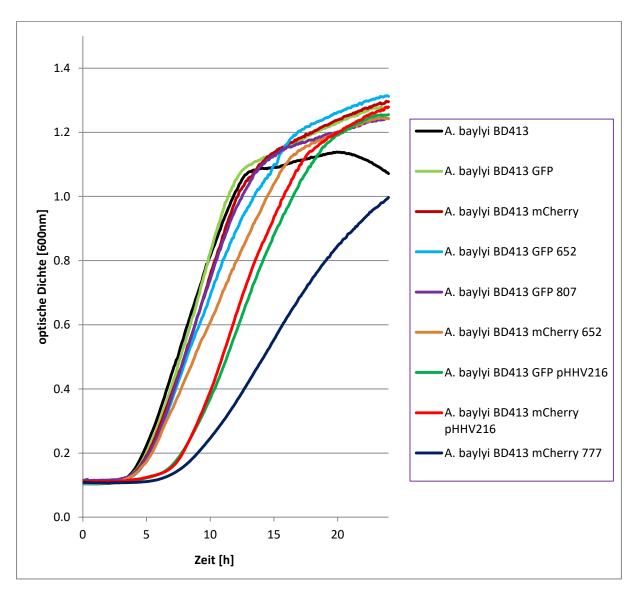


Abbildung 25: Wachstumskurven von *Acinetobacter baylyi* BD413 und diverser Varianten. Aufgetragen ist die optische Dichte bei 600 nm gegen die Zeit in Stunden (h). Die Wachstumskurven wurden über 24 Stunden in einer Mikrodilutionsplatte mit Müller-Hinton-Medium in einem Tecan Infinite©200PRO bei 30 °C erstellt.

Wie oben bereits erwähnt wurden alle Wachstumskurven in Tripletts erstellt, hier werden aber nur die Mittelwerte der Kurven gezeigt. Für die Berechnung der Wachstumsrate und

Verdopplungszeit nach den folgenden Formeln wurden ebenfalls die Mittelwerte herangezogen: Wachstumsrate  $\mu=(Inx_t-Inx_0)/(t-t_0)$ ; Verdopplungszeit  $t_d=In2/\mu$ . Die ermittelten Wachstumsraten und Verdopplungszeiten für MH- und LB-Medium im Tecan Infinite©200PRO sind in Tabelle 18 zu sehen.

Tabelle 18: Darstellung der Wachstumsraten  $\mu$  und Verdopplungszeiten  $t_d$  in Minuten (min) für Acinetobacter baylyi BD413 und diverser Varianten. Die zugrundeliegenden Wachstumskurven wurden über 24 Stunden in einer Mikrodilutionsplatte mit Müller-Hinton-Medium (MH) oder Lysogeny Broth-Medium (LB) in einem Tecan Infinite©200PRO bei 30 °C erstellt.

| Medium                                | LB         |                      | МН         |            |
|---------------------------------------|------------|----------------------|------------|------------|
|                                       | μ [min]    | t <sub>d</sub> [min] | μ [min]    | td [min]   |
| A. baylyi BD413                       | 0,00645175 | 107,43553            | 0,00639609 | 108,379944 |
| A. baylyi BD413<br>GFP                | 0,00620442 | 111,718336           | 0,00616178 | 112,76436  |
| A. baylyi BD413<br>mCherry            | 0,00623395 | 111,18915            | 0,00616128 | 112,642723 |
| A. baylyi BD413<br>GFP 652            | 0,00622267 | 111,39064            | 0,00619811 | 111,888301 |
| A. baylyi BD413<br>mCherry 652        | 0,00579837 | 119,541817           | 0,00572109 | 121,278202 |
| A. baylyi BD413<br>mCherry 777        | 0,00352397 | 196,694856           | 0,00346215 | 200,883821 |
| A. baylyi BD413<br>GFP 807            | 0,0062051  | 111,706012           | 0,006168   | 112,995238 |
| A. baylyi BD413<br>GFP pHHV216        | 0,00410879 | 168,698766           | 0,00407247 | 170,354112 |
| A. baylyi BD413<br>mCherry<br>pHHV216 | 0,00407026 | 170,295643           | 0,00408343 | 170,157693 |

In LB erreichten die Stämme nur ca. 60 % der optischen Dichte im Vergleich zu MH nach Ablauf der 24 h. So war das Triplett von *A. baylyi* BD413 in LB von einer  $OD_{600nm}$  von 0,098 binnen 24 h zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,655 gewachsen. In MH wuchsen die Zellen von einer  $OD_{600nm}$  von 0,104 zu einer  $OD_{600nm}$  von 1,071. Damit ergibt sich eine Differenz von 38 %.

Am geringsten war der Unterschied mit 31 % bei *A. baylyi* BD413 GFP 652 und am größten bei *A. baylyi* BD413 mCherry pHHV216 mit 45 %. Der Rest der Stämme lag zwischen diesen beiden Werten. Dabei sind die Werte der Zelldichte nach 24 h mit Vorsicht zu betrachten, da sich die Zellen bereits am Anfang der Absterbephase befanden.

Wie in Abbildung 25 zu sehen, liegen die Wachstumskurven von A. baylyi BD413, A. baylyi BD413 GFP, A. baylyi BD413 mCherry, A. baylyi BD413 GFP 652 und A. baylyi BD413 GFP 807 sehr nahe zusammen. Dies spiegelt sich auch in den Wachstumsraten und Verdopplungszeiten in MH-Medium wider (Tabelle 18). Der Elternstamm A. baylyi BD413 wächst am schnellsten, die genannten Varianten sind nur zwischen 3,2 % und 4 % langsamer. Da alle Varianten, ob mutiert oder nicht, langsamer wachsen als der Ausgangstamm A. baylyi BD413, dürften die ca. 4 % Unterschied zwischen A. baylyi BD413 und A. baylyi BD413 GFP bzw. A. baylyi BD413 mCherry die metabolische Last der Fluoreszenz darstellen. Dabei ist der Unterschied der Verdopplungszeit von 0,11 % zwischen A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry vernachlässigbar. Zwei Mutanten-Stämme, A. baylyi BD413 GFP 807 und A. baylyi BD413 GFP 652, wuchsen ungefähr so schnell wie die Ausgangsstämme. Nach dieser recht einheitlichen Gruppe folgt A. baylyi BD413 mCherry 652 mit einer um 11,9 % langsameren Verdopplungszeit gegenüber A. baylyi BD413. Die Stämme A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 tragen beide jeweils das natürliche Resistenzplasmid pHHV216 und zeigten mit einer um etwa 57 % höheren Verdopplungszeit deutliche Zeichen der metabolischen Last des über 58 kb großen Plasmides. Auch hier ist wieder der Unterschied mit 0,18 % zwischen dem Stamm mit GFP und mCherry vernachlässigbar klein. Mit einem 85 % langsameren Wachstum im Vergleich zu A. baylyi BD413 ist A. baylyi BD413 mCherry 777 bereits deutlich eingeschränkt und die langsamste der getesteten Varianten. Wie in Tabelle 18 dargestellt, sind die Ergebnisse der Wachstumskurven in LB sehr ähnlich zu denen in MH. Insgesamt sind die Stämme leicht schneller in LB gewachsen, so hat z. B. der Grundstamm eine um ca. 1 min schnellere Verdopplungszeit. Die Unterschiede zwischen A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry waren auch in LB vernachlässigbar klein. Die Differenz zwischen A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 fiel mit etwas mehr als 1 min zwar etwas größer aus, ist aber immer noch vernachlässigbar. Auch in LB-Medium ist der Grundstamm wieder am schnellsten gewachsen. Mit 3 % bis 4 % Abstand folgt wieder die Gruppe aus A. baylyi BD413 GFP, A. baylyi BD413 mCherry, A. baylyi BD413 GFP 652 und A. baylyi BD413 GFP 807. Darauf folgten A. baylyi BD413 mCherry 652 mit 11,2 % und die Stämme mit pHHV216 mit 57% bzw. 58 %. Auch in LB wuchs A. baylyi BD413 mCherry 777 mit Abstand am langsamsten mit einem Rückstand von 83% auf den Grundstamm A. baylyi BD413.

Mit einer Verdopplungszeit von 107 bis 200 Minuten wuchsen die Acinetobacter-Stämme in 200 µl in einer versiegelten Mikrotiterplatte im Plattenlesegerät jedoch sehr langsam. Um zu überprüfen inwieweit die Bedingungen im Plattenlesegerät einen Einfluss auf die unterschiedlichen Verdopplungszeiten der Varianten hatten, wurden Wachstumskurven im Wasserbad angefertigt. So wurden Wachstumskurven der Stämme A. baylyi BD413, A. baylyi BD413 GFP, A. baylyi BD413 mCherry 652, sowie der Kombination von A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry 652 in je einem 500 ml Erlenmeyerkolben gemessen. Die Verdopplungszeiten von 31,8 min für A. baylyi BD413, 33 min für A. baylyi BD413 GFP, 35,5 min für A. baylyi BD413 mCherry 652, sowie 34,6 min für die Kombination von A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry 652 waren deutlich niedriger als die von über 100 Minuten aus dem Plattenlesegerät. Das Verhältnis der Verdopplungszeiten der einzelnen Stämme zum Elternstamm A. baylyi BD413 war allerdings auch unter den veränderten Bedingungen gleich. So wuchs A. baylyi BD413 GFP auch hier ca. 4 % langsamer im Vergleich zu A. baylyi BD413 und A. baylyi BD413 mCherry 652 büßte auch hier ca. 12 % zu A. baylyi BD413 ein. Das Wachstum der Co-Kultur mit 34,6 min entsprach nahezu dem errechneten Mittelwert von 34,2 min der beiden einzelnen Wachstumskurven von A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry 652.

Zusätzlich wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, um zu zeigen, wie sich die Wachstumsraten unter dem Einfluss von AB verändern. Hierfür wurde der gleiche Versuch wie die Wachstumskurve im Schüttelwasserbad bei 37 °C durchgeführt, wieder mit der Stammkombination A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry 652. In einem Erlenmeyerkolben befanden sich nur die Bakterien und 200 ml LB, in einem weiteren dagegen noch zusätzlich 1mg/l Piperacillin. Das Experiment ging über 24 h, wobei jede Stunde die OD<sub>600nm</sub> gemessen wurde und je 5 ml für eine MSC-Messung im Zytometer entnommen, mit Ausnahme der Stunden 13 bis 22. Aus der in Abbildung 26A gezeigten Wachstumskurve konnten Verdopplungszeiten von 38,5 min für die Kultur ohne AB und 40,9 min für die Stämme mit 1 mg/l Piperacillin errechnet werden. Die Zugabe von Piperacillin hat das Wachstum behindert und die Verdopplungszeit um 2 min oder 6 % erhöht, wohingegen die Erhöhung der Temperatur die Wachstumsrate sogar um 11 % verringert hat. Wie in Abbildung 26 B dargestellt, ergab die Auszählung der Proben jede Stunde für die Stammkombination ohne AB ein Verhältnis zwischen A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry 652 nach 1h von 3,5:1 für A. baylyi BD413 GFP, obwohl das Gefäß zum Start mit den gleichen Mengen inokuliert wurde. Nach den 24 h war das Verhältnis 1,12:1 für den unmutierten Stamm. Die Verhältnisse in Stunde 23 und 24 entsprachen etwa den Wachstumsgeschwindigkeiten der beiden Stämme. Dabei hat A. baylyi BD413 mCherry 652 einen geringen Wachstumsnachteil aufgrund seiner Mutationen und ist deshalb wahrscheinlich in geringfügig kleinerer Zellzahl vorhanden. Es dauerte einige Stunden nach

der Inokulierung bis sich dieser Status eingestellt hat, aber bereits nach 12 Stunden scheint das Verhältnis stabil zu sein und sich auch ÜN nicht verändert zu haben. Denn sowohl bei 12 h als auch bei 23 h war das Verhältnis jeweils bei 1,17:1 für *A. baylyi* BD413 GFP zu *A. baylyi* BD413 mCherry 652. Wie in Abbildung 26C zu sehen, verändert die Zugabe von 1 mg/l Piperacillin die Situation deutlich. Zunächst lag nach 1h *A. baylyi* BD413 GFP im Verhältnis von 3:1 zu *A. baylyi* BD413 mCherry 652 vor und damit war die Ausgangssituation sehr ähnlich zu der ohne AB. Nach 24 h dominierte hingegen *A. baylyi* BD413 mCherry 652 mit einem Verhältnis von 6,21:1 zu *A. baylyi* BD413 GFP.

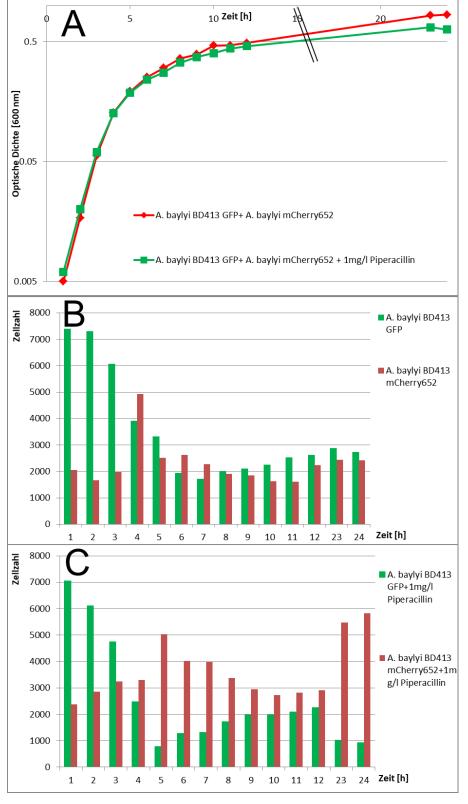


Abbildung 26: A: Wachstumskurven von Acinetobacter baylyi BD413 + *A. baylyi* BD413 mCherry652 und baylyi BD413 + A. baylyi BD413 mCherry652 + 1 mg/l Piperacillin. Aufgetragen ist die optische Dichte bei 600 nm gegen die Zeit in Stunden (h). Die Wachstumskurven wurden über 24 Stunden einem 500 Erlenmeyerkolben Lysogeny Broth-Medium in einem Julabo SW22 bei 30 °C erstellt. B und Während C: der Wachstumskurven jede wurden parallel zur Messung der optischen Dichte auch 5 ml Proben entnommen und wie bei einem MSC-Experiment ausgezählt. Aufgetragen ist jeweils die Zellzahl gegen die Zeit in h.

## 3.11 Ermittlung der Minimalen Selektiven Konzentration

In den vorausgegangenen Kapiteln wurde die Erstellung und Charakterisierung des Testsystems zur Ermittlung von MSCs dargestellt. Für die Kompetitionsexperimente zur Ermittlung der MSC wurde je ein sensibler mit einem resistenten Stamm kombiniert. Im Grundsystem sind das *A. baylyi* BD413 GFP und *A. baylyi* BD413 mCherry pHHV216 bzw. *A. baylyi* BD413 mCherry und *A. baylyi* BD413 GFP pHHV216. Dieses wurde durch die spontanen Mutanten erweitert, wobei diese wie die Resistenzplasmid tragenden Stämme behandelt wurden und entsprechend mit *A. baylyi* BD413 GFP oder *A. baylyi* BD413 mCherry kombiniert. Alle MSCs wurden in Tripletts mit jeweils beiden Stammpaarungen parallel durchgeführt. In Abbildung 27 ist ein Beispiel für ein Streudiagramm einer MSC von *A. baylyi* BD413 GFP gegen *A. baylyi* BD413 mCherry 652 gezeigt.

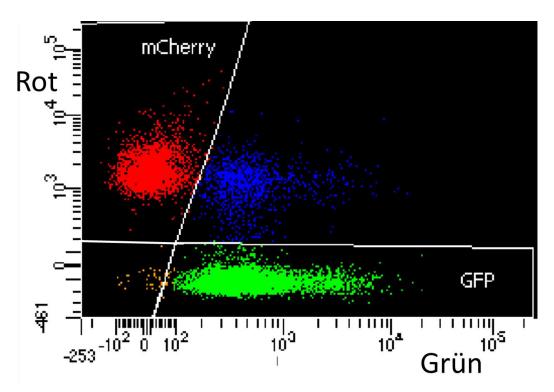


Abbildung 27: Streudiagramm einer MSC Acinetobacter baylyi BD413 GFP gegen A. baylyi BD413 mCherry652. Aufgetragen sind die gemessenen Ereignisse des roten Fluoreszenzdetektors (Rot) gegen die des grünen Fluoreszenzdetektors (Grün). Die typischen Cluster der beiden markierten Stämme sind gut zu erkennen.

Mit der MHK als ersten Anhaltspunkt wurden entsprechende Konzentrationsbereiche für die MSCs abgedeckt und in nachfolgenden Experimenten weiter eingegrenzt. Mit den im Zytometer ausgezählten Ergebnissen wurden, wie Abbildung 28 A zu sehen, Balkendiagramme erstellt. Um die exakte MSC zu erhalten, wurde nach Gullberg et al., 2011 der Selektionskoeffizient auf der Y-Achse gegen die Konzentration der antimikrobiellen Substanz auf der X-Achse aufgetragen. Für den Selektionskoeffizienten wurde das Verhältnis der im Zytometer ausgezählten Bakterien ermittelt und der natürliche Logarithmus

dieser Zahl gebildet. Wie in Abbildung 28 B dargestellt, ergibt sich die MSC aus dem Schnittpunkt der X-Achse mit der Regressionsgerade durch die aufgetragenen Werte im Diagramm.

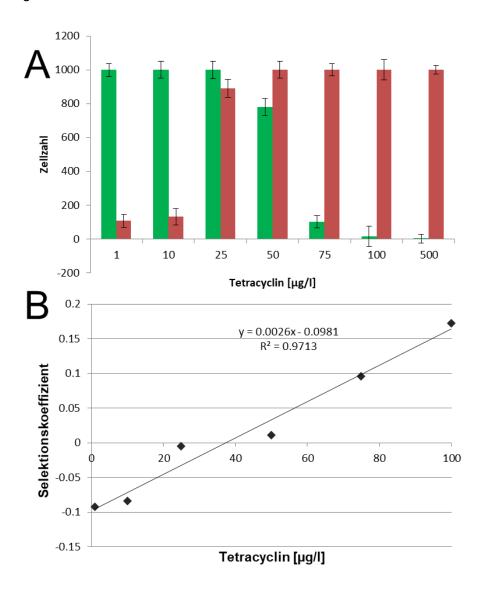


Abbildung 28: A: Zellzahl eines Experimentes zur Ermittlung der Minimalen selektiven Konzentration (MSC) mit Tetracyclin und den Stämmen Acinetobacter baylyi BD413 GFP (grün) und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 (rot). B: Das dazugehörige Schaubild zeigt den Selektionskoeffizienten gegen die Konzentration von Tetracyclin aufgetragen. Der Schnittpunkt der eingezeichneten Regressionsgerade mit der X-Achse stellt die MSC dar. Die entsprechende Formel der Regressionsgerade für die Berechnung ist ebenfalls der Abbildung zu entnehmen.

Dabei wird von den Bakterien so viel Farbstoff erzeugt, dass ihre Kolonien auf festen Nährmedien, wie MH oder LB, eine grüne bzw. rote Färbung aufweisen. Diese außergewöhnlich hohe Pigmentierung der Zellen blieb auch nach der Transformation mit dem Plasmid pHH216 bestehen. Die spontanen Mutanten wiesen ebenfalls weiterhin die gleiche Farbvarianz auf. Diese außergewöhnliche Färbung zeigte sich auch sehr stark in den Zellpellets während der MSCs und erlaubte bereits visuell eine grobe erste Einschätzung des Umschlagpunktes, wie in Abbildung 29 dargestellt.

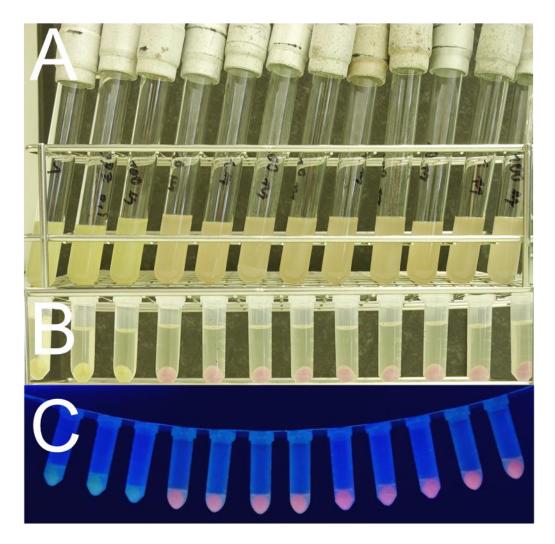


Abbildung 29: Konzentrationsreihe von Sulfadiazin (SDZ) von 1 Milligramm pro Liter (mg/l) bis 100 Femtogramm pro Liter (fg/l) für eine Minimale Selektive Konzentration (MSC). Von links nach rechts beträgt die angesetzte Konzentration an Sulfadiazin in den MSCs 1 mg/l, 0,5 mg/l, 100 Mikrogramm pro Liter (µg/l), 10 µg/l, 1 µg/l, 100 Nanogramm pro Liter (ng/l), 10 ng/l, 1 ng/l, 100 Pikogramm pro Liter (pg/l), 10 pg/l, 1pg/l, 100 fg/l. Für die MSC wurden die Stämme Acinetobacter baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry verwendet. A: Kulturen für die MSC in 5 ml Glasröhrchen nach der Inkubation über Nacht. B: Zellpellets der abgeernteten MSCs. C: Fixierte Pellets bestrahlt mit ultraviolettem Licht bei 305 nm. Der Übergang von grün nach rot zwischen 100 µg/l und 10 µg/l ist gut zu erkennen.

In Tabelle 19 sind die Mittelwerte der MSCs mit der Standardabweichung für die verschiedenen getesteten Stammkombinationen gezeigt. Dabei wird eine Kombination durch den resistenten Stamm repräsentiert, z. B. bei *A. baylyi* BD413 GFP und *A. baylyi* BD413 mCherry 777 steht in der Tabelle entsprechend nur *A. baylyi* BD413 mCherry 777. Da sich die Werte für *A. baylyi* BD413 GFP pHHV216 und *A. baylyi* BD413 mCherry pHHV216 entsprachen, wurden diese zusammengefasst. Im Folgenden wird diese Ausdrucksweise der Einfachheit halber beibehalten.

Tabelle 19: Die Minimale Selektive Konzentrationen (MSC) verschiedener Varianten und Kombinationen von Acinetobacter baylyi BD413. Dabei beziehen sich die MSC-Werte auf die Kombination der Stämme A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216, A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry, A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry 777, A. baylyi BD413 GFP 807 und A. baylyi BD413 mCherry. Die Kombinationen

werden in der Tabelle durch den jeweils resistenten Stamm repräsentiert. Die Werte von *A. baylyi* BD413 GFP pHHV216 und *A. baylyi* BD413 mCherry pHHV216 wurden zusammengefasst. Die Tabelle zeigt für jeden MSC-Wert den Mittelwert und die Standardabweichung. Nicht getestete Substanzen sind mit einem "-" gekennzeichnet.

|  | Acinetobacter baylyi BD413 |   |                      |                   |
|--|----------------------------|---|----------------------|-------------------|
| MSC [µg/l]  Antibiotisch wirksame Substanz | GFP/<br>mCherry<br>pHHV216 | mCherry<br>652                                  | mCherry<br>777       | GFP<br>807        |
| Piperacillin                               | -                          | 1038,67 ± 94.88                                 | 751,33 ± 37,98       | 5,63 ± 0,87       |
| Chloramphenicol                            | 750,00 ±<br>109,00         | 4,06x10 <sup>-6</sup> ±<br>1,4x10 <sup>-6</sup> | 1311,67 ±<br>93,90   | 0,056 ± 0,003     |
| Fosfomycin                                 | -                          | 40474,00 ±<br>1734,99                           | 11595,00 ±<br>919,05 | 18173,33 ± 514,76 |
| Levofloxacin                               | -                          | 25,77 ± 3,04                                    | 25,23 ± 2,81         | 15,69 ± 3,30      |
| Meropenem                                  | -                          | 70,38 ± 10,96                                   | $35,36 \pm 8,03$     | $50,60 \pm 7,60$  |
| Clindamycin                                | -                          | 988,33 ± 275,06                                 | 1156,67 ±<br>140,81  | 458,33 ± 86,12    |
| Tetracyclin                                | 44,09 ± 7,15               | -   | -                    | -                 |
| Sulfadiazin                                | 44,75 ± 4,50               | -   | -                    | -                 |
| Benzalkoniumchlorid                        | 490 ± 14,14                | -   | -                    | -                 |
| Erythromycin                               | 255,65 ± 27,47             | -   | -                    | -                 |
| Tetracyclin+Sulfadiazin                    | 49,79 ± 2,85               | -   | -                    | -                 |

Wie in Tabelle 19 dargestellt, konnten für die Stämme mit pHHV216 MSCs für Chloramphenicol, Tetracyclin, Sulfadiazin, Benzalkoniumchlorid, Erythromycin, sowie die Kombination von Tetracyclin und Sulfadiazin ermittelt werden. Für die Mutantenstämme A. baylyi BD413 mCherry 652, A. baylyi BD413 mCherry 777, A. baylyi BD413 GFP 807 konnten MSCs für Piperacillin, Chloramphenicol, Fosfomycin, Levofloxacin, Meropenem und Clindamycin erstellt werden. Bei Piperacillin hat der Stamm A. baylyi BD413 GFP 807 bereits bei einer Konzentration von 5,6 µg/l einen Wachstumsvorteil gegenüber dem empfindlichen A. baylyi BD413 mCherry. Die MSC für A. baylyi BD413 mCherry ist dagegen 133-mal so hoch und für A. baylyi BD413 mCherry 652 sogar 184-mal höher. Bei Chloramphenicol ergaben sich ebenfalls drastische Unterschiede von 4 pg/l für A. baylyi BD413 mCherry 652, über 56 ng/l für A. baylyi BD413 GFP 807, über 750 µg/l hin zu 1311 µg/l die A. baylyi BD413 mCherry 777 am Umschlagpunkt benötigt. Bei Fosfomycin sind die MSC-Werte für alle drei Kombinationen mit 40, 11 und 18 mg/l zwar hoch, aber einigermaßen vergleichbar. Wobei für A. baylyi BD413 mCherry 652 mit 40,474 mg/l die höchsten MSC-Werte insgesamt festgestellt wurden. Auch für Levofloxacin und Meropenem ergibt sich ein in sich geschlossenes Bild. A. baylyi BD413 mCherry 652 und A. baylyi BD413 mCherry 777 haben mit 25,77 µg/l und 25,23 µg/l für Levofloxacin sogar fast den gleichen Wert. Bei Clindamycin liegen diese beiden Stämme mit einer MSC um 1 mg/l ebenfalls nahe beieinander. Nur A. baylyi BD413 GFP 807 hat mit 458,33 μg/l einen nicht mal halb so hohen Wert. Bei Sulfadiazin und Tetracyclin als einzelne Substanzen liegen die Stämme mit pHHV216 bei einer MSC von je 44 μg/l. Für die Kombination der beiden Antibiotika ergab sich allerdings ein leicht erhöhter Wert von 49,79 μg/l. Die insgesamt höchste und niedrigste MSC hat beide *A. baylyi* BD413 mCherry 652 mit 40,474 mg/l für Fosfomycin und mit 4,06 pg/l für Chloramphenicol.

In Tabelle 20 ist das Verhältnis von MSC/MHK dargestellt. Bis auf A. baylyi BD413 GFP 652 bei Fosfomycin, lag die MSC stets unter der MHK. Dort lag die MSC mit 40 mg/l 8 mg über der MHK mit 32 mg/l. Bei Meropenem, Levofloxacin und Clindamycin lagen bei allen getesteten Stämmen die MHK und die MSC sehr nahe beieinander. Nur bei Piperacillin war für A. baylyi BD413 GFP 652 die MHK achtmal höher als die MSC. Bei A. baylyi BD413 mCherry 777 waren die Verhältnisse alle relativ niedrig mit 1,22 bis 10,53. Die Stammkombinationen mit dem Resistenzplasmid pHHV216 wiesen ebenfalls keine Extreme auf, auch wenn sich das Feld mit einem Verhältnis von 4 bei Benzalkoniumchlorid zu fast 45 bei Sulfadiazin etwas weiter aufspreizt. Bei A. baylyi BD413 GFP 807 lagen die Werte für MSC und MHK bei Fosfomycin, Levofloxacin, Meropenem und Clindamycin sehr nahe zusammen. Die Verhältnisse bei Chloramphenicol bei A. baylyi BD413 GFP 652 und A. baylyi BD413 GFP 807 waren auffällig hoch. Die beiden sehr langsam wachsenden Stämme, A. baylyi BD413 mCherry 777 und die Stämme mit pHHV216, wiesen hingegen im Vergleich keine Extreme auf. Das Verhältnis der MSC und MHK der Kombination von TET und Sulfadiazin wurde nicht in die Tabelle aufgenommen, da sich das Verhältnis veränderte, je nachdem welche MHK man berücksichtigte. Denn wenn man die MHK von Tetracyclin verwendet hätte, wäre man bei einer zehnfach niedrigeren MSC zur MHK. Bei der MHK von Sulfadiazin als Grundlage, wäre die MSC vierzigfach niedriger als die MHK, was klar zeigt, dass die MSCs von Substanzkombinationen niedriger lagen als die MSCs von Einzelsubstanzen.

Tabelle 20: Verhältnis von Minimaler Selektiver Konzentration (MSC) zu Minimaler Hemmkonzentration (MHK) für verschiedene Varianten und Kombinationen von *Acinetobacter baylyi* BD413. Dabei beziehen sich die MSC-Werte auf die Kombination der Stämme *A. baylyi* BD413 GFP und *A. baylyi* BD413 GFP und *A. baylyi* BD413 GFP pHHV216 und *A. baylyi* BD413 mCherry, *A. baylyi* BD413 GFP und *A. baylyi* BD413 mCherry 652, *A. baylyi* BD413 GFP und *A. baylyi* BD413 mCherry 777, *A. baylyi* BD413 GFP 807 und *A. baylyi* BD413 mCherry. Die Kombinationen werden in der Tabelle durch den jeweils resistenten Stamm repräsentiert. Die MHK für die Berechnung wurde vom jeweils sensiblen Stamm verwendet. Als Beispiel, in der Kombination *A. baylyi* BD413 GFP und *A. baylyi* BD413 mCherry pHHV216 wird die MHK von *A. baylyi* BD413 GFP und die MSC von *A. baylyi* BD413 mCherry pHHV216 für die Berechnung des MSC/MHK-Verhältnisses herangezogen. Nicht getestete Substanzen sind mit einem "-" gekennzeichnet.

| MSC/MHK                           | Acinetobacter baylyi BD413 |             |                |            |
|-----------------------------------|----------------------------|-------------|----------------|------------|
| Antibiotisch wirksame<br>Substanz | GFP/<br>mCherry<br>pHHV216 | GFP<br>652  | mCherry<br>777 | GFP<br>807 |
| Piperacillin                      | -                          | 0,13        | 0,10           | 0,0007     |
| Chloramphenicol                   | 0,09                       | 0,000000005 | 0,16           | 0,000007   |
| Fosfomycin                        | -                          | 1,25        | 0,37           | 0,57       |
| Levofloxacin                      | -                          | 0,84        | 0,82           | 0,51       |
| Meropenem                         | -                          | 0,56        | 0,28           | 0,45       |
| Clindamycin                       | -                          | 0,49        | 0,58           | 0,23       |
| Tetracyclin                       | 0,09                       | -           | -              | -          |
| Sulfadiazin                       | 0,02                       | -           | -              | -          |
| Benzalkoniumchlorid               | 0,25                       | -           | -              | -          |
| Erythromycin                      | 0,06                       | -           | -              | -          |

# 3.12 Sequenzierung und manuelle Vervollständigung des Genoms von Staphylococcus argenteus BN 75

Für eine vollständige Sequenzierung des Genoms von S. argenteus BN75 wurde dessen DNA mit Hilfe des Masterpure<sup>TM</sup> Complete DNA and RNA Purification Kit aufgereinigt. Nach der Vermessung im NanoDrop wurde die DNA im MiSeq sequenziert und das Genom de novo mit Spades (Vers. 3.5.0) und Abacas (Vers. 1.3.1) zusammengesetzt. Die Assembly konnte das Genom nicht vollständig zusammenfügen und lies mehrere Lücken zwischen den einzelnen, großen Abschnitten offen. Um diese Lücken zu schließen wurden, nach Blast der einzelnen Contigs gegen ein Referenzgenom (S. argenteus MSHR1132), die 15 folgenden Primerpaare erstellt: node\_15\_51\_for/rev; node\_15\_52\_for/rev; node\_15\_53\_for/rev; node 1 9 for/rev; node\_9\_13\_for/rev; node\_3\_4\_for/rev; node 4 2cr for/rev; node 2cr 6 for/rev; node 6 7 for/rev; node\_7\_11\_for/rev; node 11 8 for/rev; node\_8\_12cr\_for/rev; node\_12cr\_5\_for/rev; node\_5\_1\_for/rev; node\_13\_10\_for/rev. Die Primer sind Tabelle 8 zu entnehmen. Die PCR-Produkte wurden mittels GeneJet<sup>™</sup> PCR Purification Kit aufgereinigt und auf einem Agarosegel überprüft, bevor sie seguenziert wurden. Das so zusammengesetzte Genom des Stammes S. argenteus BN75 ist unter der GenBank accession no. NZ CP015758 zu finden

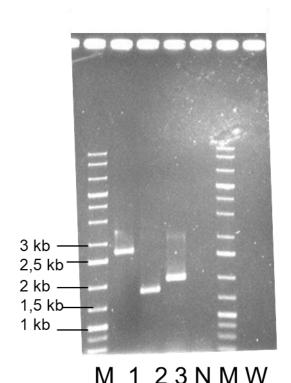


Abbildung 30: 1 %iges Agarosegel nach einer Laufzeit von 2 h bei 110 V mit den aufgereinigten PCR-Produkten der Amplifikation genomischer DNA von Staphylococcus argenteus BN75.
M: Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder
1: Primer Node\_1\_9\_for/rev
2: Primer Node\_7\_11\_for/rev

N: Negativkontrolle W: Wasserkontrolle

3: Primer Node3\_4\_for/rev

# 3.13 Genomanalyse von *Staphylococcus argenteus* BN 75 mit Fokus auf Virulenzfaktoren.

Um den Verwandtschaftsgrad zweier Individuen zu bestimmen, wird bei Bakterien die durchschnittliche Übereinstimmung der Nukleotide (engl.: "Average Nucleotide Identity [ANI]") der Genome herangezogen. Innerhalb einer Art herrscht in der Regel eine ANI von mehr als 95 %. Isolat BN75 hat nur eine ANI von 87,14 % zu S. aureus N315 und eine ANI von 92,17 % zu S. schweitzeri FSA084TT. Dementsprechend ist er weder der Art S. aureus noch S. schweitzeri zuzuordnen. Die WGS ergab aber eine ANI von 99,11 % zu S. argenteus MSHR1132, dem Typstamm von S. argenteus. Folglich kann das Isolat BN75 der Art S. argenteus zugeordnet werden. Das 2.754.198 bp umfassende Genom von S. argenteus BN75 hat 8587 bp weniger als das von S. argenteus MSHR1132 (GenBank accession no. FR821777.2). Das Genom von S. argenteus BN75 wurde sowohl manuell als auch mit Hilfe der Programme Resfinder 3.2 und VirulenceFinder 2.0 analysiert. Es konnten keine Gene, die eine AR vermitteln und nur sehr wenige Virulenzgene gefunden werden. Die Unterschiede im Genom von S. argenteus BN75 und S. argenteus MSHR1132 ergeben sich hauptsächlich aus dem Fehlen von Antibotikaresistenzen und Virulenzgenen. Auch die für Methicillin-resistente Staphylokokken typische SCCmec-Kassette fehlt bei S. argenteus BN75. S. argenteus MSHR1132 dagegen besitzt im orfX eine Typ IV SCCmec-Kassette und ein CRISPR-System. Wie in Abbildung 31 A zu sehen ist, befindet sich im orfX von S. argenteus BN75 stattdessen ein 6 kb großes Fragment mit einem Restriktionsenzymsystem

und weiteren hypothetischen Proteinen. Bei beiden Stämmen endet dieser Abschnitt mit transfer-RNA(tRNA)-Dihydrouridin-Synthase. einer Das Biosynthesecluster für Staphyloxanthin fehlt ebenfalls. Einer der wenigen vorhandenen Virulenzfaktoren bei S. argenteus BN75 ist das α-Hämolysin. Das Gen hlb für das β-Hämolysin ist zwar im Genom von S. argenteus BN75 vorhanden, allerdings funktionslos, da dort ein Phage sitzt. Dieser ist phiNM3 sehr ähnlich und steuert die Immunevasionsgene sak (Staphylokinase), scn (Staphylokokken-Komplement-Inhibitor) und chp (Chemotaxis-Inhibitor-Protein) bei. Die für den Phagen phiNM3 typischen Gene für Enterotoxine fehlen allerdings. Ein zweiter Phage konnte sich ebenfalls ins Genom von S. argenteus BN75 integrieren. Er gehört zu den phiETA3 ähnlichen Phagen, jedoch fehlt das charakteristische Exfoliativtoxin. Weiterhin enthält das Genom von S. argenteus BN75 ein Gencluster für Kapselgene, die Sortase srtA und die zwei Gene mprF und dltA zur Senkung der negativen Ladung der Zellhülle. Auch das Biofilmcluster ica und die drei genomischen Inseln vSAα, vSAβ und vSAγ finden sich bei S. argenteus BN75. Auf der ca. 25 kb umfassenden vSAα sind die Gene für vier Exotoxinähnliche Proteine, elf Lipoproteine und ein Superantigen-ähnliches Protein vorhanden. Das für vSAa typische Bacteriocin-Biosynthesecluster ist nicht vorhanden. Wie Abbildung 31 B zu entnehmen, ist vSAβ bei *S. argenteus* BN75 nur teilweise vorhanden. Restriktionsmodifikationssystem hsdSM ist zwar vorhanden, dafür fehlen aber einige Gene, die in vielen aber nicht allen S. aureus-Stämmen vorhanden sind, wie z. B. die charakteristischen Enterotoxine. Das Gen für das Leukotoxin LukD ist trunkiert, da nach der entsprechenden Ribosomenbindestelle nur der carboxy-terminale Teil vorhanden ist. Das Ende von vSAß bilden in beiden Stämmen tRNAs. Die dritte genomische Insel vSAy ist vollständig vorhanden und enthält die Gene für drei Exotoxin-ähnliche Proteine, das α-Toxin und alle bekannten β-PSMs. Die α-PSMs PSM1-4 sind in der Nachbarschaft von vSAα zu finden. Der bekannteste Vertreter der  $\alpha$ -PSMs, das  $\delta$ -Toxin, ist ebenfalls im Genom von S. argenteus BN75 zu finden. Das Typ VII Sekretionssystem (ess/esx) ist in S. argenteus BN75 nur teilweise vorhanden. Wie Abbildung 31 C zu entnehmen, fehlen die Gene esaC, esxB, esaE und essD. An ihrer Stelle sitzt eine Transposase. Interessanterweise konnten noch die Biosynthesegene für ein Siderophor und das Gencluster für die Biosynthese von Aureusimin im Genom von S. argenteus BN75 gefunden werden. Aus den Daten der WGS wurde S. argenteus BN75 der SPA-Typ t7462 mit den Repeats 259-23-23-17-17-17-23-23-23-17-16 und der MLST-Typ ST2198 zugewiesen.

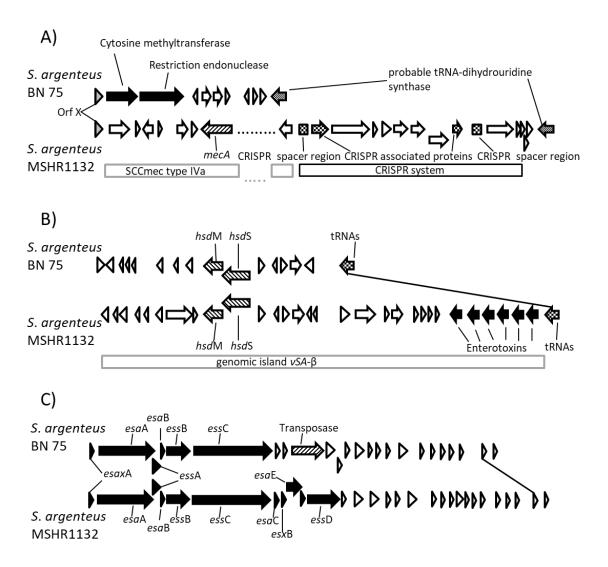


Abbildung 31: Vergleich ausgewählter Genomabschnitte von *S. argenteus* BN75 (BN75) und *S. argenteus* MSHR1132 (MSHR1132). Die Linien definieren das Ende des Abschnitts im jeweiligen Abschnitt, ab diesem Punkt sind beide Genome wieder gleich. Weiße Pfeile repräsentieren hypothetische Gene. A) Bei BN75 ist ein Modifikationsrestriktionssystem (schwarze Pfeile) in orfX integriert. Bei *S. argenteus* MSHR1132 hingegen sitzt dort eine SCCmec-Kassette mit dem Gen *mec*A (schraffierter Pfeil), welches eine Methicillinresistenz vermittelt und ein CRISPR-System. B) Die genomische Insel vSAβ ist bei BN75 nur teilweise vorhanden. Es fehlen vor allem die charakteristischen Enterotoxine (schwarze Pfeile). C) Im ess/esx Typ VII Sekretionssystem (schwarze Pfeile) fehlen BN75 4 Gene. Stattdessen sitzt dort eine Transposase (schraffierter Pfeil). Abbildung aus Schuster et al. (2017).

# 3.14 Nachweis von *Staphylococcus argenteus* und Differenzierung gegenüber anderen nahen verwandten Staphylokokken via MALDI-TOF MS

Automatische MALDI-TOF-MS-Systeme, wie das Vitek MS mit MYLA-Software, waren zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit nicht in der Lage die Spezies *S. argenteus* und *S. schweitzeri* zuverlässig zu erkennen. Außerdem war auf diesen automatischen Systemen keine verlässliche Differenzierung der beiden Arten im Vergleich zu *S. aureus* möglich. Deshalb wurden manuelle MALDI-TOF-MS-Spektren auf einem anderen MALDI-TOF-MS (Bruker Biflex III) zur Überprüfung angefertigt. Diese Spektren wiesen zwar viele

Gemeinsamkeiten zu *S. aureus* auf, aber auch Verschiebungen von charakteristischen Maxima (Abbildung 32).

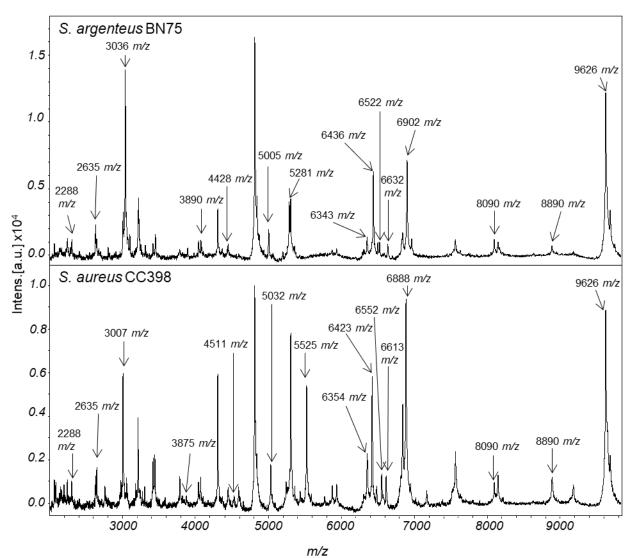


Abbildung 32:Vergleich der beiden Massenspektren von *S. argenteus* BN75 und *S. aureus* CC398. Für diese Abbildung wurden jeweils die beiden Spektren von Ethanol-Extraktion und direkter Applikation von Zellmaterial kombiniert um die maximale Anzahl an Signalen darzustellen. Eine detaillierte Übersicht der charakteristischen Verschiebung der Signale befindet sich in Tabelle 12. Abbildung aus Schuster et al. (2017).

Wie in Abbildung 32 zu sehen, gibt es in den Spektren BN75 und *S. aureus* CC398 einige Signale die gleich sind. So sind u. a. die α-PSMs PSM1-4 vorhanden und zeigen mit einem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) 2288 für α-PSM1, mit m/z 2306 für α-PSM2, mit m/z 2635 für α-PSM3, mit m/z 2228 für α-PSM4 die identischen Maxima für beide Stämme. Wie in Tabelle 21 dargestellt, können auch einzelne Maxima innerhalb einer Spezies abweichen, so sind z. B. für das hypothetische Protein SAR1012 alleine in *S. aureus* drei verschiedene Varianten mit Massen von 4484 Dalton (Da) bis 4510 Da beobachtet worden (Josten et al., 2013). Bei der Spezies *S. argenteus*, hier repräsentiert durch BN75, gibt es allerdings mehrere Verschiebungen von Maxima, im Vergleich zu denen von *S. aureus*. Und auch die

Spektren von S. schweitzeri enthalten nochmals Abweichungen von den anderen beiden Spezies. Mit dem Ziel möglichst charakteristische Verschiebungen zur Unterscheidung der drei Arten zu finden, wurden die zugrundeliegenden Peptide auf Grundlage der bereits publizierten Signale von S. aureus (Josten et al., 2013) verglichen. Ihre verschiedenen Isoformen in den drei Spezies sind in Tabelle 21 zu finden. Obwohl es sich bei allen drei Arten um nahe verwandte Staphylokokken handelt, weisen ihre Spektren dennoch viele Unterschiede auf. Deshalb wird im Folgenden nur auf die für die Unterscheidung der Arten wichtigsten Signale eingegangen. Besonders auffällig ist die Verschiebung des Signals für das δ-Toxin von *m/z* 3006 für *S. aureus* zu *m/z* 3036 für *S. argenteus*. In den Spektren von S. schweitzeri liegt das δ-Toxin ebenfalls bei m/z 3006 und ist damit nur zur Unterscheidung zu S. argenteus geeignet. Das zweite wichtige Maximum ist das hypothetische Protein SAR1012, welches in Abbildung 32 bei m/z 4511 für S. aureus und m/z 4428 für S. argenteus zu sehen ist. Bei S. schweitzeri ist SAR1012 bei m/z 4502 oder m/z 4525 in den Spektren zu sehen und unterscheidet sich damit eindeutig von denen der beiden anderen Spezies. Als dritter Marker kann das hypothetische Stressprotein SAS049 herangezogen werden. Auch wenn sich S. argenteus und S. schweitzeri das Signal bei m/z 5282 teilen, grenzen sie sich damit zu S. aureus bei m/z 5525 gut ab. Wie ebenfalls in Abbildung 32 dargestellt, wäre theoretisch das Protein GraF, mit einer Verschiebung des Signals von m/z 5005 bei BN75 zu m/z 5032 bei S. aureus, geeignet. Aber wie Tabelle 21 zu entnehmen ist, kann das in die Resistenz gegen Glycopeptidantibiotika involvierte GraF (Cui et al., 2005) bei S. aureus auch bei m/z 5001 in MALDI-TOF-MS-Spektren zu sehen sein: Dies macht GraF ungeeignet, da eine eindeutige Unterscheidung erschwert ist. Wie GraF waren auch die anderen gelistete Signale in Tabelle 21 nicht eindeutig genug zu unterscheiden oder nur sehr stammspezifisch zu differenzieren und damit ungeeignet für allgemein gültige Marker zur Diskriminierung der drei Spezies.

## Ergebnisse

Tabelle 21: Vergleich verschiedener Isoformen von charakteristischen Peptiden in Massenspektren für die Spezies *Staphylococcus aureus*, *S. argenteus* und *S. schweitzeri*, sowie die Verschiebung deren Maxima. Die Peptide von *S. aureus* wurden aus Josten et al., 2013 entnommen.

| Gen      | Stamm                                     | Aminosäuresequenz  | Molekular-<br>gewicht [DA] |
|----------|---|--|----------------------------|
| α-PSM1   | S. aureus / S. schweitzeri / S. argenteus | fMGIIAGIIKVIKSLIEQFTGK   | 2288                       |
| α-PSM 3  | S. aureus / S. schweitzeri / S. argenteus | fMEFVAKLFKFFKDLLGKFLGNN  | 2635                       |
| δ-Toxin  | S. aureus /<br>S. schweitzeri             | fmaqdiisti <b>g</b> dlvkwiidtvnkftkk   | 3007                       |
|          | S. argenteus                              | fmaqdiisti <b>s</b> dlvkwiidtvnkftkk   | 3037                       |
| SA2420.1 | S. aureus                                 | fMKKLAVILTLVGGLY <b>F</b> AFKKYQERVNQAPNIEY  | 3875                       |
|          | S. aureus / S. schweitzeri / S. argenteus | fmkklaviltlvggly <b>y</b> afkkyqervnqapniey  | 3891                       |
| RpmJ     | S. aureus / S. schweitzeri / S. argenteus | MKVRPSVKPICEKCKVIKRKGKVMVICENPKHKQRQG  | 4305                       |
| SAR1012  | S. aureus                                 | fmrQfik <b>ri</b> vk <b>t</b> il <b>v</b> gyvikfir <b>n</b> kls <b>g</b> kssh <b>pt</b> dn <b>k</b> h <b>k</b> | 4510                       |
|          | S. aureus                                 | fmrQfikrtvktilvgyvikfirnklsgksshptdnkhn  | 4484                       |
|          | S. aureus                                 | fmrQfikriVkTilvGyvikfirnklsgksshPTdnkhn  | 4496                       |
|          | S. schweitzeri                            | fmrrfikkiakailigyvikfir <b>q</b> kls <b>d</b> kssh <b>ps</b> dn <b>q</b> hk                                    | 4524                       |
|          | S. schweitzeri                            | fmrrfikkiakailigyvikfir <b>q</b> kls <b>d</b> kssd <b>ps</b> dn <b>q</b> hk                                    | 4502                       |
|          | S. argenteus                              | fmrQfikKiAkAiligyvikfirQklsGksshSsdnQhK  | 4428                       |
| GraF     | S. aureus                                 | Snen <b>q</b> nkkaaekakeveeklkdkke <b>e</b> ktedi <b>n</b> qtkqdiqdtl <b>n</b>                                 | 5031                       |
|          | S. aureus                                 | Snen <b>q</b> nkkaaekakeveeklkdkke <b>v</b> ktedi <b>n</b> qtkqdiqdtl <b>n</b>                                 | 5001                       |

# Ergebnisse

|        | S. schweitzeri                   | TNEDKNKKAAEKAKEVEEKLKDKKE <b>E</b> KTDDI <b>n</b> QTKQDIQDTL <b>S</b>   | 5005 |
|--------|----------------------------------|---|------|
|        | S. schweitzeri                   | TNEDKNKKAAEKAKEVEEKLKDKKE <b>E</b> KTDDI <b>Y</b> QTKQDIQDTLS   | 5046 |
|        | S. schweitzeri                   | SNEDKNKKAAEKAKEVEEKLKDKKE <b>E</b> KTDDI <b>n</b> QTKQDIQDTLS   | 4991 |
|        | S. argenteus                     | <b>A</b> NED <b>Q</b> NKKAAEKAKEVEEKLKDKKE <b>E</b> KTDDI <b>N</b> QTKQDIQDTL <b>N</b>                                | 5005 |
| SAS049 | S. aureus                        | SFMDKAKDAVEKFKNSDNEQVKNVKDKINEYTGSNNEEKKE <b>N</b> EDKEK  | 5524 |
|        | S. schweitzeri /                 | SFMDKAKDAVDKFKNSDNEQVQKVKDKINEYTGSNKEEKKE <b>D</b> EDK  | 5282 |
| D -    | S. argenteus                     |   |      |
| RpmF   | S. aureus / S. schweitzeri /     | AVPKRRTSKTRKNKRRTHFKISVPGMTEC <b>P</b> NCGEYKLSHRVCKNCGSYNGEEVAAK   | 6353 |
|        | S. argenteus                     |   |      |
|        | S. argenteus                     | AVPKRRTSKTRKNKRRTHFKISVPGMTEC <b>S</b> NCGEYKLSHRVCKNCGSYNGEEVAAK   | 6343 |
| RpmD   | S. aureus                        | AKLQITLTRSVIGRPETQRKTVEALGLKKTNSSVVVEDNPAIRGQINKVKHL <b>V</b> TVEEK   | 6422 |
|        | S. schweitzeri /<br>S. argenteus | AKLQITLTRSVIGRPETQRKTVEALGLKKTNSSVVVEDNPAIRGQINKVKHL L TVEEK  | 6437 |
| SA1452 | S. aureus                        | ADESKFDQFKGNVKETVGNVTDNKELEKE <b>G</b> QQDKA <b>T</b> GKAKEVVENAKNKITDAIDKLKK   | 6551 |
|        | S. schweitzeri / S. argenteus    | ${\tt ADESKFDQFKGNVKETVGNVTDNKELEKE} {\tt G} {\tt QEDKA} {\tt A} {\tt GKAKEVVENAKNKITDAIDKLKK}$                       | 6522 |
|        | S. schweitzeri                   | ADESKFDQFKGNVKETVGNVTDNKELEKE <b>R</b> QEDKA <b>A</b> GKAKEVVENAKNKITDAIDKLKK   | 6621 |
| graC   | S. aureus                        | PIVNVKLLEGRSDEQLKNLVSE $oldsymbol{v}$ TDAVEKTTGANRQAIHVVIEEM $oldsymbol{k}$ P $oldsymbol{n}$ HYGVAGVRKSDQ             | 6612 |
|        | S. schweitzeri /<br>S. argenteus | PIVNVKLLEGRSDEQLKNLVSE <b>V</b> TDAVERTTGANRQAIHVVIEEM <b>Q</b> P <b>S</b> RYGVAGVRKSDQ                               | 6632 |
|        | S. schweitzeri                   | ${\tt PIVNVKLLEGRSDEQLKNLVSE1TDAVERTTGANRQAIHVVIEEM} {\tt QPN} {\tt RYGVAGVRKSDQ}$                                    | 6674 |
|        | S. schweitzeri                   | PIVNVKLLEGRSDEQLKNLVSE <b>I</b> TDAVERTTGANRQAIHVVIEEM <b>Q</b> P <b>S</b> RYGVAGVRKSDQ                               | 6647 |
| SA0772 | S. aureus                        | ADESKFEQAKGNVKETVGNVTDNK N LENEGKEDKASGKAKEFVENAKEKAT D FIDKVKGNKGE   | 6888 |
|        | S. schweitzeri /<br>S. argenteus | ADESKFEQAKGNVKETVGNVTDNK D LENEGKEDKASGKAKEFVENAKEKAT E FIDKVKGNKGE   | 6903 |
|        | S. argenteus                     | ${\tt ADESKFEQAKGNVKETVGNVTDNK} \textbf{D} {\tt LENEGKEDKASGKAKEFVENAKEKAT} \textbf{\underline{D}} {\tt FIDKVKGNKGE}$ | 6888 |
| RpmC   | S. aureus /                      | ${\tt MKAKEIRDLTTSEIEEQIKSSKEELFNLRFQLATGQLEETARIR} {\bf T} {\tt VRKTIARLKTVAREREIEQSKANQ}$                           | 8090 |
|        | I                                | 1   | I    |

# Ergebnisse

|           | S. schweitzeri/  |   |       |
|-----------|------------------|---|-------|
|           | S. argenteus     |   |       |
| RpsT      | S. aureus /      |   |       |
|           | S. schweitzeri / | ANIKSAIKRVKTTEKAEARNISQKSAMRTAVKNAKTAVSNNA <b>D</b> NKNELVSLAVKLVDKAAQSNLIHSNKADRIKSQLMTANK   | 8890  |
|           | S. argenteus     |   |       |
|           | S. schweitzeri   | ANIKSAIKRVKTTEKAEARNISQKSAMRTAVKNAKTAVSNNA <b>E</b> NKNELVSLAVKLVDKAAQSNLIHSNKADRIKSQLMTANK   | 8904  |
| HUP       | S. aureus /      |   |       |
|           | S. schweitzeri/  | MNKTDLINAVAEQADLTKKEAGSAVDAVFESIQNSLAKGEKVQLIGFGNFEVRERAARKGRNPQTGKEIDIPASKVPAFKAGKALKDAVK  | 9626  |
|           | S. argenteus     |   |       |
| RpsP      | S. aureus /      |   |       |
|           | S. schweitzeri/  | AVKIRLTRLGSKRNPFYRIVVADARSPRDGRIIEQIGTYNPTS <b>A</b> NAPEIKVDEALALKWLNDGAKPT <b>D</b> TVHNILSKEGIMKKFDEQKKAK  | 10104 |
|           | S. argenteus     |   |       |
| S. aureus |                  | AVKIRLTRLGSKRNPFYRIVVADARSPRDGRIIEQIGTYNPTS A NAPEIKVDEALALKWLNDGAKPTY TVHNILSKEGIMKKFDEQKKAK   | 10152 |
|           | S. schweitzeri   | $\textbf{AVKIRLTRLGSKRNPFYRIVVADARSPRDGRIIEQIGTYNPTS} \textbf{\textit{V}} \textbf{NAPEIKVDEALALKWLNDGAKPT} \textbf{\textit{D}} \textbf{TVHNILSKEGIMKKFDEQKKAK}$ | 10132 |

## 4. Diskussion

# 4.1 Bestimmung der Minimalen Selektiven Konzentration

#### 4.1.1 Konstruktion des Testsystems

In dieser Arbeit konnte anhand der aufgestellten Kriterien erfolgreich ein gramnegatives Testsystem zu Ermittlung von MSCs erstellt werden. Hierfür wurden aus dem Elternstamm A. baylyi BD413 mittels Fluoreszenzkassetten die Stämme A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry konstruiert. Der verwendete pT5x Bakteriophagenpromotor steht im ursprünglichen Plasmid pEPSA5 unter der Kontrolle des Xyloserepressors xylR (Forsyth et al., 2002). Dieser kann in pEPSA5 durch Zugabe von Xylose inaktiviert und so pT5x aktiviert werden. Üblicherweise werden die Gene unter der Kontrolle von pT5x in pEPSA5 erst in einer späteren Wachstumsphase aktiviert, um eine eventuelle Zytotoxizität seitens der klonierten Gene zu vermeiden. In den in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzgenkassetten ist pT5x aber immer aktiv, weshalb die Fluoreszenzgene ständig in einem Übermaß exprimiert werden, was eine Klonierung der Kassette in ein Multicopy-Plasmid vermutlich verhindert hat. Denn auch Fluorophore wie GFP können bei zu starker Expression zytotoxisch werden (Ansari et al., 2016; Ganini et al., 2017). Die Überexpression der Farbstoffe zeigt sich sehr gut in den stark pigmentierten Kolonien. Wie in Abbildung 15 dargestellt, bilden die Stämme mit GFP grüne und solche mit mCherry rote Kolonien, so dass die Stämme mit bloßem Auge bereits voneinander differenziert werden können. Wenn die Fluorophore nicht so stark überexprimiert werden, sind die Stämme normalerweise nicht anhand ihrer Koloniefarbe von ihrem Elternstamm zu unterscheiden. Die Differenzen zeigen sich erst dann, wenn die Fluorophore angeregt werden und entsprechend leuchten. Wie in Abbildung 29 A zu sehen, färben die in dieser Arbeit erzeugten Stämme sogar die Kultur entsprechend ihrer Farbe, wenn sie ÜN in 5 ml LB oder MH bebrütet werden. Dieser Effekt bleibt auch bei den abgeernteten Zellpellets (Abbildung 29 B) und sogar bei den fixierten Pellets (Abbildung 29 C) bestehen. Durch dieses Übermaß an Farbstoff waren die Zellen sehr gut für ein Auszählen per Durchflusszytometrie geeignet und der Umschlagspunkt der MSC ließ sich bereits beim Abernten der Zellen grob einschätzen. Die verwendete Resistenzkassette zur Erstellung der beiden Stämme enthält zur Selektion eine Spectinomycinresistenz. Auch wenn Spectinomycin streng genommen wegen des fehlenden Aminozuckers kein echtes Aminoglykosid ist, wird es dennoch zu diesen gezählt (Jiang et al., 2020). Die in dieser Arbeit verwendete Resistenzkassette kodiert ANT(9), welches durch die Addition eines Adenosinmonophosphats (AMP) Spectinomycin inaktiviert. Der genaue Angriffsort an Molekül ist in Abbildung 38 dargestellt.

**SPECTINOMYCIN** 

Abbildung 33: Strukturformel von Spectinomycin und den Angriffsorten von zwei modifizierenden Enzymen. In grün und rot sind die beiden Enzyme und ihre jeweiligen Modifikationen dargestellt. ANT(9) addiert ein Adenosinmonophosphat (AMP) und APH(9) eine Phosphategruppe (PO<sub>3</sub>) Abbildung modifiziert nach Ramirez et al. (2010).

Durch diese Addition wird die Bindung des AB an die 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen verhindert und es kann die Translation nicht mehr beinträchtigen (Kleinert et al., 2017; Ramirez et al.,

2010). ANT(9) vermittelt zwar eine Resistenz gegen Spectinomycin, aber nicht gegen Streptomycin (Kleinert et al., 2017). Außerdem ist ANT(9) vorwiegend bei grampositiven Erregern wie S. aureus zu finden (Ramirez et al., 2010). Bei gramnegativen Isolaten ist hingegen vor allem die Aminoglycosid-6'-N-Acethyltransferase des Typ Ib [AAC(6')-Ib] (AAC6) zu finden. Dieses inaktiviert das AB mittels Acetylierung und verhindert somit ebenfalls die Bindung an die 30S-Untereinheit der Ribosomen. AAC6 kann auch Amikacin zuverlässig inaktivieren (Ramirez et al., 2017), was bei ANT(9) nicht der Fall zu sein scheint, da wie in Tabelle 13 und Tabelle 16 zu sehen, die MHK für Amikacin für A. baylyi BD413 und alle Varianten gleich war. Dementsprechend ist nicht davon auszugehen, dass die verwendete Resistenzkassette gegen Spectinomycin Einfluss auf die durchgeführten Experimente, insbesondere die MSCs hat.

Das Gen *lip*A wurde für die Integration der Fluoreszenzkassette gewählt, da dessen Produkt, eine extrazelluläre Lipase, für *A. baylyi* BD413 im Labor nicht existenziell ist. Auf den verwendeten üblichen Nährmedien wie MH oder LB wuchsen die Varianten von *A. baylyi* BD413 sehr gut. Zusätzlich erhöht sich mit der Inaktivierung von *lip*A die Biosicherheit der erzeugten Organismen, da die Lipase einen wichtigen Faktor zum Überleben in der Umwelt darstellt (Kok et al., 1995). Bei *A. baumannii* konnte außerdem eine verringerte Virulenz durch die Deaktivierung von *lip*A oder dessen Typ II-Sekretionssystems nachgewiesen werden (Johnson et al., 2016).

Bei der Suche nach einem passenden natürlichen Resistenzplasmid für das Testsystem wurden zur Selektion Chromagar ESBL-Platten verwendet. Denn diese bieten neben der Selektion noch den Vorteil, dass sie verschiedene Bakterienspezies unterschiedlich anfärben, z. B. *Klebsiellen* bilden blaue und *Acinetobacter* cremefarbene Kolonien. Dies bietet einen zusätzlichen Schutz zum Erkennen von Kontamination oder dem Verschleppen des Donorstammes.

#### 4.1.2 Antimikrobielle Substanzen

Neben AB wurden auch antimikrobielle Substanzen wie Benzalkoniumchlorid in dieser Arbeit getestet, da die Resistenzen gegen AB und Desinfektionsmittel oft als Kreuz-, Co- oder Multiresistenz auftreten, besonders wenn Effluxpumpen involviert sind oder die Resistenzgene auf einem Klasse I Integron liegen. Benzalkoniumchlorid gehört als Vertreter der quartären Ammonium Verbindungen zu den wichtigsten und meistgenutzten Desinfektionsmitteln. Es kommt vorwiegend in Krankenhäusern zum Einsatz, aber besonders während der Covid-19-Pandemie fand es ubiquitär Anwendung und ist spätestens seitdem verstärkt im Abwasser und der Umwelt zu finden (Knauf et al., 2018; Tandukar et al., 2013; Uppalapati et al., 2020; Yang et al., 2023). Benzalkoniumchlorid kann dabei wie ein AB auch ARB und Resistenzgene selektieren. So konnte z. B. für Klärschlamm ein Anstieg um das Zwei- bis Dreifache der Resistenzgene gegen AB in Xiamen (China) festgestellt werden (Yang et al., 2023). Nicht nur diese Kurzzeitexperimente, sondern, auch Langzeitstudien, belegen eine Zunahme von ARB in der Mikrobiozönose durch die Anwesenheit von Benzalkoniumchlorid (Tandukar et al., 2013). Diese Formung der Mikrobengesellschaft kann durch verschiedene Arten der Resistenz vonstattengehen und bevorzugt multiresistente Isolate hervorbringen. Zum einen bei der Kreuzresistenz von Benzalkoniumchlorid und AB, z. B. durch Effluxpumpen, zum anderen bei Co-Resistenz, vermittelt durch Plasmide, Transposons etc., die neben den Genen für die Resistenz gegen AB zusätzliche gegen Benzalkoniumchlorid besitzen (Yang et al., 2023). Ein wichtiger Vertreter sind die gac Gene, die mittels Effluxpumpen in verschiedenen Ausführungen Resistenzen vermitteln. Bei klinisch assoziierten Staphylokokken spielen in diesem Zusammenhang Resistenzplasmide, wie pST6, pSK4 oder pSK41, eine große Rolle. Sie enthalten neben gacA, gacB und gacC auch Resistenzgene gegen Gentamicin, Penicillin, Kanamycin oder Tobramycin (Zmantar et al., 2011). Aber auch für A. baumannii und andere nosokomiale, gramnegative Erreger sind die qac Gene sehr relevant. (Gomaa et al., 2017; Knauf et al., 2018; Uppalapati et al., 2020 Yang et al., 2023). Dort sind die entsprechenden Gene dank der Klasse I Integrons weit verbreitet. Diese sind meist Plasmid basiert und enthalten die Gene  $qac \to 1$  und beherbergen Resistenzgene gegen Aminoglykoside, Trimethoprim. Chloramphenicol oder β-Lactame. Die gac Gene fallen unter die Co-Resistenz, da sie auf dem gleichen mobilen genetischen Element liegen wie Antibiotikaresistenzgene, weshalb bereits niedrige Konzentrationen von Benzalkoniumchlorid auch ARB selektieren können (Gomaa et al., 2017; Yang et al., 2023).

Genauso wie Desinfektionsmittel können auch Schwermetalle ARB selektieren. Dabei fallen sie meistens unter die Co-Resistenz, da sie oft auf mobilen genetischen Elementen, wie Integrons und Plasmiden vertreten sind (Bazzi et al., 2020; Fayad et al., 2020; Timková et al., 2023, Zack et al., 2024). Bei *Acinetobacter spp.* sind für die Schwermetallresistenz

hauptsächlich die Effluxpumpen verantwortlich. Dabei gibt es bei dieser Spezies solch eine Vielzahl an unterschiedlichen Pumpen, dass die Schwermetallexporter (HME engl.: "heavy metal efflux") sogar eine eigene Kategorie sind. Sie bilden mit den Effluxpumpen für hydrophobe und amphiphile Stoffe (HAE) die Gruppe der RND-Transporter. Membranproteine aus dieser Superfamilie spielen eine signifikante Rolle in der Vermittlung von Resistenzen gegen AB (Abdi et al., 2020; Coyne et al., 2011; Klenotic et al., 2022). Aus dieser riesigen Gruppe sei beispielhaft das CzcABCD-Effluxpumpensystem erwähnt. Es ist hauptsächlich für den Export der in dieser Arbeit verwendeten Schwermetalle Kupfer, Zink und Cadmium verantwortlich (Klenotic et al., 2022). Außerdem ist es sowohl bei A. baylyi BD413 als auch bei A. baumannii vorhanden (Darby et al., 2022). Fayad et al. (2020) berichten bei A. baumannii, dass Kupfer, Cobalt, Zink und Cadmium das Potential zur Coselektion einer Resistenz gegen Cefepim, einem Cephalosporin der vierten Generation, haben. Gleiches gilt für Blei bei der Gentamicinresistenz und bei Arsen für eine Resistenz gegen Colistin (Fayad et al., 2020). Bei den Agardiffusionstests zeigten A. baylyi BD413 und seine Varianten quasi keine Inhibierung durch Blei von 10 g/l bis 40 g/l. Lediglich A. baylyi BD413 mCherry 652 und A. baylyi BD413 mCherry 777 wurden bei der höchsten getesteten Konzentration minimal gehemmt (drei mm Hemmhof um das Well herum). Bei den MHKs konnte bis zur maximalen Konzentration von 512 mg/l stets Wachstum beobachtet werden. Eine höhere Bleikonzentration in der MHK war aufgrund der Löslichkeitsgrenze des verwendeten Blei(II)acetats nicht möglich. In einer Goldmine in der Slowakei bei Hodruša-Hámre wurde das Isolat A. johnsonii RB2-47 (RB2-47) gefunden, das eine MHK von 1500 mg/l für Bleiacetat aufweist. Auch wenn es sich bei RB2-47 um eine andere Subspezies handelt, lässt sich dies gut mit unseren Ergebnissen für Blei vereinbaren. Denn die in dieser Arbeit getesteten Stämme wuchsen selbst bei 40 g/l noch sehr gut, auch wenn ein Agardiffusionstest immer mit Vorsicht zu betrachten ist. Andererseits haben die minimalen Hemmhöfe bei A. baylyi BD413 mCherry 652 und A. baylyi BD413 mCherry 777 gezeigt, dass Bleiacetat grundsätzlich in der Lage ist durch den Agar zu diffundieren. Außerdem stellt die Bleiresistenz bei Acinetobacter einen Sonderfall dar, da sie nicht nur auf Effluxpumpen alleine zu beruhen scheint. So konnte gezeigt werden, dass die MHK gegen Blei kaum von Hemmstoffen für Effluxpumpen, wie Carbonylcyanid-3-chlorphenylhdrazon (CCCP), beeinflusst wird, im Gegensatz zur Resistenz gegen Nickel und Zink, deren Aktivität bei Zugabe von CCCP merklich sinkt. CCCP gehört als Protonophor zu Effluxpumpenhemmern, die den elektrochemischen Protonengradienten auflösen, indem sie Protonen in die Zelle zurück transportieren (Timková et al., 2023, Zack et al., 2024). Es ist anzunehmen, dass in den getesteten Stämmen von A. baylyi BD413 bei der Bleiresistenz zusätzlich einer der anderen mannigfaltigen Mechanismen, wie z.B. die Synthese von Organobleiverbindungen durch Methylierung, Bindung in Polysacchariden oder Ausfällung

etc., zum Einsatz kommt. Teilweise sind diese Resistenzmechanismen, wie ein zusätzlicher Exporter und eine Phosphatase, in der Gattung Acinetobacter im pbr-Operon zu finden (Hynninen et al., 2009; Timkova et al., 2023; Bazzi et al., 2020). Bei den anderen drei getesteten Schwermetallen zeigte sich bei den Agardiffusionstests nur eine geringe Inhibierung bei Kupfer, eine etwas stärkere bei Zink und die deutlichste Hemmung mit bis zu 24 mm großen Hemmhöfen bei Cadmium. Die MHKs bestätigen diesen Eindruck mit 128 mg/l für Kupfer, 64 mg/l für Zink und lediglich16 mg/l bei Cadmium. RB2-47 hat mit einer MHK für Kupfer von 500 mg/l und Zink 250 mg/l (Timkova et al., 2023) zwar deutlich höhere Werte, aber das Verhältnis der beiden zueinander ist gleich. Grundsätzlich wird die Aufnahme der für Bakterien wichtigen Übergangsmetalle, wie Cobalt, Kupfer, Eisen, Mangan, Zink etc., über Effluxpumpen reguliert. Diese Metalle spielen als enzymatische Cofaktoren eine wichtige Rolle im bakteriellen Stoffwechsel und sind bei etwa 40 % der Enzyme essentieller Bestandteil, wie z. B. bei der Cu-Zn-Superoxiddismutase oder bei Teilen der prokaryotischen Elektronentransportkette (Klenotic et al., 2022). Acinetobacter ist das einzige Mitglied aus der Familie der Moraxellaceae, das kein Cytochrom C besitzt (Baumann et al., 1968). Obwohl einige Übergangsmetalle, wie Kupfer und Zink, essentiell für die Zellfunktion sind, kann ein Übermaß dennoch schnell toxisch werden. Andere Mitglieder der Übergangsmetalle, wie Blei und Cadmium hingegen, sind immer schädlich (Bazzi et al., 2020). Schwermetalle können zelltoxisch wirken, da sie sehr reaktionsfreudig sind. Sie reagieren u. a. gerne mit häufig vorliegenden Zellbestandteilen wie Thiolen, Imidazolen, Nukleinsäuren, Sulfiden etc. Kupfer kann z. B. auch andere Metallionen aus enzymatischen Komplexen lösen oder extrem reaktive Hydroxyl-Radikale erzeugen, die ihrerseits Proteine, Lipide und die DNA beeinträchtigen können (Klenotic et al., 2022). Interessanterweise konnte für A. baumannii bei Cadmium-induziertem Stress eine Verringerung von Zink und eine gleichzeitige Anreicherung von Kupfer in der Zelle festgestellt werden, um den Protonengradienten aufrechtzuerhalten und damit die Fitness zu erhöhen (Alquethamy et al., 2021).

#### 4.1.3 Wachstumskurven

Für die Charakterisierung der in dieser Arbeit erzeugten Varianten von *A. baylyi* BD413 wurden Wachstumskurven mit allen Stämmen angefertigt. Dabei ging es u. a. darum, welche metabolische Last die Fluorophore und das Plasmid pHHV216 ausüben, sowie die Fitness der spontanen Varianten zu überprüfen. Auch wenn sich die Wachstumsraten und Verdopplungszeiten im Plattenlesegerät je nach Nährmedium nicht merklich unterschieden, so zeigte sich in der endgültigen Zelldichte nach 24 h ein deutlicher Unterschied. So konnte über alle Versuche hinweg bei MH, im Vergleich zu LB, ein Wachstum zu einer höheren OD<sub>600nm</sub> festgestellt werden. Wie erwartet wuchs der Elternstamm bei allen Tests am schnellsten. In MH-Medium hatten beide fluoreszierenden Varianten *A. baylyi* BD413 GFP

und A. baylyi BD413 mCherry eine Verdopplungszeit von 112 min und unterschieden sich lediglich um 0,12 min. Dies entspricht 7,2 s, was absolut unter die Messungenauigkeit fällt. Die beiden plasmidtragenden Varianten A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 trennten auch nur 0,19 min oder 11 s. In LB-Medium unterschieden sich A. baylyi BD413 GFP und mCherry ebenfalls nur um 12 s. Die Differenz zwischen A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 in LB betrug 1,59 min, was immer noch vernachlässigbar klein ist. Somit konnte gezeigt werden, dass die beiden Fluorophore eine sehr ähnliche metabolische Last für A. baylyi BD413 darstellen, womit eine der wichtigsten Anforderungen für das Testsystem erfüllt werden konnte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die metabolische Last der Fluorophore auf A. baylyi BD413 in etwa 4 % beträgt. Die Last des 58 kbp großen Resistenzplasmides ist dagegen erheblich höher, da die entsprechenden Stämme mit pHHV216 um 53 % langsamer gewachsen sind als ihre Elternstämme A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry. Die beiden Mutanten A. baylyi BD413 GFP 652 und A. baylyi BD413 GFP 807 wiesen in beiden Nährmedien ein sehr ähnliches Wachstum wie ihr Elternstamm A. baylyi BD413 GFP auf. Mit einer Verdopplungszeit von 121 min wuchs A. baylyi BD413 mCherry 652 in MH um 11,9 % langsamer als A. baylyi BD413 und 8 % langsamer als sein Elternstamm A. baylyi BD413 mCherry. In LB-Medium wuchs A. baylyi BD413 mCherry 652 um 11,2 % langsamer als A. baylyi BD413 und 7,5 % langsamer als A. baylyi BD413 mCherry. Am deutlichsten im Wachstum eingeschränkt zeigte sich A. baylyi BD413 mCherry 777 in MH-Medium mit einer Verdopplungszeit von über 200 min. Dies bedeutet einen Rückstand von 85 % auf A. baylyi BD413 und 78 % auf seinen Elternstamm A. baylyi BD413 mCherry. A. baylyi BD413 mCherry 777 hat aufgrund seiner Mutationen eine um 88 min längere Verdopplungszeit als A. baylyi BD413 mCherry und braucht sogar ganze 92 min länger für eine Verdopplungsphase als A. baylyi BD413. In LB-Medium wuchs A. baylyi BD413 mCherry 777 mit einer Verdopplungszeit von ca. 197 min etwas schneller und hatte nur 83 % Rückstand auf A. baylyi BD413 und 77 % auf seinen Elternstamm. Er brauchte in LB 85 min länger für eine Verdopplung als sein Elternstamm und 89 min länger als A. baylyi BD413. Selbst die schon sehr langsam wachsenden Varianten mit pHHV216 weisen eine um ca. 30 min verringerte Verdopplungszeit im Vergleich zu A. baylyi BD413 mCherry 777 auf. Interessanterweise zeigt sich das verringerte Wachstum auch jeweils in einer verlängerten Lag-Phase in beiden Medien. Während der Grundstamm A. baylyi BD413 nur etwa 2,5 h in der Anlaufphase verbrachte, brauchten die plasmidtragenden Stämme etwa 3,5 h. Deutlich am längsten mit ca. 5 h brauchte A. baylyi BD413 mCherry 777 für seine Latenzphase. Die restlichen Stämme waren in etwa gleichauf mit A. baylyi BD413. Dies zeigt nochmals deutlich die metabolische Last des Plasmids pHHV216 und die Einschränkungen durch die Mutationen bei A. baylyi BD413 mCherry 777. Die beiden Mutanten A. baylyi BD413 GFP

652 und *A. baylyi* BD413 GFP 807 zeigten keine nennenswerten Fitnesseinschränkungen zu ihrem Elternstamm. *A. baylyi* BD413 mCherry 652 wies auch nur eine gering verminderte Fitness auf. *A. baylyi* BD413 mCherry 777 hingegen zeigte deutliche Einschränkungen im Wachstum, die sogar die des Resistenzplasmides übertrafen.

Die gemessenen Verdopplungszeiten von 107 bis 200 min im Tecan Infinite©200PRO wirken sehr lang für Acinetobacter. Dabei gilt es zu bedenken, dass die Werte in einer versiegelten Mikrotiterplatte erhoben wurden. Dabei hatten die Stämme nur 200 µl Nährmedium zur Verfügung und eine sehr begrenzte Sauerstoffzufuhr. Gerade letzteres ist bei obligat aeroben Bakterien als kritisch zu betrachten (Barbe et al., 2004). Dennoch war die Versiegelung der Platte mit einem Polyesterfilm notwendig, um die Kontamination des Gerätes und der Nachbarnäpfchen während des Schüttelns zu vermeiden. Um zu überprüfen, ob das Plattenlesegerät die langsamen Wachstumsraten verursacht und ob die Wachstumsbedingungen Einfluss auf das Verhältnis der Stämme zueinander haben, wurden zusätzliche Wachstumskurven angefertigt. die Dabei waren Bedingungen Schüttelwasserbad und vor allem die Sauerstoffzufuhr deutlich besser, da die Stämme in 500 ml Erlenmeyerkolben bebrütet wurden. Die Turbulenzen beim Schütteln der nur 200 ml Kulturen sorgte für zusätzlichen Sauerstoffeintrag in das Nährmedium. Die so gemessenen Wachstumsraten waren deutlich schneller, entsprachen aber auch den im Plattenlesegerät beobachteten Verhältnissen der Stämme untereinander. Mit einer Verdopplungszeit von 31 min für A. baylyi BD413 zu 33 min für A. baylyi BD413 GFP zu 35,5 min für A. baylyi BD413 mCherry 652 stimmten sie mit den 108 zu 112 zu 121 min überein. Auch hier büßten A. baylyi BD413 GFP wieder 4 % und A. baylyi BD413 mCherry 652 12 % im Vergleich zu A. baylyi BD413 ein. Neben den einzelnen Stämmen wurde auch eine Kombination aus A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry 652 mit einer Verdopplungszeit von 34,6 min gemessen. Dies entspricht nahezu dem errechneten Mittelwert von 34,2 min der beiden einzelnen Wachstumskurven und lässt auf wenig Konkurrenz der Stämme untereinander schließen. Die im Schüttelwasserbad gemessene Verdopplungszeit von 31 min für A. baylyi BD413 zu den 108 min im Plattenlesegerät spricht für deutlich schlechtere Wachstumsbedingungen im Tecan Infinite@200PRO. A. baumannii AYE hat unter ähnlichen Bedingungen eine Verdopplungsrate von 40 min (Antunes et al., 2011). Auch wenn es sich bei A. baylyi BD413 um einen Umweltorganismus und bei A. baumannii AYE um einen typischen nosokomialen Erreger handelt, sind sie sich genetisch dennoch recht ähnlich (Adams et al., 2008; Vallenet et al., 2008). Die 31 min Verdopplungszeit im Schüttelwasserbad dürfte folglich sehr nahe an den idealen Wachstumsbedingungen für A. baylyi BD413 liegen.

Die weiteren Versuche im Schüttelwasserbad zum Einfluss von AB auf die Wachstumsraten zeigten, dass sowohl die Zugabe von AB als auch die Erhöhung der Inkubationstemperatur das Wachstum negativ beeinflussen. Dabei war die Konzentration von Piperacillin weit unter den gemessenen MHKs der einzelnen Stämme. Die erhöhte Inkubationstemperatur von 37 °C statt 30 °C scheint interessanterweise mehr Einfluss auf das Wachstum der Stämme zu haben als eine geringe Dosis Piperacillin. Die in Abbildung 26 B dargestellten Verhältnisse der Stämme zeigten sich in den ersten Stunden sehr turbulent, aber stabilisierten sich nach 12 h und veränderten sich kaum bis zum Ende des Experiments nach 24 h. Die endgültigen Verhältnisse nach 23 h und 24 h entsprachen etwa den Wachstumsgeschwindigkeiten der beiden Stämme. Dies lässt auf keine bis sehr geringe Konkurrenz schließen. Es ist davon auszugehen, dass sich die beiden Stämme immer noch wie ein einzelnes Isolat verhalten und sich nicht als Konkurrenz ansehen. Bis auf das Gen für die Fluoreszenz und die Mutationen in A. baylyi BD413 mCherry 652 sind sie identisch. Gerade Mutationen treten außerhalb des Labors regelmäßig auf und sind zu einem gewissen Grad in jeder Bakterienpopulation natürlich. Die Zugabe von AB kann diese Situation aber verändern, denn, wie in Abbildung 26 C dargestellt, setzte sich der resistente Stamm A. baylyi BD413 mCherry 652 deutlich durch. Auch wenn unter Zugabe von AB A. baylyi BD413 mCherry 652 der schneller wachsende Stamm war, so sind die Verhältnisse der beiden untereinander, nach einer turbulenten Anfangsphase, in den Stunden 10 bis 12 dennoch sehr ähnlich. Erst UN nach 23 h und 24 h zeigt sich der resistente Stamm A. baylyi BD413 mCherry 652 dominant. Auch wenn dieser Versuch nur einmal durchgeführt wurde, so konnte dennoch gezeigt werden, dass die ersten Stunden wohl recht turbulent sind und sich erst über die Zeit ein stabiles Verhältnis einstellt. Interessanterweise waren die Wachstumskurven und die Verdopplungszeit sehr ähnlich, obwohl sich die Verhältnisse der Stämme deutlich veränderten. Durch die Zugabe von AB konnte sich der durch seine Mutationen resistentere A. baylyi BD413 mCherry 652 durchsetzen.

### 4.1.4 Antibiogramme

Um einen Vergleichspunkt für die MSC zu haben und die Stämme weiter zu charakterisieren wurden MHKs angefertigt. Diese können in Tabelle 13 und Tabelle 16 eingesehen werden. Alle getesteten Stämme zeigten noch bei der maximalen Konzentration von 512 mg/ml Blei Wachstum. Deshalb sind grundsätzlich keine weiteren Aussagen über die Resistenz gegen Blei möglich, da eine Erhöhung der eingesetzten Menge aufgrund der beschränkten Löslichkeit von Pb<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>x3H<sub>2</sub>O nicht mehr realisierbar war. Da die Stämme *A. baylyi* BD413 GFP und *A. baylyi* BD413 mCherry bzw. *A. baylyi* BD413 GFP pHHV216 und *A. baylyi* BD413 mCherry pHHV216 jeweils die gleichen Ergebnisse für die MHK hatten, wurden sie deshalb in dieser Arbeit und den Tabellen zusammengefasst. Theoretisch könnte

man noch den Grundstamm *A. baylyi* BD413 mit seinen beiden Farbvarianten zusammenfassen, da auch sie die gleichen Resistenzwerte aufwiesen.

Wie erwartet zeigten die Stämme A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 mit ihren auf dem Plasmid kodierten Resistenzgenen sul2, strAB, tetH, florR stark erhöhte MHKs gegen Chloramphenicol, Tetracyclin, Sulfadiazin und Sulfamethoxazol. Für Clindamycin wurden ebenfalls stark erhöhte Werte gemessen, da die MHK von 2 mg/l für A. baylyi BD413 auf 8 mg/l anstieg. Der gegenteilige Effekt zeigte sich bei Fosfomycin, Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftazidim/3-APB, Ceftazidim/Avibactam, Imipenem und Temocillin. Bei den restlichen getesteten AB wiesen die plasmidtragenden Stämme keine erhöhten MHK-Werte auf im Vergleich zu ihren Elternstämmen oder A. baylyi BD413. Bei Benzalkoniumchlorid und den drei verbleibenden Schwermetallen zeigten die Varianten mit pHHV216 deutlich erhöhte MHK-Werte zu A. baylyi BD413. Wieso diese Werte besonders bei Kupfer und Benzalkoniumchlorid so drastisch erhöht waren, konnte nicht geklärt werden. Denn pHHV216 besitzt keinen expliziten Exporter für Schwermetalle oder quartäre Ammoniumverbindungen. Auch eine zufällige Aktivierung oder Hochregelung der entsprechenden Effluxpumpen scheint sehr unwahrscheinlich, da beide Farbvarianten unabhängig voneinander immer die gleichen MHK-Werte zeigten. Die Resistenzgene sul2, strAB schieden aus, da sie entweder direkt die AB oder deren Ziel modifizieren und so für eine Resistenz sorgen. Naheliegend dagegen wären die beiden Exporter tetH und florR. Diese gehören zur MFS-Gruppe und sind grundsätzlich auch in der Lage Schwermetalle aus der Zelle zu exportieren (Drew et al., 2021). Sie gelten als sehr substratspezifisch, aber z. B. für florR wurde bei Braibant et al. (2005) nur andere AB und komplexe Moleküle wie Ethidiumbromid oder Berberin getestet, die allerdings nicht exportiert wurden. Schwermetalle wurden nicht berücksichtigt, dabei wäre gerade bei floR ein Export der ebenfalls positiv geladenen Metallionen möglich, da die Substratspezifität sehr stark auf der negativen Ladung der Asparaginsäure und der Seitenkette an Position 23 beruht (Braibant et al., 2005).

Die weitere Auswertung der Antibiogramme nach EUCAST war schwierig, weil dieses nur für klinisch relevante AB eine Wirksamkeitsschwelle definiert. Die klinisch relevanten Isolate von *Acinetobacter* gelten aber als intrinsisch resistent gegen β-Penicilline, Cephalosporine etc., deshalb werden für diese AB keine Grenzwerte angegeben. Außerdem gibt es keine Vorgaben bei Desinfektionsmitteln, wie Benzalkoniumchlorid oder gar Schwermetallen, da diese keine Anwendung im Patienten finden. Die Auswertung erfolgte nach der MHK-Tabelle des EUCAST für das Jahr 2021. Dabei wurden die für *Acinetobacter* spezifischen Angaben, wo es möglich war, durch Werte aus der allgemeinen, unspezifischen MHK-Tabelle ("PK-PD breakpoints") für 2021 ergänzt. So konnte z. B. für Cefotaxim aus der unspezifischen Tabelle

ein Grenzwert von 2 mg/l entnommen werden. Wie erwartet waren *A. baylyi* BD413 und alle Varianten, mit Ausnahme der plasmidtragenden Stämme, dagegen resistent.

Theoretisch könnte die in A. baylyi BD413 vorhandene, induzierbare AmpC β-Lactamase des Typs ADC-8 (Beceiro et al., 2007) eine Resistenz gegen β-Lactamantibiotika vermitteln. Acinetobacter haben typischerweise eine genomkodierte, intrinsische β-Lactamase, bei A. baumannii heißt diese Cephalosporinase bla<sub>ADC</sub> (Karah et al., 2017). Die Resistenz gegen Cefotaxim könnte darauf hinweisen, dass die AmpC β-Lactamase aktiv sein könnte. Andererseits ist Cefotaxim eine Ausnahme, da A. baylyi BD413 gegen andere β-Lactamantibiotika, wie Piperacillin oder andere Cephalosporine (Ceftazidim) sensibel blieb. Außerdem ist ADC-8 in A. baylyi BD413 nicht durch Ceftazidim induzierbar, da in Anwesenheit des AB keine erhöhte Aktivität des Enzyms gemessen werden konnte (Beceiro et al., 2007). Bei den Tests von Beceiro et al., (2007) hatte A. baylyi BD413 eine MHK von 24 mg/l für Cefotaxim, zeigte sich aber gleichzeitig sensibel gegen andere Cephalosporine und weitere β-Lactamantibiotika. Die MHK-Werte aus dieser Arbeit im Vergleich zu Beceiro et al., (2007) können für ausgewählte AB Tabelle 22 entnommen werden. Wenn die ADC-8 Cephalosporinase aus A. baylyi BD413 zusammen mit einem aktiven Promotor auf einem Plasmid zurück in A. baylyi BD413 transformiert wurde, war diese aktiv. Entsprechend ergab sich eine Resistenz gegen β-Lactamantibiotika und der MHK-Wert für Ceftazidim stieg auf >256 mg/l (Beceiro et al., 2007). Weitere Hinweise auf eine AmpC unabhängige Resistenz sind die Werte der MHKs mit den Kombinationen aus Ceftazidim + 3-APB, sowie Meropenem + 3-APB, die eine Inaktivität der intrinsischen Cephalosporinase beweisen. Die mit 128 mg/l hohen MHK-Werte für Temocillin sprechen ebenfalls nicht für eine aktive Cephalosporinase, da dieses AB als stabil gegenüber β-Lactamasen gilt, weil es mit seinem α-Methoxy-Rest die Hydrolyse durch das Enzym verhindern kann, indem es den Eingang zum aktiven Zentrum blockiert. So kann die Aktivierung des Serin durch ein Wassermolekül verhindert werden und die AmpC β-Lactamase bleibt inaktiv. Die erhöhte Stabilität gegen β-Lactamasen geht allerdings auch mit einer verminderten Bindungsaffinität von Temocillin an PBPs einher, weshalb dessen antibakterielle Wirkung, insbesondere bei grampositiven Bakterien, relativ schlecht ist (Livermore et al., 2008). Es kann folglich nicht davon ausgegangen werden, dass bei einem der in dieser Arbeit getesteten Stämme die induzierbare AmpC β-Lactamase über ein basales Level hinaus aktiv ist.

Tabelle 22: Antibiogramme von *Acinetobacter baylyi* BD413 gegen diverse Antibiotika im Vergleich zu den Werten von Beceiro et al. (2007). MHK bezeichnet die Minimale Hemmkonzentration.

|                                | Acinetobacter baylyi BD413 |                         |  |
|--------------------------------|----------------------------|-------------------------|--|
| MIC [mg/l] (24h)               | Diese Arbeit               | Beceiro et al.,<br>2007 |  |
| Antibiotisch wirksame Substanz |                            |                         |  |
| Ciprofloxacin                  | <0,0165                    | 0,047                   |  |
| Amikacin                       | ≤4                         | 1                       |  |
| Piperacillin                   | ≤8                         | 16                      |  |
| Cefotaxim                      | >2                         | 24                      |  |
| Ceftazidim                     | 4                          | 6                       |  |
| Imipenem                       | 1                          | 0.094                   |  |
| Meropenem                      | ≤0,125                     | 0,125                   |  |
| Tetracyclin                    | 0,5                        | 1,5                     |  |

In Tabelle 22 ist der Vergleich von MHK-Werten aus dieser Arbeit und Beceiro et al., (2007) zu sehen. Bei Ceftazidim zeigte sich *A. baylyi* BD413 mit 4 mg/l zu 6 mg/l etwas empfindlicher. Bei Piperacillin mit ≤8 mg/l zu 16 mg/l war *A. baylyi* BD413 deutlich sensibler. Bei Imipenem hingegen war die MHK von *A. baylyi* BD413 zehnmal höher als die Werte von Beceiro et al., (2007), aber immer noch weit unter dem Schwellenwert zur Resistenz bei 4 mg/l. Bei Tetracyclin zeigte sich *A. baylyi* BD413 mit 0,5 mg/l zu 1,5 mg/l dreimal empfindlicher. Im Großen und Ganzen entsprechen sich die in dieser Arbeit gemessen MHK-Werte und die Ergebnisse von Beceiro et al. (2007).

#### 4.1.5 Sequenzierung ausgewählter Stämme von Acinetobacter baylyi

Die WGS von *A. baylyi* BD413 mCherry 652 ergab eine 8556 bp große Deletion, die für den teilweisen oder vollständigen Verlust von neun Genen sorgt. Die N-Acetyl-Gamma-Glutamyl-Phosphat-Reduktase ist eine Oxidoreduktase, die mit den drei Substraten Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) in seiner oxidierten Form NADP<sup>+</sup>, N-Acetyl-L-Glutamat-5-Semialdehyd und Phosphat, die drei Produkte NADPH, N-Acetyl-L-Glutamyl-5-Phosphat und ein H<sup>+</sup> erzeugt. Sie ist damit u. a. wie die ebenfalls deletierte Ornithin-Carbamoyltransferase an der Biosynthese von Arginin beteiligt (Cherney et al., 2007). Die Ornithin-Carbamoyltransferase ist auch als ArgF bekannt, dabei gilt diese Bezeichnung sowohl in *A. baylyi* BD413 als auch in *A. baumannii* (Dorsey et al., 2002). Sie ist grundsätzlich essentiell, da *A. baylyi* BD413 ohne sie auxotroph für Arginin wird (de Berardinis et al., 2008). Bei vollwertigen Nährmedien wie LB hat dies allerdings keine sichtbaren Auswirkungen und der Stamm wächst ganz normal. In Selektionsmedien mit chemisch genau definierten Zutaten und nur begrenzten Ressourcen, wie dem Simmons Citrat-Agar, kommt die Auxotrophie zum Tragen. Auf diesem und anderen Medien zeigt eine Mutante ohne Ornithin-Carbamoyltransferase nur Wachstum bei Zugabe von Arginin (Dorsey

et al., 2002). Außerdem wurde noch clpS, clpA und ein Gen für ein hypothetisches Protein deletiert. Die beiden ersteren liegen im Genom direkt hintereinander, da es sich bei ClpA um ein Chaperon und bei ClpS um den dazugehörigen Proteaseadapter handelt. Dabei kann ClpA mit der Protease ClpP eine Chaperon-Protease bilden. ClpA ist aber nur eines von mehreren Chaperonen, die dies vermögen. ClpP kann auch u. a. mit ClpB und ClpX einen Chaperon-Protease-Komplex bilden. Die Chaperon-Protease aus ClpA und ClpP ist primär für die Degradation von falsch gefalteten Proteinen zuständig. Darüber hinaus können sie eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung, Motilität, Virulenz, Resistenz gegen AB und der Stressantwort spielen. Bei Deletion in A. baumannii verringerte sich entsprechend dessen Potential zur Biofilmbildung, Virulenz und die Überlebensfähigkeit in Makrophagen (Belisario et al., 2021). Interessanterweise veränderte die Deletion in A. baumannii nicht das Wachstumsverhalten, die Resistenz gegen oxidativen Stress oder die Bekapselung. Auch wenn die Stämme von A. baumannii mit der Deletion von clpA in der exponentiellen Phase leicht langsamer wuchsen, so holten sie den Elternstamm bis spätestens nach 18 h wieder ein. Was sich aber veränderte, war das Aussehen der Zellen. Sie wuchsen fast stäbchenförmig und bildeten teilweise lange Ketten. Dies lässt darauf schließen, dass die Mutanten ohne clpA und clpS Probleme bei der Zellseparation hatten (Belisario et al., 2021). Bei der mikroskopischen Betrachtung aller in dieser Arbeit erzeugten Mutanten von A. baylyi BD413 ist kein Stamm durch Zellseparationsprobleme aufgefallen. Manche Zellen waren etwas länger als andere, aber bei polymorphen, kokkoiden Stäbchen ist dies öfter der Fall und eine leichte Veränderung nur schwer zu erkennen. Hier wäre in Zukunft eine genauere morphologische Untersuchung sinnvoll, ob A. baylyi BD413 mCherry 652 deutlich längere, stäbchenförmigere Zellen bildet als A. baylyi BD413 und die anderen Varianten.

Für das Protein aus der YnfA Familie, ergaben Vergleiche mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), dass es sich um ein in der Spezies *Acinetobacter* verbreitetes, kleines, uncharakterisiertes Protein handelt. Nahe Verwandte des in der inneren Lipidmembran verorteten Proteins wurden vor allem bei Stämmen von *A. baumannii* gefunden. YnfA gehört grundsätzlich zu den Exportern und ist bei *A. baumannii* u. a. an der Colistinresistenz beteiligt (Ding et al., 2022). *A. baylyi* BD413 mCherry 652 war entsprechend mit einer MHK von ≤1 mg/l sensibel gegen Colistin. *A. baylyi* BD413 und alle anderen getesteten Mutanten hatten genau das gleiche Ergebnis, womit keiner die Schwelle zur Resistenz von 2 mg/l überschritt. Es ergaben sich somit bei *A. baylyi* BD413 mCherry 652 durch die Deletion des kleinen Proteins der YnfA Familie keine ersichtlichen Folgen. Bei der deletierten α/β-Hydrolase handelt es sich um eine Essigsäureethylester-Esterase, die als Lipase am Lipidstoffwechsel beteiligt ist. Diese ist im Labor genauso entbehrlich wie *lipA*, welches bei den fluoreszierenden Varianten von *A. baylyi* BD413 als Genlocus zur Integration der Fluoreszenzkassette genutzt wurde. Der Transkriptionsregulator der

TetR/AcrR Familie ist im Genom von *A. baylyi* BD413 unter dem Genlocus *ACIAD*1367 zu finden. Die Suche mit BLAST ergab, dass er ein Homolog zu AdeN in *A. baumannii* ist. Dabei ergab sich bei BLAST die höchste Ähnlichkeit von 70 % bei *A. baumannii* A1429. Das direkte Alignment der beiden Aminosäuresequenzen ist in Abbildung 28 zu sehen und ergab eine Ähnlichkeit von 75 %, bei einer Übereinstimmung von 58 %. Dieses Ergebnis deckt sich sehr gut mit den Erkenntnissen von Rosenfeld et al. (2012). Diese hatten mit ihrer AdeN-Sequenz von *A. baumannii* eine Übereinstimmung von 57% zu der von *A. baylyi* in der Aminosäuresequenz. Daraus schlussfolgerten sie, dass diese Spezies entweder kein *adeN* besitzt oder ein entsprechendes Homolog sich signifikant unterscheidet. Wenn man das Alignment in 200 IDYIHYCVEIFLKGHHKV-

Abbildung 34 betrachtet, kann man mit Sicherheit sagen, dass die beiden Homologe sich erheblich voneinander unterscheiden.

| BD413 | 1 MSKTVLSSLCPTGCELPLTRRGHERWLALLNSATELFLEKGYDAVSLDDV 50                    |
|-------|--|
| A1429 | 1 MHDPVLESYPPI-CDKPQTRRGVERRLALLLSATELFLEKGYDAVSLDDI 49                    |
| BD413 | 51 VNYAGGSKASIYKYFGSKEGLFTSICDYRRELFFKNICVSFDSERDDLRN 100                  |
| A1429 | 50 VNHAGGSKASIYKYFGNKEGLFTAICDYRREMFFKDICIAFQPDQASLKE 99                   |
| BD413 | 101 FLIHTLIGFYQKITCDENAAFMRLIIEQSQRNPDLALYLHQKGPEHVQKT 150 :  .  .   :.  : |
| A1429 | 100 YLIQTLIRFYNHIIQPEHIAFLRLVIEQTQCNATLSQYLYEKCAQDVQNT 149                 |
| BD413 | 151 IAHALEQATLLGKIQCQKPYNSAMMFFGILRNIEWKILMGVPTTIDNDEV 200                 |
| A1429 | 150 IAQALLISHQAGEITCTSPDHSTLMYFGILRDIEWRMIMGMPLPTNEYEV 199                 |
| BD413 | 201 VEHIEYCVDLFLNA-HKVS 218 ::: .   ::                                     |
| A1429 | 200 IDYIHYCVEIFLKGHHKV- 217  |

Abbildung 34: Alignment von ACIAD1376 aus *Acinetobacter baylyi* BD413 mCherry 652 (BD413) und AdeN aus *A. baumannii* A1429 (A1429). Das Alignment ergab eine Ähnlichkeit von 75 %, bei einer Übereinstimmung von 58 %.

Neben der Ähnlichkeit von *ACIAD*1367 zu *adeN* lässt auch die Position im Genom auf ein Homolog schließen, da es direkt upstream von *argF* im Genom von *A. baylyi* BD413 liegt. Bei den folgenden sechs *Acinetobacter*-Spezies ist *adeN* ebenfalls direkt upstream von *argF* zu finden: *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. radioresistens*, *A. lwoffii*, *A. nosocomialis* und *A. pittii* (Rosenfeld et al., 2012). Auch bei *A. baumannii* kann *adeN* spontan deletiert werden. Der Stamm *A. baumannii* BM4669 ist *adeN*Δ<sub>258-651</sub> und eine spontane Mutante von einer Selektionsplatte mit Tetracyclin. Er hat nicht nur die letzten 394 bp von *adeN* deletiert, sondern es fehlen auch die ersten 470 bp des angrenzenden *argF* (Rosenfeld et al., 2012). Somit sind beide Gene funktionslos und quasi deletiert wie in *A. baylyi* BD413 mCherry 652. AdeN ist in *A. baumannii* ein Repressor für das dreiteilige Exportersystem AdelJK (Brzoska

et al., 2013; Rosenfeld et al., 2012). AdeJ ist der eigentliche Exporter und sitzt in der inneren Membran. Er ist ein typischer Antiporter, der ein H<sup>+</sup> in die Zelle und ein Molekül hinaus pumpt. Adel ist ein Membranfusionsprotein und AdeK der passende Kanal in der äußeren Membran (Darby et al., 2023). AdelJK gehört zur RND-Familie, wie auch das für die Schwermetallresistenz zuständige CzcABCD-Effluxpumpensystem (Brzoska et al., 2013; Darby et al., 2023; Rosenfeld et al., 2012). Der schematische Aufbau ist in Abbildung 5 oder im Kapitel 1.3 Antibiotikaresistenzen zu sehen. AdelJK wird typischerweise mit dem Export von AB assoziiert, es spielt aber auch eine Rolle bei der Biofilmbildung, Virulenz und Motilität auf Oberflächen, indem es z. B. die bakterielle Zellmembran moduliert oder während einer Infektion das Bakterium vor antibakteriellen Fettsäuren des Wirtes schützt (Darby et al., 2023). Trotz des aktiven Repressors AdeN wird adeIJK konstitutiv exprimiert und bietet neben seinen anderen Einsatzmöglichkeiten immer ein basales Level der AR. Die Deletion von adeN führt zu einer fünffachen Steigerung der Expression von adeIJK. Dabei macht es keinen Unterschied, ob nur Teile deletiert wurden und adeN damit funktionslos ist oder das gesamte Gen nicht mehr vorhanden ist, die Überexpression bleibt bei A. baumannii immer beim ca. fünffachen (Damier-Piolle et al., 2008; Rosenfeld et al., 2012). Das Expressionslevel wird deshalb so genau kontrolliert, da eine höhere Überexpression von adelJK toxisch für die Zelle ist (Damier-Piolle et al., 2008). Andere Exporter in A. baumannii, wie z. B. das AdeABC-System, können gefahrlos wesentlich höher überexprimiert werden (Rosenfeld et al., 2012). Die Gene für Regulatoren wie adeN sitzen im Genom nicht zwangsweise in der unmittelbaren Nähe von adeIJK und resistente A. baumannii hatten nie Mutationen im Umfeld oder gar im adelJK-Operon selbst (Brzoska et al., 2013; Rosenfeld et al., 2012). Dabei werden die drei Gene adel, adeJ und adeK zusammen transkribiert, das heißt, es wird immer das gesamte adelJK-System reguliert (Damier-Piolle et al., 2008). Künstlich lassen sich aber einzelne Gene ausschalten, so hat z. B. Brzoska et al. (2013) adeJ in A. baylyi BD413 durch eine Kanamycinresistenzkassette ersetzt. Bei diesen Forschungen wurde auch eine 89 % Übereinstimmung von adeJ in A. baumannii zu dem entsprechenden Gen ACIAD2944 in A. baylyi BD413 postuliert. Bei Damier-Piolle et al. (2008) wurden in A. baylyi BD413 Homologe zu adel, adeJ und adeK, mit einer Übereinstimmung von 88 % zu A. baumannii gefunden. Erst kürzlich wurde dann veröffentlicht, dass adeIJK in allen Vertretern der Spezies Acinetobacter zu finden ist (Darby 2023). Aus diesem Grund und weil AdelJK zu den Resistenzmechanismen gehört (Brzoska et al., 2013), kann davon ausgegangen werden, dass dieses Effluxpumpensystem auch bei den spontanen Mutanten dieser Arbeit eine Rolle spielt. Die Substratspezifität von AdelJK ist sehr weit gefächert und umfasst u. a.: Chloramphenicol, Tetracycline, Benzalkoniumchlorid, Fluorchinolone, Sulfonamide, Trimethoprim, Chlorhexidin, Erythromycin, β-Lactame, Lincosamide, Fusidinsäure,

Novobiocin, Rifampicin, Ethidiumbromid und SDS (Brzoska et al., 2013; Damier-Piolle et al., 2008; Darby et al., 2023). Der Exporter ist damit nicht nur an einer Resistenz gegen mannigfaltige AB, sondern auch gegen Tenside, quartäre Ammoniumverbindungen, Antiseptika etc. beteiligt. Durch die Deletion von *adeN* und der daraus resultierenden Überexpression von *adeIJK* lassen sich folglich die erhöhten MHK-Werte von *A. baylyi* BD413 mCherry 652 gegen Chloramphenicol, Piperacillin, Ceftazidim, Temocillin, Clindamycin, Tetracyclin, Sulfadiazin und sogar Benzalkoniumchlorid erklären.

Das letzte der neun deletierten Gene kodiert einen Regulator aus dem Stickstoffwechsel NR(I), dabei handelt es sich um NtrC, den DNA-Binderegulator/Response-Regulator eines Zweikomponenten-Regulationssystems. Der Responseregulator wird entsprechenden Signal von dessen Sensorprotein NtrB phosphoryliert und interagiert mit  $\sigma^{54}$ . Der regulatorischen Transkriptionsfaktor  $\sigma^{54}$  bildet wiederum einen Komplex mit einer RNA-Polymerase, um die Transkription von glnA zu aktivieren. Das Genprodukt, die Glutamin-Synthetase, spielt eine wichtige Rolle im Stickstoffmetabolismus, da sie die Bildung von Glutamin katalysiert. Dabei überträgt das Enzym unter ATP-Verbrauch Ammonium auf Glutamat (Carmona et al., 1996; Ramesh Sawant et al., 2024). Zusammenfassend ließen sich durch die WGS von A. baylyi BD413 mCherry 652 fast alle erhöhten MHK-Werte erklären und die leicht verminderte Wachstumsrate könnte auf das Fehlen von Genen in wichtigen Abschnitten des Metabolismus zurückzuführen sein. Diese Gene spielen eine Rolle im Stickstoffmetabolismus, der Fettverwertung oder der Argininsynthese etc. All diese Stoffwechselprozesse sind unter Laborbedingungen nicht essentiell und können durch Nährstoffzufuhr z. B. in vollwertigen Komplexmedien ausgeglichen werden.

Nicht zuletzt hat auch die Überexpression eines aktiven Exporters einen Einfluss auf den Energiestoffwechsel der Zelle, da ATP verbraucht wird. Der Fakt, dass die unkontrollierte Überexpression von adelJK toxisch für die Zelle ist und deshalb strikt reguliert wird (Rosenfeld et al., 2012), spricht für einen erheblichen Einfluss dieses Effluxsystems auf den Zellmetabolismus. Der erhöhte MHK-Wert für Fosfomycin konnte nicht durch die WGS aufgeklärt werden. Allerdings erhöhte sich der Wert nur um eine Stufe und Acinetobacter gilt als intrinisch resistent gegen Fosfomycin. Die Resistenz wird u. a. durch den Exporter abaF vermittelt (Sharma et al., 2017). Die erhöhte Resistenz gegen Meropenem konnte ebenfalls nicht durch die WGS aufgeklärt werden, auch weil hier für A. baumannii keine Daten vorliegen.

Die WGS von *A. baylyi* BD413 mCherry 777 zeigte insgesamt fünf Abweichungen in dessen Genom. Der Basenaustausch von G zu A in einem hypothetischen Protein ist eine stille Mutation. Der Basenaustausch von A zu G an Stelle 1362849 im Genom von *A. baylyi* BD413 mCherry 777 führt zu einem Aminosäureaustausch von L zu S in einem

Transkriptionsregulator der TetR/AcrR Familie. Bei diesem handelt es sich ebenfalls um das oben besprochene Homolog zu AdeN in *A. baumannii*. Bei *A. baylyi* BD413 mCherry 652 ist das entsprechende Gen *ACIAD*1367 vollständig deletiert. In der Regel liegen TetR-Repressoren wie AdeN in Homodimeren vor. In Abbildung 36 ist der typische Aufbau eines TetR-Repressor Homodimers mit seinen  $\alpha$ -Helices und der Position der beiden als Liganden gebundenen Tetracycline dargestellt. Wie in Abbildung 20 und Abbildung 35 zu sehen, ist der Aminosäureaustausch in *A. baylyi* BD413 mCherry 777 an Position 212 am C-terminalen-Ende des Proteins und damit in der  $\alpha$ -Helix 10 von AdeN. Die  $\alpha$ -Helix 10 bildet mit der  $\alpha$ -Helix 5 die regulatorische Kerndomäne des Transkriptionsregulators. Diese Domäne ist für die Dimerisierung verantwortlich und enthält für jedes der beiden Monomere eine Bindungstasche, die Tetracyclin in Gegenwart eines zweiwertigen Kations binden kann. Die  $\alpha$ -Helices  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 8 und  $\alpha$ 10 und ihre Gegenstücke  $\alpha$ 5′,  $\alpha$ 8′ und  $\alpha$ 10′ bilden das Gerüst der Kerndomäne. Ihre Struktur ist hoch konserviert (Ramos et al., 2005).

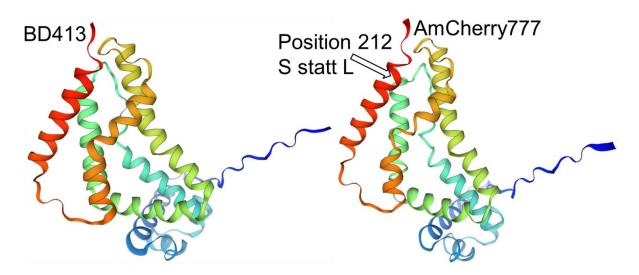


Abbildung 35: Abbildung des 3D-Modells von ACIAD1376 als Monomer aus *Acinetobacter baylyi* BD413 (BD413) und *A. baylyi* BD413 mCherry 777 (AmCherry777). Der Aminosäurenaustausch an Position 212 im Protein ist mit einem Pfeil markiert. Die 3D-Modellierung wurde mit Swiss-Model ausgeführt.

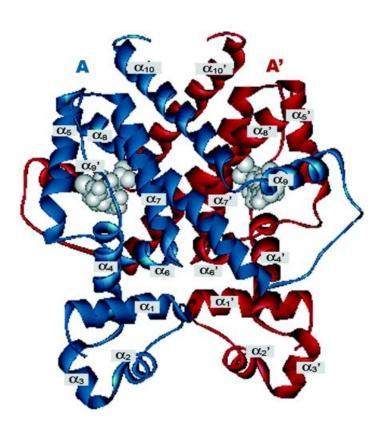


Abbildung 36: Abbildung des Homodimers eines TetR-Repressors. Die Monomere sind in rot und blau dargestellt. Die beiden an die Monomere gebundenen Tetracycline sind in grau dargestellt. Die  $-\alpha$ -Helices sind mit  $\alpha$  und der jeweiligen Zahl abgekürzt, wie  $\alpha_2$ . Abbildung entnommen aus Ramos et al., 2005.

Der Aminosäureaustausch von AdeN führt vermutlich zur Überexpression von adelJK, wie in A. baylyi BD413 mCherry 652. Die erhöhten MHK-Werte von Am Cherry777 lassen vermuten, dass auch in diesem Stamm adelJK aufgrund der Mutation im adeN Homolog überexprimiert wird. Die erhöhten MHK-Werte von Trimethoprim, Piperacillin, Ceftazidim und den anderen Cephalosporinen, Temocillin, Clindamycin, Tetracyclin, Sulfamethoxazol und Benzalkoniumchlorid lassen sich dadurch erklären. Andererseits sind die MHK-Werte für Chloramphenicol und Sulfadiazin bei A. baylyi BD413 mCherry 777 nicht erhöht im Vergleich zu A. baylyi BD413. Gemessen am Resistenzprofil, das AdelJK vermitteln kann und das A. baylyi BD413 mCherry 652 hat, wäre eine Erhöhung der MHKs dieser beiden Substanzen zu erwarten. Dafür sind die MHK-Werte der β-Lactame wie Piperacillin und die Cephalosporine höher als bei A. baylyi BD413 mCherry 652. Bei der letzten Mutation in A. baylyi BD413 mCherry 777 handelt es sich um die Deletion zweier Codons in dem Gen einer Histidinkinase. Wie in Abbildung 19 zu sehen, führt diese Deletion der zwei bp zu einer Leserahmenverschiebung und damit zu einem vorzeitigen Stopp nach 478 AS. Das nicht trunkierte Protein wäre 546 AS lang. BLAST Vergleiche ergaben, dass es sich bei dem gesuchten Protein um BfmS handelt. BfmS ist eine Histidinkinase und das Sensorprotein im Zweikomponenten-Regulationssystem BfmRS. BfmR. ist der dazugehörige Responseregulator. Das entsprechende Gen liegt mit dem Responseregulator ACIAD0276 im Genom von A. baylyi BD413 mCherry 777 direkt neben bfmS (ACIAD0272). Damit hat A.

baylyi BD413 mCherry 777 ein vollständiges bfmRS-System. Typischerweise besteht ein Zweikomponenten-Regulationssystem aus einem Responseregulator und einem Sensorprotein. Letzteres ist meistens eine membranständige Histidinkinase, die nach Erkennen eines bestimmten Signals, unter Umsetzung von ATP zu Adenosindiphosphat ihren entsprechenden Responseregulator phosphoryliert und damit aktiviert (Hoch 2000). In A. baumannii reguliert BfmS hingegen negativ, indem es nach Signalerkennung BfmR dephosphoryliert. BfmR wiederum phosphoryliert sich regelmäßig selbst durch Autophosphorylierung und wäre ohne das Eingreifen von BfmS dauerhaft aktiv (Palethorpe et al., 2022). Das BfmRS-System ist im Allgemeinen eine Stressantwort der Zelle. Dabei ist BfmR nicht nur für oxidativen, osmotischen oder Hitzestress zuständig, sondern auch für die Reaktion auf fehlgefaltete Proteine. Außerdem ist er beteiligt an der Produktion von Fimbrien/Csu-Pili, der Biosynthese von Kapselpolysacchariden, dem Aufbau von Typ-IV-Pili, sowie der Produktion und dem Transport von Siderophoren. Hierfür reguliert das BfmRS-System mindestens 20 verschiedene Gene, u. a. auch clpS und clpA, die in A. baylyi BD413 mCherry 652 deletiert sind. Damit ist BfmRS ein sehr wichtiges Zweikomponenten-Regulationssystem zum Überleben, nicht nur in der Umwelt, sondern auch während einer Infektion im Patienten (Palethorpe et al., 2022). Außerdem ist für das bfmRS-System bekannt, dass eine Inaktivierung von bfmS in A. baumannii die Resistenz gegen verschiedene AB erhöht, unter ihnen sind β-Lactame, Fluorchinolone, Carbapeneme, (Liou et al., 2014; Palethorpe et al., Aminoglykoside, und Makrolide Interessanterweise wurde der deletierte A. baumannii-Stamm gleichzeitig sensibler für Imipenem (Liou et al., 2014). Die Analyse der Proteinsequenz von BfmS aus A. baylyi BD413 und A. baylyi BD413 mCherry 777 mit MOTIFfinder ergab ein HATPase\_c-Motiv am Cterminalen-Ende des Proteins. Dieses Sequenzmotiv kann ATP binden und ist typisch für Histidinkinasen wie BfmS. Im Alignment in Abbildung 37 ist bei A. baylyi BD413 das vollständige HATPase\_c-Motiv von AS 426 bis 534 zu sehen. Die trunkierte Proteinsequenz von BfmS aus A. baylyi BD413 mCherry 777 weist dagegen nur ein unvollständiges HATPase\_c-Motiv von AS 426 bis 476 auf.

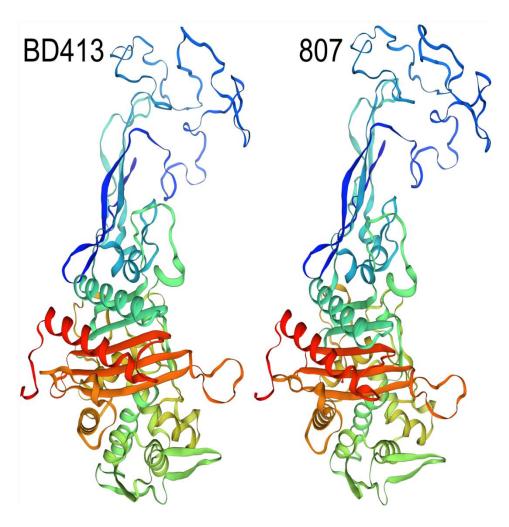
| BD413       | 401 | TEALKTQKEIELIPPPTYVMVDAERRYLHRVVQNLVGNAVRYCNDKVRIS |    | 450 |
|-------------|-----|--|----|-----|
| AmCherry777 | 401 | TEALKTQKEIELIPPPTYVMVDAERRYLHRVVQNLVGNAVRYCNDKVRIS |    | 450 |
| BD413       | 451 | GGIHPDGHAFICVEDDGAGIAEEDRARVFEAFARLDDSRTRASGGYGLGL |    | 500 |
| AmCherry777 | 451 | GGIHPDGHAFICVEDDGAGIAEEDRESI                       |    | 478 |
| BD413       | 501 | SIVSRIAYWFGGTIQVDESPELGGARFVMQWPAKRFNENSKKKKSI 54  | 46 |     |
| AmCherry777 | 479 |  | 78 |     |

Abbildung 37: Alignment eines Ausschnitts der Proteinsequenz von BfmS (ACIAD0727) aus Acinetobacter baylyi BD413 (BD413) und A. baylyi BD413 mCherry 777 (AmCherry 777). Das Alignment zeigt bei BD413 das vollständige HATPase\_c-Motiv von Aminosäure (AS) 426 bis 534. Bei Acinetobacter baylyi BD413 mCherry 777 ist nur ein unvollständiges HATPase\_c-Motiv von AS 426 bis 476 zu finden, da dieses Protein trunkiert ist. Die entsprechenden AS des HATPase\_c-Motivs sind unterstrichen.

Das trunkierte BfmS in A. baylyi BD413 mCherry 777 mit dem unvollständigen HATPase\_c-Motiv ist sehr wahrscheinlich nicht mehr in der Lage ATP zu binden und seine enzymatische Funktion zu erfüllen. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass BfmS in A. baylyi BD413 mCherry 777 funktionslos ist. Das würde die gesteigerte Resistenz gegen β-Lactame von A. baylyi BD413 mCherry 777 im Vergleich zu A. baylyi BD413 mCherry 652 erklären, wenn man davon ausgeht, dass die erhöhten MHK-Werte von A. baylyi BD413 mCherry 652 nur auf der Überexpression von adelJK beruhen. Auch die deutlich erhöhte Resistenz gegen Meropenem von A. baylyi BD413 mCherry 777, bei gleichzeitig niedrigeren MHK-Werten bei Imipenem gegenüber dem Grundstamm, lassen sich durch die Inaktivierung von bfmS erklären. Zusammenfassend ließen sich durch die WGS von A. baylyi BD413 mCherry 777 fast alle veränderten MHK-Werte erklären. Warum der Stamm, so wie der Grundstamm auch, sensibel gegen Chloramphenicol ist, obwohl er bei der Überexpression von adelJK eigentlich deutlich höhere MHK-Werte aufweisen müsste, so wie A. baylyi BD413 mCherry 652, konnte nicht durch die WGS geklärt werden, genauso wie die auffällige Erhöhung der Resistenz gegen Kupfer. Auch die drastisch eingeschränkte Wachstumsrate des Stammes konnte nicht wirklich aufgeklärt werden. Zwar schein adelJK überexprimiert und BfmS funktionslos, aber es wurden keine Mutationen im Metabolismus von A. baylyi BD413 mCherry 777 gefunden, die eine derartige Einschränkung der Wachstumsgeschwindigkeit erklären würden.

Die WGS von *A. baylyi* BD413 mCherry 807 ergab acht Mutationen im Vergleich zum Elternstamm, wobei die sechs Deletionen noch durch PCR bestätigt werden müssten. Daher lassen sich auch die Folgen der eventuellen Trunkierung des hypothetischen Proteins nicht einschätzen, da dessen Funktion nicht bekannt ist. Auch MOTIFfinder findet keine Sequenzmotive, die Rückschlüsse über die eventuelle Funktion des hypothetischen Proteins erlauben. Der Basenaustausch von A zu C an Stelle 3275343 im Genom von *A. baylyi* BD413 mCherry 807 führt zu einem Aminosäureaustausch von Phenylalanin zu Cystein im PBP3, welches als D-Alanyl-D-Alanin-Carboxypeptidase am Aufbau der Zellwand beteiligt ist und die Peptidketten während der Zellwandbiosynthese verknüpft. Diese Quervernetzung sorgt für eine stabilere Zellwand. Diese erfüllt bei Bakterien mehrere Aufgaben, sie dient u. a. als "Exoskelett", garantiert so die Stabilität der Zelle und spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung. Außerdem ist die Zellwand verantwortlich für die Form und das Aussehen der Zelle (Toth et al., 2022). Für *A. baumannii* konnte gezeigt werden, dass PBP3 aufgrund seiner kritischen Rolle bei der Zellteilung essentiell ist, (Toth et al., 2022). Die 3D-Modelle

von PBP3 aus *A. baylyi* BD413 und *A. baylyi* BD413 mCherry 807 sind in Abbildung 38 dargestellt.



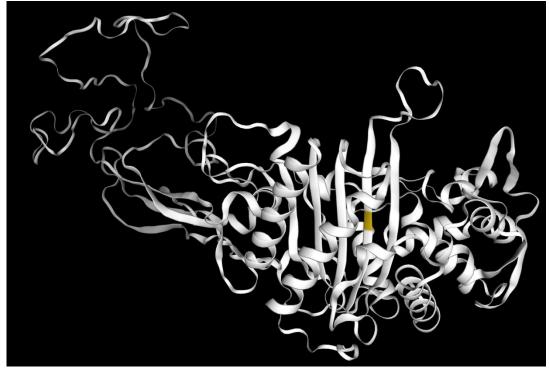


Abbildung 38: Abbildung des 3D-Modells des Penicillinbindeproteins 3 (PBP3) aus *Acinetobacter baylyi* BD413 (BD413) und *A. baylyi* BD413 mCherry 807 (807). Das weiße Protein auf schwarzem Grund zeigt das PBP3 aus 807 mit der in Gelb hervorgehobenen, mutierten Aminosäure 548 Cystein. Die 3D-Modellierung wurde mit Swiss-Model erstellt.

PBP3 besteht in A. baumannii aus zwei Domänen. Die N-terminale-Domäne von AS 97 bis 185 bindet kein Penicillin und ist für Faltung und Stabilität der C-terminalen Domäne verantwortlich. Diese besteht aus einer Transpeptidasedomäne von AS 266 bis 609. Das zentrale Element dieser Domäne bildet das antiparallele β-Faltblatt, es besteht aus fünf Strängen (β2/ β1/ β5/ β4/ β3) (Han et al., 2011). Laut Blast Analysen sind die PBP3 aus A. baumannii und A. baylyi BD413 zu 90 % identisch. Sie sind sich dabei so ähnlich, dass die in Abbildung 38 gezeigten 3D-Modelle für das PBP3 von A. baylyi BD413 mit dem entsprechenden Protein aus A. baumannii als Template erstellt wurden. Ebenfalls Abbildung 38 zu entnehmen ist, dass die mutierte AS 548 Cystein im PBP3 von A. baylyi BD413 mCherry 807 im vierten β-Faltblatt zu finden ist. Die AS 548 liegt außerdem innerhalb des von MOTIFfinder ausgewiesenen Transpeptidasemotivs von AS 289 bis 587. Bei dem Austausch von einem Phenylalanin zu einem Cystein in einem Protein verändert sich dessen Isoelektrischer Punkt nicht, da beide neutral sind. Auch die Hydrophobizität ändert sich kaum, aber Cystein ist etwas kleiner und polar, im Gegensatz zu Phenylalanin, welches unpolar und etwas größer ist. Welchen Einfluss genau die Änderung der AS548 im PBP3 hat, ist schwer zu sagen. Wie in Abbildung 39 dargestellt, liegt sie zwar im aktiven Zentrum von PBP3, gehört aber nicht zu den aktiven AS, wie das Serin 336 oder zu den hoch konservierten Stellen, wie das nahe Tyrosin 544, zumal die Hydrophobizität der Region im Protein ungefähr gleich bleibt (Han et al., 2011). Die hier beschriebene Mutation von AS 548 in PBP3 wurde schon in mindestens einem A. baumannii aus einer nosokomialen Stammsammlung entdeckt (Moussa et al., 2023). Dort wird beschrieben, dass der Austausch von Phenylalanin gegen Cystein an Stelle 548 im Protein die Bindeaffinität zu Sulbactam senkt und damit zu einer Resistenz gegen diese Substanz führt. Sulbactam ist ein β-Lactamase-Inhibitor, der, besonders bei Acinetobacter, auch eine schwache Aktivität als β-Lactam-Antibiotikum aufweist (Moussa et al., 2023). Es wird meist in Kombination mit β-Lactam-Antibiotika, wie Ampicillin, angewendet. Wie in Abbildung 39 dargestellt gibt es beschriebene Aminosäureaustausche im PBP3 von A. baumannii. Moussa et al. (2023) hat nur die Mutationen mit dem meisten Einfluss weiterverfolgt, weshalb es in dieser Studie keine weiteren Informationen über die Auswirkungen der Mutation der AS 548 gibt. Auch über ihren Einfluss auf die eventuelle Resistenz gegen AB ist bisher nichts weiter bekannt.

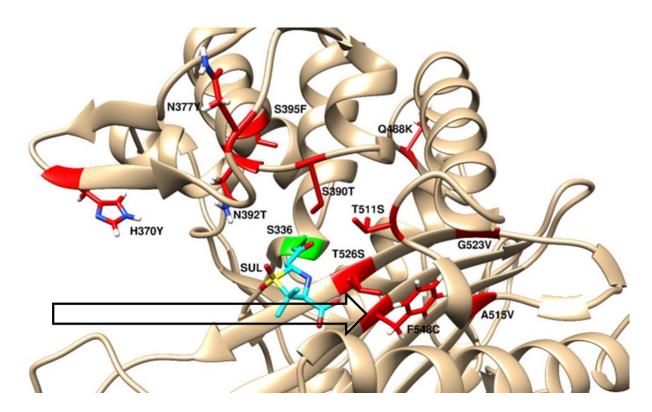


Abbildung 39: 3D-Modell des aktiven Zentrums des Penicillinbindeproteins 3 (PBP3) aus *Acinetobacter baumannii*. Gezeigt ist die Interaktion mit einem Molekül Sulbactam (SUL), welches an das aktive Serin (S) (grün) gebunden ist. Alle Aminosäuren (AS) sind im Einbuchstabencode dargestellt. Die Aminosäureaustausche sind in folgendem Format zu sehen: AS/Position im Protein/AS2. So wird zum Beispiel mit F548C (Pfeil) der Austausch von Phenylalanin (F) an der Stelle 548 im Protein gegen ein Cystein (C) gezeigt. In der Abbildung sind sowohl die 3D-Struktur von SUL als auch die einiger Seitenketten zu sehen. In unserem Beispiel F548C ist sehr gut der Benzolring von F in dessen Seitenkette zu beobachten. Abbildung modifiziert aus Moussa et al. (2023)

Grundsätzlich können Mutationen in PBP3 zu Resistenzen gegen AB führen oder an diesen beteiligt sein. Dies gilt sowohl für *A. baumannnii*, als auch für *A. baylyi* (Hawkey et al., 2018; McLeod et al., 2018; Moussa et al., 2023; Obara et al., 1991), z. B. die in Abbildung 39 dargestellte Mutation "A515V" bei der die AS 515 Alanin gegen ein V ausgetauscht wurde. Dieser Austausch führt zu einer erhöhten MHK gegen Meropenem (Hawkey et al., 2018)

Bei *A. baylyi* BD413 mCherry 807 ist auffällig, dass die MHK-Werte gegen die Cephalosporine der 3. Generation leicht erhöht waren. Diese sind auch als  $\beta$ -Lactamase-unabhängig zu betrachten, da die MHK-Werte nicht von  $\beta$ -Lactamase-Hemmern wie Avibactam, Tazobactam oder 3-APB beeinflusst werden. Gleichzeitig waren die MHK-Werte gegen andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, wie Piperacillin, nicht erhöht.

Dabei muss berücksichtigt werden, dass der Stamm auf einer Chromagar ESBL-Platte selektiert worden ist. Diese Platten enthalten Cephalosporine der 3. Generation (Grohs et al., 2013; Randall et al., 2009). Das könnte für einen Einfluss der beschriebenen Mutation in PBP3 auf die Resistenz sprechen. Der Stamm wurde aber, weil die Resistenzen nur geringfügig verändert waren, nicht für weitere Experimente eingesetzt und um dies sicher beurteilen zu können, wären weiterführende Analysen notwendig.

#### 4.1.6 Minimale Selektive Konzentration

Bei den Bestimmungen wurde kontrolliert, ob das natürliche Resistenzplasmid während der MSC-Experimente durch Konjugation oder Kompetenz übertragen wurde. Auch wenn pHHV216 die entsprechenden Transfer- und Mobilitätsgene besitzt und bei der Inkubation ÜN während der MSC-Experimente ausreichend Zeit gewesen wäre, konnte dies mit Hilfe der durchgeführten Kontrollen ausgeschlossen werden. Es wurden je 100 µl der Kulturen vor der Fixierung stichprobenartig aus den verschiedenen MSCs ausplattiert. Dabei zeigte auf den Selektionsplatten jeweils nur der plasmidtragende Stamm Wachstum. Somit kann eine Übertragung des Plasmids pHHV216, einzelner Resistenzgene, sowie eine Kontamination während der Experimente ausgeschlossen werden. Außerdem konnte bei dem Versuch Plasmid-haltige Stämme herzustellen, pHHV216 nicht durch die übliche Methode der Transformation von A. baylyi BD413 mittels natürlicher Kompetenz nach Palmen et al. (1993) übertragen werden. Theoretisch wären die 2 h Transformationszeit nach Palmen ausreichend, da A. baylyi BD413 mit 60 bp/s unter 17 min für die Aufnahme des 58274 bp Plasmids in Phase drei der natürlichen Transformation benötigt. Auch eine Verdoppelung der Transformationszeit auf 4 h führte nicht zum Erfolg. Die Übertragung von pHHV216 war nur mittels Puddletransformation ÜN möglich. Dabei wird das Plasmid nicht direkt von einem Donor auf den Rezipienten übertragen, sondern der Stamm mit aufgereinigter DNA oder aufgekochten Zellen des Donors ÜN inkubiert. Die Aufnahme des Plasmids erfolgte dabei ebenfalls mittels der natürlichen Kompetenz von A. baylyi BD413. Erfolgswahrscheinlichkeit zu erhöhen, werden in der Puddletransformation viele kleine Tropfen auf einem Filter inkubiert. Dabei stellt jeder Tropfen ein eigenes Experiment da und wird entsprechend für sich Ausplattiert. Die Puddletranformation wird immer dann empfohlen, wenn die Transformation von A. baylyi BD413 mittels natürlicher Kompetenz nach Palmen et al. (1993) nicht funktioniert (https://barricklab.org/twiki/bin/view/Lab/ProtocolsAcinetobacter Transformation Stand 03.03.2025). Neben der deutlich längeren Inkubation ÜN, bietet die Puddletransformation als Methode mit festem Nährmedium den Vorteil, dass bis zu 1000fach weniger DNA für eine erfolgreiche Transformation benötigt wird und auch dass die einzelne Zelle wesentlich besser mit DNA gesättigt werden kann. Außerdem kann die Puddletransformation eine Art der Hochdurchsatzmethode darstellen, da in den vielen Tropfen viele Experimente gleichzeitig stattfinden können. So ist die Puddletransformation in der Lage die Transformationsfrequenz grundsätzlich um bis zu 10% zu steigern und gerade problematische Transformationen die Transformationshäufigkeit erhöhen (https://barricklab.org/twiki/bin/view/Lab/Protocols AcinetobacterTransformation Stand 03.03.2025; Suárez et al., 2020). Das Plasmid pHHV216 wurde im Ganzen, ohne vorherigen Restriktionsverdau, eingesetzt, da es am besten ist das komplette Plasmid zu transformieren. Plasmide, die in A. baylyi eingebracht werden, können sich erst wieder

rezyklisieren, wenn das Plasmid mit mindestens zwei verschiedenen Restriktionsenzymen mit zwei verschiedenen Schnittstellen verdaut wurde (https://barricklab.org/twiki/bin/view/Lab/ ProtocolsAcinetobacterTransformation Stand 03.03.2025). Es gibt Berichte, dass A. baylyi BD413 während Evolutionsexperimenten auch seine natürliche Kompetenz einbüßen kann (Sezmis et al., 2023). Außerdem wurden die MSCs bei 37 °C ÜN geschüttelt, wohingegen der Kompetenzstatus bei 30 °C erreicht wurde (Palmen et al., 1993). Die Puddletransformation sah ebenfalls eine Inkubation über Nacht bei nur 30 °C vor (Suárez et al., 2020). Ob durch die erhöhte Inkubationstemperatur der MSCs oder durch einen anderen Faktor, jedenfalls zeigten die verwendeten Varianten von A. baylyi BD413 keine Kompetenz während der MSC-Experimente.

Das Grundtestsystem zur Ermittlung von MSCs besteht aus den Kombinationen der Stämme A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 sowie A. baylyi BD413 mCherry und A. baylyi BD413 GFP pHHV216 in je einem Experiment, so dass beide Stämme mit Fluorophoren mit dem Plasmid getestet wurden. Auf diese Weise war die Kontrolle direkt in das System integriert, so dass ein eventueller Einfluss der Fluorophore sichtbar werden würde. Da die beiden Kombinationen stets gleiche MSC-Werte aufwiesen, konnte nochmals bestätigt werden, dass die beiden Fluorophore in etwa die gleiche metabolische Last auf A. baylyi BD413 ausüben.

Die Verhältnisse der MSC/MHK in Tabelle 20 müssen nur als Näherungswerte verstanden werden, da für ihre Berechnung nur teilweise exakte Werte verwendet wurden. Als Berechnungsgrundlage für die MHK dienten nämlich nur die absoluten Zahlen aus Tabelle 13 und Tabelle 16, unter Ausschluss der Vergleichszeichen, wie <,> und ≤. Für Chloramphenicol z.B. wurde entsprechend für den Elternstamm *A. baylyi* BD413 eine MHK von 8 angenommen, obwohl diese <8 oder ≤8 war. Auch wenn so keine exakten Werte berechnet wurden, konnte dennoch ein erster Eindruck über die Verhältnisse MSC/MHK gewonnen werden.

In geklärtem Abwasser und damit in den meisten Oberflächengewässern sind nur minimale AB-Rückstände nachweisbar. Die meisten AB treten im ng/l bis μg/l Bereich auf und sind damit unterhalb der in dieser Arbeit ermittelten MSCs (Michael et al., 2013; Rodriguez-Mozaz et al., 2020; Yang et al., 2021). In Gülle und den damit gedüngten Böden hingegen können relativ hohe Konzentrationen an AB nachgewiesen werden. Auch wenn die Menge an AB im Boden nur noch ein Bruchteil derer in der Gülle beträgt, können hier trotzdem Werte im mg/kg Bereich vorkommen, wie z. B. für Oxytetrazyklin mit 50 mg/kg. Für Tetracyclin konnten zwar nur 2,7 mg/kg im Boden nachgewiesen werden, aber die MSC liegt für unser Testsystem mit 44 μg/l weit darunter (Cycoń et al., 2019). Zwar wurde in dieser Arbeit hauptsächlich in wässrigen Milieus getestet, aber *A. baylyi* BD413 ist ebenso als Modell für

Selektionsversuche in Böden geeignet (Jechalke et al., 2013). Auch wenn die nachgewiesenen Rückstände für AB in Böden höher sein können, ist diese Arbeit im HyReKA-Verbund mit Fokus auf Abwässer entstanden, weshalb sich diese Diskussion im Folgenden ausschließlich auf Abwässer und Oberflächengewässer konzentriert, denn auch hier können Werte über oder auf gleichem Niveau der MSCs nachgewiesen werden. In Brasilien wurden 24 mg/l Tetracyclin in Belebtschlamm gefunden und im Abwasser eines Pharmaunternehmens in China wurden sogar bis zu 1000 mg/l nachgewiesen (Michael et al., 2013). Letzteres entspricht dem 22700-fachen der MSC für Tetracyclin. Wie Tabelle 19 zu entnehmen, liegt die MSC für Piperacillin je nach Stamm zwischen 5 µg/l und 1 mg/l. Im Abfluss einer Krankenhausdusche wurden auch hier höhere Werte von 3,5 mg/l gemessen (Voigt et al., 2019). Gleiches gilt für eine Toilette im Krankenhaus für Meropenem mit 1,3 mg/l und einer MSC bis zu 70 µg/l (Voigt et al., 2019). Ebenfalls in einer Toilette wurde eine Konzentration von 0,72 mg/l Clindamycin gefunden. Damit wurde nur die MSC von A. baylyi BD413 GFP 807 bei 0,45 mg/l überschritten. Aber die MSCs von A. baylyi BD413 GFP 652 und A. baylyi BD413 mCherry 777 sind mit 0,98 und 1,1 mg/l nur geringfügig höher. Auch für Erythromycin bewegen sich die meisten Werte im ng/l Bereich für Abwasser, aber in Taiwan wurde in pharmazeutischen Abwässern mit 40 mg/l die MSC von 0,25 mg/l deutlich überschritten (Michael et al., 2013). In Kroatien wurde für ein Modell für das Abwasser eines Produzenten von Arzneimitteln für die Veterinärmedizin u. a. von 10 mg/l Sulfadiazin und Tetracyclin ausgegangen. Dies ist im Vergleich zu anderen Herstellern von AB zwar niedrig, aber immer noch weit über den MSCs der beiden Substanzen von 44 µg/l (Michael et al., 2013). In Indien wurden in einem See 6,5 mg/l Ciprofloxacin nachgewiesen, was die MSC von A. baylyi BD413 mCherry 777 von 51,51 µg/l immer noch um das 126-fache übertrifft (Fick et al., 2009; Schuster et al., 2022). Neben den punktuell gemessenen Werten, spielen auch durchschnittliche Konzentrationen eine Rolle. Denn Voigt et al. (2020) stellten bei ihren Messungen eine sehr große Fluktuation der Messwerte fest und veränderten die Probenahme entsprechend, so dass über einen Zeitraum von 24 Stunden jeweils jede Stunde eine Probe entnommen wurde. Diese gesammelten Proben zeigten sehr gut den Tagesrhythmus der Klinik (Schuster et al., 2022). In den Proben befanden sich sehr hohe Konzentrationen von bis zu 1900 µg/l Meropenem, aber auch die durchschnittliche Konzentration war stets über 100 µg/l (Schuster et al., 2022). Damit überschreitet der Durchschnittswert deutlich selbst die höchste hier gemessene MSC (A. baylyi BD413 mCherry 652 mit 70 µg/l). Dass die Konzentrationen von Meropenem so deutlich über der MSC liegen, war nicht zu erwarten, da β-Lactam-Antibiotika eigentlich sehr schnell im Abwasser inaktiviert werden (Ribeiro et al., 2018). Wahrscheinlich kann die hohe Konzentration nur aufrechterhalten werden, da im Krankenhausabwasser ein ständiger Zustrom herrscht (Schuster et al., 2022). Für Piperacillin wurde sogar ein Wert von über

3500 μg/l gemessen, die MSC von 1000 μg/l wurde im Schnitt aber nur während der Spitzenzeiten überschritten (Schuster et al., 2022). Bei Ciprofloxacin hingegen erreichten die Messwerte der gesammelten Proben nie die 51,51 μg/l von A. baylyi BD413 mCherry 777, dafür lagen sie immer um oder über der MSC von A. baylyi BD413 mCherry 652 mit 16,74 μg/l (Schuster et al., 2022).

Neben der direkten Selektion von Stämmen oberhalb der MSC spielen auch andere Effekte eine Rolle in der Ausbreitung von ARB. So reicht z. B. 1 µg/l Tetracyclin für die Anreicherung der Resistenzgene tetA und tetG in Biofilmen (Lundström et al., 2016). Diese speziesunabhängige Selektion gilt auch für 1 µg/l Ciprofloxacin und die zumeist plasmidbasierten Gene gnr. Mit 5-10 µg/l Ciprofloxacin akkumulieren sich in Biozönosen auch bevorzugt E. coli mit Mutationen in gyrA (Kraupner et al., 2018). Klasse I Integrons lassen sich mit Konzentration zwischen 7,8 und 15,6 µg/l selektieren, was im Bereich der Messwerte von Schuster et al. (2022) liegt (Stanton et al., 2020). Bei Cefotaxim lassen sich mit nur 0,4 μg/l Stämme mit β-Lactamasen anreichern (Murray et al., 2018). Außerdem können Substanzen aus der Klärung des Abwassers oder der Desinfektion von Trinkwasser die Mutationsrate oder die Aufnahme von DNA in die Zelle erhöhen und damit die Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen und ARB beschleunigen (Mantilla-Calderon et al., 2019). Beispielsweise Bromessigsäure, ein Nebenprodukt der Trinkwasserdesinfektion, kann nachweislich die Transformationsrate von A. baylyi BD413 erhöhen. Da Bromessigsäure oxidativen Stress verursacht und Schäden an der DNA hervorruft, ist davon auszugehen, dass andere natürlich kompetente Organismen ebenfalls angeregt werden (Mantilla-Calderon et al., 2019). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Rohabwasser selektive Konzentrationen von AB nachweisbar sind. Selbst nach der Behandlung des Abwassers sind noch selektive Prozesse für Resistenzgene möglich. Insgesamt enthält Abwasser, besonders mit klinischem Bezug, ein sehr komplexes und variables Substanzgemisch, dessen Auswirkungen auf das Ökosystem und die Mikrobiozönose sich nur schwer abschätzen lassen, insbesondere da noch zu wenig darüber bekannt ist (Lindberg et al. 2014; Michael et al., 2013; Ribeiro et al., 2018; Stanton et al., 2020; Verlicchi et al. 2012; Voigt et al. 2019). Bisher wurde nur die Anreicherung der Carbapenemase OXA-48 beschrieben (Bengtsson-Palme et al. 2016).

Dabei muss beachtet werden, dass die komplexe Biozönose von Umweltbakterien sich auch von niedrigen Antibiotikakonzentrationen bereits beeinflussen lässt. Denn auch niedrige Konzentrationen von AB oder deren völlige Abwesenheit kann selektiv auf die Zusammensetzung des Ökosystems wirken. Wie in Abbildung 7 zu sehen, sind bei Konzentrationen unterhalb der MSC die sensiblen Stämme im Vorteil und können die resistenteren überwachsen. Dabei entscheidet die Konzentration wie schnell resistentere

Bakterien aus dem Ökosystem verdrängt werden. Die engl.:" Minimal Increased Persistence Concentration" (MIPC), bezeichnet ein Selektionsfenster innerhalb dessen Bakterienstämme mit Resistenzgenen länger in der Umwelt verbleiben. Wie in

Abbildung 40 dargestellt, reichern sich oberhalb der MSC resistente Bakterien im Ökosystem an, unterhalb der MIPC hingegen verringert sich deren Anzahl langsam in der Biozönose. Da resistente Bakterien bei der MIPC mit verringerter Geschwindigkeit aus der Umwelt verschwinden, erhöht sich das Expositionsrisiko für den Menschen. Außerdem haben die resistenten Stämme mit Wachstumsnachteilen länger Zeit sich anzupassen. So können durch sekundäre Mutationen die Nachteile ganz oder teilweise ausgeglichen werden. Die Anzahl der ARB ist bei der MIPC folglich höher als in Ökosystemen ohne den Einfluss von AB (Stanton et al., 2020).

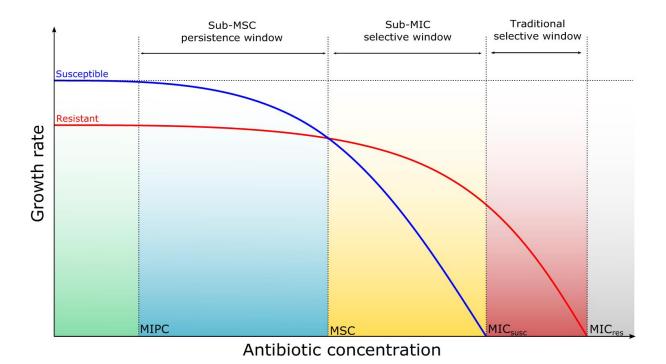


Abbildung 40: Ergänzende Darstellung zu Abbildung 7. Unterhalb der Minimalen Selektiven Konzentration (MSC) liegt die Minimale Erhöhte Persistenzkonzentration (MIPC). In dem Selektionsfenster zwischen MIPC und MSC werden die resistenten Bakterien langsamer überwachsen als bei noch geringeren Konzentrationen und verbleiben deshalb länger in der Umwelt. Abbildung entnommen aus Stanton et al. (2020).

Ein weiterer Faktor, der für die vermehrte Präsenz von ARB in Abwässern sorgt, sind die toleranten Bakterien. Auch wenn sie nur leicht fluktuierende Konzentrationen von AB tolerieren können, so stellen sie gerade im nosokomialen Abwasser eine gesteigerte Gefahr dar. Denn sie können bakterioziden AB, die für ihre Wirkung Wachstum benötigen, wie β-Lactame, besser widerstehen und deshalb länger überleben. Auch wenn sich die MHK von toleranten Bakterien erstmal nicht grundsätzlich erhöht, neigen sie dennoch dazu resistenzsteigernde Mutationen zu akkumulieren (Fridman et al., 2014; Levin-Reisman et al.,

2017). Entsprechend verwundert es nicht, dass in Krankenhausabwässern vermehrt ARB gefunden werden (Müller et al., 2018; Kehl et al., 2022; Sib et al., 2019; Sib et al., 2020).

## 4.2 Staphylococcus argenteus BN75

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde der Stamm BN75 bereits in Schuster (2013) grundlegend untersucht und als archetypischer S. aureus eingeordnet. Jedoch veränderte die Einführung der neuen Art S. argenteus die Lage grundsätzlich (Tong et al., 2015). Schuster (2013) traf bereits die Annahme, dass S. aureus BN75 und S. aureus MSHR1132 sehr eng miteinander verwandt sein könnten. Im Jahre 2015 wurde S. aureus MSHR1132 zum Typstamm einer neu eingeführten Art und somit zu S. argenteus MSHR1132 (Tong et al., 2015). Die zuvor gehegten Zweifel, ob es sich bei BN75 wirklich um einen S. aureus handelte, schienen sich zu bestätigen. Die Sequenzierung zeigte, dass sich die Genome von BN75 und S. argenteus MSHR1132 zu 99,1 % entsprechen und sich die beiden Stämme damit sehr ähnlich sind. Die Übereinstimmung von nur 87,14 % des Genoms von BN75 zu S. aureus N315 unterschreitet sogar die Artgrenze von 95%. Mit der WGS von BN75 konnte also die Frage "S. aureus oder S. argenteus" zu Gunsten von Zweiterem entschieden werden. Dabei scheint besonders der große prozentuale Unterschied in der Übereinstimmung mit S. aureus überraschend. Schaut man sich aber die biochemischen Tests an, so weisen die beiden Arten in den typischen Tests, wie die der Bunten Reihe oder den API-Tests, das gleiche Profil auf (Schuster 2013). Auch in der Koloniemorphologie sind bis auf die graue/weiße Färbung der Kolonien keine Unterschiede auszumachen, wobei gesagt werden muss, dass auch 10 % der klinischen S. aureus-Stämme nach dem Verlust des Sigmafaktors B diese Farbe ausbilden, so dass mit traditionellen Bestimmungsmethoden keine Unterschiede vorlagen. Die Analyse des Genoms bestätigte auch die Beobachtungen von Schuster (2013), dass BN75 keinerlei Resistenzgene aufweist und deshalb sensibel gegenüber den getesteten AB ist. Weiterhin fehlen im Genom von BN75 einige Virulenzfaktoren, die in S. aureus öfter vorhanden sind. Ein sehr bekanntes Beispiel hierfür stellt das PVL dar. Schuster (2013) zeigte bereits per PCR, dass BN75 kein Gen für PVL besitzt, was durch WGS bestätigt wurde. Dies zeigt die Ähnlichkeit zu S. argenteus MSHR1132 auf, welcher ebenfalls kein PVL hat (Hold et al., 2011), obschon die Spezies S. argenteus grundsätzlich PVL besitzen kann (Aung et al., 2017; Eshaghi et al., 2021; Zhang et al., 2017). Auch wenn S. argenteus prinzipiell die gleichen Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren wie S. aureus besitzen kann (Zhang et al., 2017), sind Isolate von S. argenteus zumeist weniger virulent, da sie häufig nur einige wenige Virulenzfaktoren besitzen (Chantratita et al., 2016). BN75 bildet mit seiner Abwesenheit von quasi allen sekundär akquirierten Virulenzfaktoren, wie Enterotoxinen, Exofoliativ-Toxin, TSST und PVL, aber dennoch eine Ausnahme. Auch das Fehlen von sämtlichen Resistenzmarkern gegen Antibiotika zeigt nochmals deutlich die Ferne zur menschlichen Zivilisation auf. Wie in Abbildung 31 A gezeigt, besitzt BN75 im Gegensatz zu S. argenteus MSHR1132 keine SCCmec-Kassette. Das in dieser Kassette kodierte mecA vermittelt eine Resistenz gegenüber Methicillin und hebt den Stamm S. argenteus MSHR1132 in die Klasse der Methicillin resistenten S. argenteus äquivalent zu einem MRSA. Einer der wenigen im Genom von BN75 vorhandenen Virulenzfaktoren ist das α-Hämolysin. Das entsprechende Gen hla ist typisch für S. argenteus (Johansson et al., 2019), aber auch in S. aureus (Wardenburg et al., 2007) und S. schweitzeri (Johansson et al., 2019) vorhanden. Im Gen hlb für das β-Hämolysin sitzen bei S. aureus üblicherweise Phagen, die Proteine für die Immunevasion beisteuern (van Wamel et al., 2006). BN75 hat an gleicher Stelle ebenfalls Phagen-vermittelte Gene für die Immunevasion, wie sak, scn etc. Die zwei Gene mprF und dltA vermitteln die Senkung der negativen Ladung der Zellhülle, dies dient u. a. dazu sich vor kationischen antimikrobiellen Peptiden (engl.: "Cationic antimicrobial peptides" CAMPs) zu schützen (Slavetinsky et al., 2012). Ein weiterer Hinweis auf die geringe Virulenz von BN75 findet sich im nur teilweise vorhandenen ess/esx Typ VII Sekretionssystem. Dieses spielt eine wichtige Rolle bei der Virulenz von S. aureus (Kneuper et al., 2014) und ist auch in S. argenteus MSHR1132 vollständig vorhanden (Holt et al., 2011). Das Biofilmcluster ica ist eigentlich typisch für S. aureus und S. epidermidis, aber dennoch in BN75 vorhanden (Cramton et al., 1999). Die drei genomischen Inseln vSAa, vSAβ und vSAγ sind sowohl in BN75 als auch in S. argenteus MSHR1132 vorhanden und sind typisch sowohl für S. aureus als auch für S. argenteus (Goswami et al., 2021). Die genaue Rolle der gefundenen Aureusimine war lange nicht bekannt (Secor et al., 2012; Wilson et al., 2013), aber sie wurden bei anderen Staphylokokken, wie S. aureus, S. epidermidis und S. capitis, ebenfalls nachgewiesen (Zimmermann et al., 2010). Inzwischen weiß man, dass es sich bei den Aureusiminen um einen Pathogenitätsfaktor handelt, der eine Rolle bei der Zytotoxizität von S. aureus spielt. Denn einige nosokomiale Stämme von S. aureus weisen unter anderem Mutationen in ausA auf, die die Zytotoxizität verringern und so die intrazelluläre Persistenz erhöhen können (Hachani et al., 2023). Der durch die WGS ermittelte SPA-Typ t7462 und MLST-Typ ST2198 entsprechen den Ergebnissen von Schuster (2013).

Seit der Einführung der neuen Art *S. argenteus* ergab sich das Problem der zuverlässigen Differenzierung zu *S. aureus*. Besonders in der klinischen Routine, in der Zeit ein extrem wichtiger Faktor ist, stellt er das Personal vor neue Herausforderungen (Johansson et al., 2019; Kaden et al., 2019). Wie in Schuster (2013) und auch hier gezeigt, sind die beiden Arten mit klassischen Verfahren quasi nicht zu unterscheiden (Zhang et al., 2017). Denn die graue Färbung der Kolonien kann höchstens ein Anfangsverdacht sein, da auch *S. aureus* teilweise graue Kolonien bildet. Außerdem bilden KNS ebenfalls graue Kolonien und treten

statistisch in der Krankenhausroutine sehr viel häufiger in Erscheinung als S. aureus oder S. argenteus. Die einzig sichere Methode die beiden Arten auseinander zu halten, scheint das WGS (Johansson et al., 2019; Kaden et al., 2019). Diese Methode ist allerdings sehr zeitund kostenaufwändig. Manche Autoren schlagen deshalb vor, in der Routine nicht zwischen S. aureus und S. argenteus zu differenzieren, da der benötigte Aufwand zu groß und der Unterschied höchstens für die Forschung interessant sei (Johansson et al., 2019; Kaden et al., 2019), da sich die Behandlung der Infektion nicht unterscheidet (Kaden et al., 2018). Rückblickende Studien zeigen ein mindestens genauso hohes Potential für schwere und tödliche Erkrankungen bei S. argenteus, wie bei S. aureus (Chantratia et al., 2016; Chen et al., 2018; Zhang et al., 2017). Zwar scheint S. argenteus im Vergleich zu S. aureus ein geringeres Risiko für respiratorische Insuffizienz darzustellen, dafür aber scheinbar eine leicht höhere Rate von Bakteriämien und Sepsen zu erzeugen (Chen et al., 2018; Zhang et al., 2017). Auch wenn noch immer zu wenige Studien für wirklich zuverlässige Aussagen vorhanden sind, ist S. argenteus auf keinen Fall zu unterschätzen (Chantratia et al., 2016; Chen et al., 2018; Zhang et al., 2017). Um das Problem der fehlenden Daten zu lösen und S. argenteus standardmäßig in der klinischen Routine zu identifizieren, wurden spezifische Marker im MALDI-TOF-MS-Spektrum erarbeitet. Die Datenbanken des Bruker-MALDI MS wurden inzwischen für eine routinemäßige Identifikation erweitert, so dass diese Art und S. schweitzeri ohne Mehraufwand zuverlässig identifiziert werden können (Witteveen et al., 2022). Wichtig ist dabei, dass die Verschiebung einzelner Maxima auch innerhalb einer Art auftreten kann und so z. B. bei S. aureus zur Differenzierung verschiedener klonaler Linien genutzt wird (Josten et al., 2013). Für S. aureus stellt das δ-Toxin bei m/z 3006 einen wichtigen Marker dar, welcher anzeigt, ob dessen agr-System aktiv ist oder nicht. Mit PSMmec bei m/z 2411-2419 als zweiten Indikator kann das Gen mecA und damit eine Resistenz gegen Methicillin bereits bei der Speziesidentifikation per MALDI-TOF-MS festgestellt werden (Josten et al., 2014). Dieser passive Nachweis der SCCmec-Kassette konnte neben S. aureus auch für KNS gezeigt werden (Schuster et al., 2018). Auch wenn die WGS gezeigt hat, dass BN75 im orfX keine SSCmec-Kassette besitzt, können S. argenteus und auch S. schweitzeri dennoch solche Kassetten tragen (Kaden et al., 2018; Zhang et al., 2017). So wäre auch bei diesen beiden Spezies der Nachweis von mecA per MALDI-TOF-MS möglich

Über die dritte nahe verwandte Art, *S. schweitzeri*, ist bisher wenig bekannt und es gibt auch noch keine gemeldeten Krankheitsfälle. Funde beschränkten sich bisher fast ausschließlich auf Wildtiere und deren Fleisch in Subsahara-Afrika. In den betroffenen Ländern Gabun, Nigeria, Kongo und der Elfenbeinküste gab es bisher keine Berichte über die Besiedlung von Nutztieren und auch nur drei Fälle der Kolonisierung von Menschen sind bekannt, wobei alle nasopharyngeal besiedelt wurden (Akoua-Koffi et al., 2022; Grossmann et al., 2021). Wie bei

S. argenteus liegen auch hier zu wenig Daten vor, da S. schweitzeri erst seit ein paar Jahren bekannt ist und leicht fälschlicherweise als S. aureus missidentifiziert werden kann (Akoua-Koffi et al., 2022; Grossmann et al., 2021). Durch diese mögliche Unterrepräsentation von S. schweitzeri könnte es eventuell dazu kommen, dass die zunehmende Kolonisierung von Menschen und Nutztieren nicht rechtzeitig entdeckt wird und es eine versteckte Zunahme von Zoonosen gibt. Dieser Gefahr im Sinne von One Health gilt es vorzubeugen (Akoua-Koffi et al., 2022). Deshalb wurden in dieser Dissertation Biomarker erarbeitet, um S. schweitzeri mittels seines MALDI-TOF-MS-Spektrums zu identifizieren. Mit Hilfe der Marker bei m/z 5283 und mit m/z 4502 oder m/z 4525 als zweites Maximum ist eine schnelle und eindeutige Differenzierung zu S. aureus und S. argenteus möglich (Shittu et al., 2020).

## 4.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein gramnegatives Testsystem für MSCs erstellt werden. Da die ESKAPE-Organismen aber auch grampositive Erreger enthalten, wäre die Erstellung eines zweiten grampositiven Testsystems denkbar. Idealerweise würde das zweite Testsystem ähnliche Eigenschaften aufweisen. Aus den ESKAPE-Organismen könnten Enterokokken oder S. aureus die Grundlage für dieses System bilden. Auch die Bakterien im zweiten Testsystem sollten farblich markiert werden und ein natürliches Resistenzplasmid, wie z. B. pSK41, erhalten. Die Farbstoffe GFP und mCherry sind auch für ein grampositives Testsystem geeignet und eine entsprechende Methode zur Auszählung der MSCs per Durchflusszytometer konnte bereits durch diese Arbeit etabliert werden. Wenn beide Testsysteme etabliert sind, wäre der Einsatz beider gleichzeitig interessant, vor allem um sich komplexeren Mikrobiozönosen anzunähern und zu untersuchen welchen Einfluss die zusätzliche Konkurrenz durch das zweite Testsystem ausübt. Um sich den komplexen Ökosystemen im Labor noch weiter anzunähern, wäre auch die Versetzung der MSC-Tests mit Abwasser von Interesse. Denn nicht nur kommt ein komplexes Substanzgemenge hinzu, sondern auch viele unmarkierte Mikroorganismen. In ersten Versuchen dieser Art konnte A. baylyi BD413 mCherry 652 selektiert werden (pers. Mitteilung Axtmann).

Um die komplexen Substanzgemenge von Abwässern im Labor noch besser abbilden zu können, wäre eine Erweiterung der verwendeten antimikrobiellen Substanzen und die Erweiterung der bereits getesteten Kombinationen denkbar. Es gibt noch mehr AB, wie etwa Imipenem, Cephalosporine der 3. und 4. Generation, Polymyxin oder Tigecyclin, die eine hohe klinische Relevanz haben. Insbesondere die gleichzeitige Kombination von mehreren AB mit Schwermetallen und Desinfektionsmitteln könnte relevant sein. Außerdem wäre die Kombination der drei Schwermetalle Kupfer, Zink und Cadmium interessant, da *A. baumannii* 

bei Cadmium-induziertem Stress Zink ausscheidet und Kupfer in der Zelle anreichert, um die Fitness zu erhöhen (Alquethamy et al., 2021).

Auch die Checkerboard-Assays könnten erweitert werden, da in dieser Arbeit lediglich eine Kombination von AB getestet werden konnte. Eine Ausweitung der gleichzeitig eingesetzten AB und die Einbindung von anderen Substanzen wie Schwermetallen, Desinfektionsmittel, Antiseptika etc., wäre interessant.

## 5. Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte ein gramnegatives Testsystem zur Ermittlung der Minimalen Selektiven Konzentrationen (MSC) erstellt werden. Hierfür wurden mit Hilfe von Genkassetten zwei Fluorophore in das Genom des natürlich kompetenten Acinetobacter baylyi BD413 integriert. In die so entstandenen Stämme A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry wurde jeweils noch das Resistenzplasmid pHHV216 eingebracht. Diese beiden plasmidtragenden Stämme A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 vervollständigten das Quartett der benötigten Teststämme. Während der Experimente zur Erzeugung von weiteren Plasmid-tragenden Stämmen wurden außerdem noch die spontanen Mutanten A. baylyi BD413 GFP 652, A. baylyi BD413 mCherry 652, A. baylyi BD413 mCherry 777, A. baylyi BD413 GFP 807 und A. baylyi BD413 mCherry 807 selektiert. Diese wiesen erhöhte Werte der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) im Gegensatz zu ihrem jeweiligen Elternstamm auf und wurden deshalb näher untersucht. Die Sequenzierung des Genoms von A. baylyi BD413 mCherry 652, A. baylyi BD413 mCherry 777 und A. baylyi BD413 mCherry 807 ergab, dass diese Stämme kein Resistenzplasmid aufgenommen hatten. Stattdessen konnten die Veränderungen im Genom größtenteils die erhöhten MHK-Werte erklären. Bei A. baylyi BD413 mCherry 652 z. B. führte die Deletion des Repressorgens adeN vermutlich zur Überexpression des Exportersystems AdelJK. Dieses ist nicht nur für die Resistenz gegen eine Vielzahl an Antibiotika verantwortlich, sondern auch an der Resistenz gegen quartäre Ammoniumverbindungen etc. beteiligt. Diese Mutationen konnten mittels nochmaliger Sequenzierung der entsprechenden Abschnitte im Genom und dem Vergleich mit dem Elternstamm bestätigt werden. In einem Agardiffusionstest zeigten die spontanen Mutanten keine abweichende Empfindlichkeit zu ihrem Elternstamm gegen die getesteten Schwermetalle. In den durchgeführten MHKs ergaben sich keine Abweichungen von A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry zum Elternstamm A. baylyi BD413. A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 zeigten lediglich bei Chloramphenicol, Sulfadiazin, Sulfamethoxazol und Tetracyclin eine erhöhte Resistenz, was den durch das Plasmid pHHV216 vermittelten Resistenzen entspricht. In den angefertigten Wachstumskurven zeigte sich für A. baylyi BD413 GFP und A. baylyi BD413 mCherry ein um ca. 4 % langsameres Wachstum im Vergleich zum Elternstamm. Diese Verringerung dürfte wohl die metabolische Last der Fluoreszenz darstellen. Der Unterschied zwischen beiden markierten Stämmen war hingegen vernachlässigbar klein. Die beiden plasmidtragenden Stämme A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 zeigten mit einer um etwas mehr als 50 % höheren Verdopplungszeit deutliche Zeichen der metabolischen Last des über 58 kb großen Resistenzplasmides. Auch hier war wieder der Unterschied der beiden Stämme untereinander vernachlässigbar klein. Unter den spontanen Mutanten stachen lediglich A.

baylyi BD413 mCherry 652 mit einem um ca. 12 % und A. baylyi BD413 mCherry 777 mit über 80 % verringertem Wachstum im Vergleich zu A. baylyi BD413 hervor. Dabei wuchs A. baylyi BD413 mCherry 777 sogar noch langsamer als die plasmidtragenden Stämme. In einer ersten Versuchsreihe konnte bei den durchgeführten Checkerboard-Assays keine Synergie zwischen Erythromycin und Sulfadiazin für die Stämme A. baylyi BD413 GFP, A. baylyi BD413 mCherry, A. baylyi BD413 GFP pHHV216 und A. baylyi BD413 mCherry pHHV216 festgestellt werden. Mit dem erweiterten Testsystem konnten MSCs für zehn verschiedene Antibiotika, Benzalkoniumchlorid und die Kombination aus Tetracyclin und Sulfadiazin ermittelt werden. Mit einer Ausnahme lagen die MSC stets unter der MHK. Bei Fosfomycin lag die MSC von A. baylyi BD413 GFP 652 knapp über der MHK. Die hier ermittelten MSCs im Bereich von µg/l bzw. sogar mg/l liegen für den größten Teil der geklärten Abwässer über den gefundenen Substanzmengen im ng/l Bereich. Aber in Krankenhausabwasser, insbesondere im Rohabwasser, liegen die gefundenen Konzentrationen durchaus über den MSCs. Ausnahmen, wie die Abwässer von pharmazeutischen Produktionsstätten oder die damit verunreinigte Umwelt, überschreiten die MSCs stellenweise sogar drastisch, z. B. mit dem 22700-fachen der MSC für Tetracyclin (Michael et al., 2013) oder mit dem mehr als 126-fachen der MSC für Ciprofloxacin (Fick et al., 2009; Schuster et al., 2022). Es ist also davon auszugehen, dass es selektive Konzentrationen im Abwasser gibt, die die MSC überschreiten und damit das Expositionsrisiko für den Menschen erhöhen.

Im zweiten Teil konnte das Isolat BN75 durch Sequenzierung des Genoms der Spezies S. argenteus zugeordnet werden. Es wies eine 99,1 % Übereinstimmung mit dem Typstamm S. argenteus MSHR1132 auf und überschritt damit deutlich die Speziesgrenze von 95 %. Im Vergleich zu S. argenteus MSHR1132 ist das Genom von S. argenteus BN75 um 8587 bp kleiner. Der Größenunterschied ergibt sich vorwiegend aus dem Fehlen der Gene für Antibiotikaresistenzen, Virulenz und der verschiedenen Anzahl an Phagen. Als eine der Besonderheiten hat S. argenteus BN75 z. B.im orfX keine SSC-mec-Kassette, sondern eine Cytosin Methyltransferase und eine Restriktionsendonuklease kombiniert mit weiteren hypothetischen Proteinen. Diese Abweichungen und die völlige Sensibilität gegen alle getesteten AB betonen die deutliche Ferne von anthropogenen Einflüssen aufgrund der Herkunft von einem wildlebenden westlichen Flachlandgorilla aus dem Regenwald von Gabun. Zudem konnten spezifische Marker im MALDI-TOF-MS Spektrum erarbeitet werden, um die drei sehr eng verwandten Spezies S. aureus, S. argenteus und S. schweitzeri zuverlässig voneinander differenzieren zu können. Durch die Eintragung in die Datenbank des MALDI erlauben die vorgestellten Maxima bei m/z 3036, m/z 4428 und m/z 5283 eine schnelle und kostengünstige Identifikation von S. argenteus in der klinischen Routine. Mit Hilfe der Biomarker bei m/z 5283 und *m/z* 4502 oder *m/z* 4525 als zweites Maximum kann *S. schweitzeri* eindeutig mittels seines MALDI-TOF-MS-Spektrums identifiziert und von den beiden anderen Spezies unterschieden werden.

## 6. Literaturverzeichnis

Abdi, S. N., Ghotaslou, R., Ganbarov, K., Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., & Kafil, H. S. (2020). *Acinetobacter baumannii* Efflux Pumps and Antibiotic Resistance. *Infection and drug resistance*, *13*, 423–434. https://doi.org/10.2147/IDR.S228089

Achilles, J., Harms, H., & Müller, S. (2006). Analysis of living *S. cerevisiae* cell states--a three color approach. *Cytometry. Part A: The journal of the International Society for Analytical Cytology*, 69(3), 173–177. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20212

Acker, K. P., Wong Fok Lung, T., West, E., Craft, J., Narechania, A., Smith, H., O'Brien, K., Moustafa, A. M., Lauren, C., Planet, P. J., & Prince, A. (2019). Strains of *Staphylococcus aureus* that Colonize and Infect Skin Harbor Mutations in Metabolic Genes. *iScience*, *19*, 281–290. https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.07.037

Adams, M. D., Goglin, K., Molyneaux, N., Hujer, K. M., Lavender, H., Jamison, J. J., MacDonald, I. J., Martin, K. M., Russo, T., Campagnari, A. A., Hujer, A. M., Bonomo, R. A., & Gill, S. R. (2008). Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii. Journal of bacteriology*, *190*(24), 8053–8064. https://doi.org/10.1128/JB.00834-08

Adedeji W. A. (2016). The treasure called antibiotics. Annals of Ibadan postgraduate medicine, 14(2), 56–57.

Aires-de-Sousa M. (2017). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: Current overview. *Clinical microbiology and infection: The official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *23*(6), 373–380. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.002

Akoua-Koffi, C., Kacou N'Douba, A., Djaman, J. A., Herrmann, M., Schaumburg, F., & Niemann, S. (2022). *Staphylococcus schweitzeri* - An emerging one health pathogen? *Microorganisms*, *10*(4), 770. https://doi.org/10.3390/microorganisms10040770

Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M. L., Hamze, M., & Kempf, M. (2016). Reservoirs of non-baumannii Acinetobacter Species. *Frontiers in microbiology*, *7*, 49. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00049

Ali, M. M., Li, F., Zhang, Z., Zhang, K., Kang, D. K., Ankrum, J. A., Le, X. C., & Zhao, W. (2014). Rolling circle amplification: A versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chemical Society reviews*, *43*(10), 3324–3341. https://doi.org/10.1039/c3cs60439j

Almasaudi S. B. (2018). *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi journal of biological sciences*, *25*(3), 586–596. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.009

Alquethamy, S. F., Adams, F. G., Maharjan, R., Delgado, N. N., Zang, M., Ganio, K., Paton, J. C., Hassan, K. A., Paulsen, I. T., McDevitt, C. A., Cain, A. K., & Eijkelkamp, B. A. (2021). The molecular basis of *Acinetobacter baumannii* cadmium toxicity and resistance. *Applied and environmental microbiology*, *87*(22), e0171821. https://doi.org/10.1128/AEM.01718-21

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, *215*(3), 403–410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Andersson, D. I., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? *Nature reviews. Microbiology*, *8*(4), 260–271. https://doi.org/10.1038/nrmicro2319

Andrews J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *48 Suppl 1*, 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\_1.5

Ansari, A. M., Ahmed, A. K., Matsangos, A. E., Lay, F., Born, L. J., Marti, G., Harmon, J. W., & Sun, Z. (2016). Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments. *Stem cell reviews and reports*, *12*(5), 553–559. https://doi.org/10.1007/s12015-016-9670-8

Ansari, S., Hays, J. P., Kemp, A., Okechukwu, R., Murugaiyan, J., Ekwanzala, M. D., Ruiz Alvarez, M. J., Paul-Satyaseela, M., Iwu, C. D., Balleste-Delpierre, C., Septimus, E., Mugisha, L., Fadare, J., Chaudhuri, S., Chibabhai, V., Wadanamby, J. M. R. W. W., Daoud, Z., Xiao, Y., Parkunan, T., Khalaf, Y, Global AMR Insights Ambassador Network (2021). The potential impact of the COVID-19 pandemic on global antimicrobial and biocide resistance:

An AMR Insights global perspective. *JAC-antimicrobial resistance*, *3*(2), dlab038. https://doi.org/ 10.1093/jacamr/dlab038

Antunes, L. C., Imperi, F., Carattoli, A., & Visca, P. (2011). Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PloS one*, *6*(8), e22674. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022674

Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., & Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, *2*(7), 1751–1773. https://doi.org/10.3390/toxins2071751

Ariza-Miguel, J., Hernández, M., Fernández-Natal, I., & Rodríguez-Lázaro, D. (2014). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harboring mecC in livestock in Spain. *Journal of clinical microbiology*, *52*(11), 4067–4069. https://doi.org/10.1128/JCM.01815-14

Augsburger, N., Mantilla-Calderon, D., Daffonchio, D., & Hong, P. Y. (2019). Acquisition of extracellular DNA by *Acinetobacter baylyi* ADP1 in response to solar and UV-C<sub>254nm</sub> disinfection. *Environmental science & technology*, *53*(17), 10312–10319. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01206

Aung, M. S., San, T., Aye, M. M., Mya, S., Maw, W. W., Zan, K. N., Htut, W. H. W., Kawaguchiya, M., Urushibara, N., & Kobayashi, N. (2017). Prevalence and genetic characteristics of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus argenteus* isolates harboring panton-valentine leukocidin, enterotoxins, and TSST-1 genes from food handlers in Myanmar. *Toxins*, *9*(8), 241. https://doi.org/10.3390/toxins9080241

Austin, D. J., Kristinsson, K. G., & Anderson, R. M. (1999). The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(3), 1152–1156. https://doi.org/10.1073/pnas.96.3.1152

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, *6*(2), 71–79. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005

Baquero, F., Negri, M. C., Morosini, M. I., & Blázquez, J. (1998). Antibiotic-selective environments. *Clinical infectious diseases: An official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *27 Suppl 1*, S5–S11. https://doi.org/10.1086/514916

Barbe, V., Vallenet, D., Fonknechten, N., Kreimeyer, A., Oztas, S., Labarre, L., Cruveiller, S., Robert, C., Duprat, S., Wincker, P., Ornston, L. N., Weissenbach, J., Marlière, P., Cohen, G. N., & Médigue, C. (2004). Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter sp.* ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic acids research*, 32(19), 5766–5779. https://doi.org/10.1093/nar/gkh910

Baron, S. (Ed.). (1996). *Medical Microbiology*. (4th ed.). University of Texas Medical Branch at Galveston.

Basak, S., Singh, P., & Rajurkar, M. (2016). Multidrug resistant and extensively drug resistant bacteria: A study. *Journal of pathogens*, *2016*, 4065603. https://doi.org/10.1155/2016/4065603

Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, *45*(4), 493–496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4\_ts.493

Baumann, P., Doudoroff, M., & Stanier, R. Y. (1968). Study of the Moraxella group. I. Genus Moraxella and the Neisseria catarrhalis group. *Journal of bacteriology*, *95*(1), 58–73. https://doi.org/10.1128/jb.95.1.58-73.1968

Bazzi, W., Abou Fayad, A. G., Nasser, A., Haraoui, L. P., Dewachi, O., Abou-Sitta, G., Nguyen, V. K., Abara, A., Karah, N., Landecker, H., Knapp, C., McEvoy, M. M., Zaman, M. H., Higgins, P. G., & Matar, G. M. (2020). Heavy metal toxicity in armed conflicts potentiates amr in *A. baumannii* by selecting for antibiotic and heavy metal co-resistance mechanisms. *Frontiers in microbiology, 11*, 68. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00068

Beceiro, A., Pérez-Llarena, F. J., Pérez, A., Tomás, M.delM., Fernández, A., Mallo, S., Villanueva, R., & Bou, G. (2007). Molecular characterization of the gene encoding a new AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baylyi*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(5), 996–1000. https://doi.org/10.1093/jac/dkm070

Belisario, J. C., Lee, H. H., Luknauth, H., Rigel, N. W., & Martinez, L. R. (2021). *Acinetobacter baumannii* strains deficient in the *Clp* chaperone-protease genes have reduced virulence in a murine model of pneumonia. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *10*(2), 204. https://doi.org/10.3390/pathogens10020204

Bengtsson-Palme, J., & Larsson, D. G. (2016). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environment international*, *86*, 140–149. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015

Bennett P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, *153 Suppl 1*(Suppl 1), S347–S357. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607

Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H., & Kompala, D. S. (2009). Plasmid-encoded protein: The principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. Biotechnology Bioengineering, 1990. *Biotechnology and bioengineering*, 102(5), 1284–1283. https://doi.org/10.1002/bit.22292

Berg, T., Firth, N., Apisiridej, S., Hettiaratchi, A., Leelaporn, A., & Skurray, R. A. (1998). Complete nucleotide sequence of pSK41: Evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids. *Journal of bacteriology*, *180*(17), 4350–4359. https://doi.org/10.1128/JB.180.17.4350-4359.1998

Bernardo, K., Pakulat, N., Macht, M., Krut, O., Seifert, H., Fleer, S., Hünger, F., & Krönke, M. (2002). Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics*, *2*(6), 747–753. https://doi.org/10.1002/1615-9861(200206)2:6<747::AID-PROT747>3.0.CO;2-V

Bevis, B. J., & Glick, B. S. (2002). Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed). *Nature biotechnology*, *20*(1), 83–87. https://doi.org/10.1038/nbt0102-83

Blau, K., Bettermann, A., Jechalke, S., Fornefeld, E., Vanrobaeys, Y., Stalder, T., Top, E. M., & Smalla, K. (2018). The transferable resistome of produce. *mBio*, *9*(6), e01300-18. https://doi.org/10.1128/mBio.01300-18

Bodén, M. K., & Flock, J. I. (1989). Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, *57*(8), 2358–2363. https://doi.org/10.1128/iai.57.8.2358-2363.1989

Boost, M. V., O'Donoghue, M. M., & James, A. (2008). Prevalence of *Staphylococcus aureus* carriage among dogs and their owners. *Epidemiology and infection*, *136*(7), 953–964. https://doi.org/10.1017/S0950268807009326

Boundy, S., Safo, M. K., Wang, L., Musayev, F. N., O'Farrell, H. C., Rife, J. P., & Archer, G. L. (2013). Characterization of the *Staphylococcus aureus* rRNA methyltransferase encoded by *orfX*, the gene containing the staphylococcal chromosome Cassette *mec* (SCCmec) insertion site. *The Journal of biological chemistry*, *288*(1), 132–140. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.385138

Bourn, S. J., Evans, G., & O'Shea, M. K. (2013). Panton-Valentine Leukocidin *Staphylococcus aureus* (PVL-SA) - an uninvited stowaway aboard a Royal Navy submarine. *Journal of the Royal Naval Medical Service*, *99*(1), 3–8.

Braibant, M., Chevalier, J., Chaslus-Dancla, E., Pagès, J. M., & Cloeckaert, A. (2005). Structural and functional study of the phenicol-specific efflux pump *FloR* belonging to the major facilitator superfamily. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*(7), 2965–2971. https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2965-2971.2005

Broszat, M., Nacke, H., Blasi, R., Siebe, C., Huebner, J., Daniel, R., & Grohmann, E. (2014). Wastewater irrigation increases the abundance of potentially harmful gammaproteobacteria in soils in Mezquital Valley, Mexico. *Applied and environmental microbiology*, *80*(17), 5282–5291. https://doi.org/10.1128/AEM.01295-14

Brzoska, A. J., Hassan, K. A., de Leon, E. J., Paulsen, I. T., & Lewis, P. J. (2013). Single-step selection of drug resistant Acinetobacter baylyi ADP1 mutants reveals a functional redundancy in the recruitment of multidrug efflux systems. *PloS one*, *8*(2), e56090. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056090

Böhme, K., Morandi, S., Cremonesi, P., Fernández No, I. C., Barros-Velázquez, J., Castiglioni, B., Brasca, M., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2012). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 33(15), 2355–2364. https://doi.org/10.1002/elps.201100480

Cai, M., Wang, Z., Gu, H., Dong, H., Zhang, X., Cui, N., Zhou, L., Chen, G., & Zou, G. (2022). Occurrence and temporal variation of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital inpatient department wastewater: Impacts of daily schedule of inpatients and wastewater treatment process. *Chemosphere*, *292*, 133405. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133405

Carmona, M., & Magasanik, B. (1996). Activation of transcription at sigma 54-dependent promoters on linear templates requires intrinsic or induced bending of the DNA. *Journal of molecular biology*, *261*(3), 348–356. https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0468

Carr, E. L., Kämpfer, P., Patel, B. K. C., Gürtler, V., & Seviour, R. J. (2003). Seven novel species of Acinetobacter isolated from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *53*(Pt 4), 953–963. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02486-0

Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β-lactamases: An update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-antimicrobial resistance*, *3*(3), dlab092. https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092

Cavaillon, J. M., & Legout, S. (2022). Louis Pasteur: Between myth and reality. *Biomolecules*, 12(4), 596. https://doi.org/10.3390/biom12040596

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, *263*(5148), 802–805. https://doi.org/10.1126/science.8303295

Chambers H. F. (2001). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Mechanisms of resistance and implications for treatment. *Postgraduate medicine*, *109*(2 Suppl), 43–50. https://doi.org/10.3810/pgm.02.2001.suppl12.65

Chantratita, N., Wikraiphat, C., Tandhavanant, S., Wongsuvan, G., Ariyaprasert, P., Suntornsut, P., Thaipadungpanit, J., Teerawattanasook, N., Jutrakul, Y., Srisurat, N., Chaimanee, P., Anukunananchai, J., Phiphitaporn, S., Srisamang, P., Chetchotisakd, P., West, T. E., & Peacock, S. J. (2016). Comparison of community-onset *Staphylococcus argenteus* and *Staphylococcus aureus* sepsis in Thailand: A prospective multicentre observational study. *Clinical microbiology and infection: The official publication of the* 

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 22(5), 458.e11–458.e4.58E19. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.008

Chen, T. L., Siu, L. K., Lee, Y. T., Chen, C. P., Huang, L. Y., Wu, R. C., Cho, W. L., & Fung, C. P. (2008). *Acinetobacter baylyi* as a pathogen for opportunistic infection. *Journal of clinical microbiology*, *46*(9), 2938–2944. https://doi.org/10.1128/JCM.00232-08

Chen, S. Y., Lee, H., Wang, X. M., Lee, T. F., Liao, C. H., Teng, L. J., & Hsueh, P. R. (2018). High mortality impact of *Staphylococcus argenteus* on patients with community-onset staphylococcal bacteraemia. *International journal of antimicrobial agents*, *52*(6), 747–753. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.08.017

Cherney, L. T., Cherney, M. M., Garen, C. R., Niu, C., Moradian, F., & James, M. N. (2007). Crystal structure of N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with NADP(+). *Journal of molecular biology*, *367*(5), 1357–1369. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.033

Cheung, G. Y., Joo, H. S., Chatterjee, S. S., & Otto, M. (2014). Phenol-soluble modulins - critical determinants of staphylococcal virulence. *FEMS microbiology reviews*, *38*(4), 698–719. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12057

Cho, S. H., Godin, J. M., Chen, C. H., Qiao, W., Lee, H., & Lo, Y. H. (2010). Review Article: Recent advancements in optofluidic flow cytometer. *Biomicrofluidics*, *4*(4), 43001. https://doi.org/10.1063/1.3511706

Cisneros, J. M., & Rodríguez-Baño, J. (2002). Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, clinical features and treatment. *Clinical microbiology and infection:* The official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 8(11), 687–693. https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00487.x

Cookson, B. D., Robinson, D. A., Monk, A. B., Murchan, S., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M. J., Scheel, C., Fussing, V., Salmenlinna, S., Vuopio-Varkila, J., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P. T., Legakis, N. J., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Garaizar, J., Haeggman, S., Enright, M. C. (2007). Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: The HARMONY collection. *Journal of clinical microbiology*, *45*(6), 1830–1837. https://doi.org/10.1128/JCM.02402-06

Corral, J., Pérez-Varela, M., Sánchez-Osuna, M., Cortés, P., Barbé, J., & Aranda, J. (2021). Importance of twitching and surface-associated motility in the virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, *12*(1), 2201–2213. https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1950268

Coyne, S., Courvalin, P., & Périchon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter spp. Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*(3), 947–953. https://doi.org/10.1128/AAC.01388-10

Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W., & Götz, F. (1999). The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and immunity*, *67*(10), 5427–5433. https://doi.org/10.1128/IAI.67.10.5427-5433.1999

Cui, L., Lian, J. Q., Neoh, H. M., Reyes, E., & Hiramatsu, K. (2005). DNA microarray-based identification of genes associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*(8), 3404–3413. https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3404-3413.2005

Cunha B. A. (2001). Antibiotic side effects. *The Medical clinics of North America*, *85*(1), 149–185. https://doi.org/10.1016/s0025-7125(05)70309-6

Cycoń, M., Mrozik, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2019). Antibiotics in the soil environment-degradation and their impact on microbial activity and diversity. *Frontiers in microbiology*, *10*, 338. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00338

Dalhoff A. (2021). Selective toxicity of antibacterial agents-still a valid concept or do we miss chances and ignore risks?. *Infection*, *49*(1), 29–56. https://doi.org/10.1007/s15010-020-01536-y

Damier-Piolle, L., Magnet, S., Brémont, S., Lambert, T., & Courvalin, P. (2008). AdelJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *52*(2), 557–562. https://doi.org/10.1128/AAC.00732-07

Darby, E. M., Bavro, V. N., Dunn, S., McNally, A., & Blair, J. M. A. (2023). RND pumps across the genus *Acinetobacter*. AdelJK is the universal efflux pump. *Microbial genomics*, *9*(3), mgen000964. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000964

Darling, A. E., Mau, B., & Perna, N. T. (2010). progressiveMauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PloS one*, *5*(6), e11147. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147

Datta, R., Heaster, T. M., Sharick, J. T., Gillette, A. A., & Skala, M. C. (2020). Fluorescence lifetime imaging microscopy: Fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. *Journal of biomedical optics*, *25*(7), 1–43. https://doi.org/10.1117/1.JBO.25.7.071203

de Berardinis, V., Vallenet, D., Castelli, V., Besnard, M., Pinet, A., Cruaud, C., Samair, S., Lechaplais, C., Gyapay, G., Richez, C., Durot, M., Kreimeyer, A., Le Fèvre, F., Schächter, V., Pezo, V., Döring, V., Scarpelli, C., Médigue, C., Cohen, G. N., Marlière, P., Weissenbach, J. (2008). A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Molecular systems biology*, *4*, 174. https://doi.org/10.1038/msb.2008.10

del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., & Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, *62*(2), 434–464. https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.434-464.1998

de Vries, J., & Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter sp.* by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(4), 2094–2099. https://doi.org/10.1073/pnas.042263399

Dijkshoorn, L., Nemec, A., & Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Nature reviews. Microbiology, 5(12), 939–951. https://doi.org/10.1038/nrmicro1789

Ding, Y., Hao, J., Xiao, W., Ye, C., Xiao, X., Jian, C., Tang, M., Li, G., Liu, J., & Zeng, Z. (2023). Role of efflux pumps, their inhibitors, and regulators in colistin resistance. *Frontiers in microbiology*, *14*, 1207441. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1207441

Diot, A., Dyon-Tafani, V., Bergot, M., Tasse, J., Martins-Simões, P., Josse, J., Valour, F., & Laurent, F. (2020). Investigation of a *Staphylococcus argenteus* Strain Involved in a Chronic Prosthetic-Joint Infection. *International journal of molecular sciences*, *21*(17), 6245. https://doi.org/10.3390/ijms21176245

Dorsey, C. W., Tomaras, A. P., & Actis, L. A. (2002). Genetic and phenotypic analysis of *Acinetobacter baumannii* insertion derivatives generated with a transposome system. *Applied and environmental microbiology*, *68*(12), 6353–6360. https://doi.org/10.1128/AEM.68.12. 6353-6360.2002

Dossett, J. H., Kronvall, G., Williams, R. C., Jr, & Quie, P. G. (1969). Antiphagocytic effects of staphylococcal protein A. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *103*(6), 1405–1410. https://doi.org/10.4049/jimmunol.103.6.1405

Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., & Benade, S. (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter spp.*: An overview. *Microbes and environments*, *26*(2), 101–112. https://doi.org/10.1264/jsme2.me10179

Drew, D., North, R. A., Nagarathinam, K., & Tanabe, M. (2021). structures and general transport mechanisms by the Major Facilitator Superfamily (MFS). *Chemical reviews*, *121*(9), 5289–5335. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00983

Drlica, K., & Zhao, X. (2007). Mutant selection window hypothesis updated. *Clinical infectious diseases: An official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *44*(5), 681–688. https://doi.org/10.1086/511642

Dunachie, S. J., Day, N. P., & Dolecek, C. (2020). The challenges of estimating the human global burden of disease of antimicrobial resistant bacteria. *Current opinion in microbiology*, *57*, 95–101. https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.09.013

Edwards-Jones, V., Claydon, M. A., Evason, D. J., Walker, J., Fox, A. J., & Gordon, D. B. (2000). Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *Journal of medical microbiology*, 49(3), 295–300. https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-3-295

Ehrenreich, P. (1996). Anaerobes Wachstum neuartiger sulfatreduzierender und nitratreduzierender Bakterien auf n-Alkanen und Erdöl. Dissertation an der Universität Bremen.

Elliott, K. T., & Neidle, E. L. (2011). *Acinetobacter baylyi* ADP1: Transforming the choice of model organism. IUBMB life, 63(12), 1075–1080. https://doi.org/10.1002/iub.530

Ellison, C. K., Dalia, T. N., Klancher, C. A., Shaevitz, J. W., Gitai, Z., & Dalia, A. B. (2021). *Acinetobacter baylyi* regulates type IV pilus synthesis by employing two extension motors and a motor protein inhibitor. *Nature communications*, *12*(1), 3744. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24124-6

Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J., & Spratt, B. G. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, *38*(3), 1008–1015. https://doi.org/10.1128/JCM.38.3.1008-1015.2000

Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., & Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(11), 7687–7692. https://doi.org/10.1073/pnas.122108599

Escalante, J., Hamza, M., Nishimura, B., Melecio, M., Davies-Sala, C., Tuttobene, M. R., Subils, T., Traglia, G. M., Pham, C., Sieira, R., Actis, L., Bonomo, R. A., Tolmasky, M. E., & Ramirez, M. S. (2024). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB): Metabolic adaptation and transcriptional response to human urine (HU). *Research square*, rs.3.rs-4415275. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4415275/v1

Eshaghi, A., Bommersbach, C., Zittermann, S., Burnham, C. A., Patel, R., Schuetz, A. N., Patel, S. N., & Kus, J. V. (2021). Phenotypic and genomic profiling of *Staphylococcus argenteus* in Canada and the United States and recommendations for clinical result reporting. *Journal of clinical microbiology*, *59*(6), e02470-20. https://doi.org/10.1128/JCM.02470-20

European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA – Annual Epidemiological Report 2019. Stockholm: ECDC (2020).

Evans, B. A., & Amyes, S. G. (2014). OXA  $\beta$ -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 27(2), 241–263. https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13

Eyre, D. W., Golubchik, T., Gordon, N. C., Bowden, R., Piazza, P., Batty, E. M., Ip, C. L., Wilson, D. J., Didelot, X., O'Connor, L., Lay, R., Buck, D., Kearns, A. M., Shaw, A., Paul, J., Wilcox, M. H., Donnelly, P. J., Peto, T. E., Walker, A. S., & Crook, D. W. (2012). A pilot study of rapid benchtop sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* for outbreak detection and surveillance. *BMJ open*, *2*(3), e001124. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001124

Fayad, A., El Diwachi, O., Haraoui, L. P., Abu Sitta, G., Nguyen, V.-K., Abbara, A., Landecker, H., Karah, N., Knapp, C., McEvoy, M., Zamman, M., Higgins, P., & Matar, G. (2020). War, antimicrobial resistance, and *Acinetobacter baumannii* (WAMRA). *International Journal of Infectious Diseases*, 101(1), 87-88. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.09.255

Fernando, D. M., Xu, W., Loewen, P. C., Zhanel, G. G., & Kumar, A. (2014). Triclosan can select for an AdelJK-overexpressing mutant of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 that displays reduced susceptibility to multiple antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *58*(11), 6424–6431. https://doi.org/10.1128/AAC.03074-14

Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R. H., Phan, C., Tysklind, M., & Larsson, D. G. (2009). Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental toxicology and chemistry*, *28*(12), 2522–2527. https://doi.org/10.1897/09-073.1

Fletcher S. (2015). Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. *Environmental health and preventive medicine*, *20*(4), 243–252. https://doi.org/10.1007/s12199-015-0468-0

Fredheim, E. G. A., Flægstad, T., Askarian, F., & Klingenberg, C. (2015). Colonisation and interaction between *S. epidermidis* and *S. aureus* in the nose and throat of healthy adolescents. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: Official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *34*(1), 123–129. https://doi.org/10.1007/s10096-014-2197-5

Frickmann, H., Essig, A., Hagen, R. M., Riecker, M., Jerke, K., Ellison, D., & Poppert, S. (2011). Rapid identification of *Acinetobacter spp.* by fluorescence in situ hybridization (FISH)

from colony and blood culture material. *European journal of microbiology & immunology*, 1(4), 289–296. https://doi.org/10.1556/EuJMI.1.2011.4.4

Fridman, O., Goldberg, A., Ronin, I., Shoresh, N., & Balaban, N. Q. (2014). Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature*, *513*(7518), 418–421. https://doi.org/10.1038/nature13469

Fröhlich, C., Sørum, V., Huber, S., Samuelsen, Ø., Berglund, F., Kristiansson, E., Kotsakis, S. D., Marathe, N. P., Larsson, D. G. J., & Leiros, H. S. (2020). Structural and biochemical characterization of the environmental MBLs MYO-1, ECV-1 and SHD-1. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 75(9), 2554–2563. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa175

Ganini, D., Leinisch, F., Kumar, A., Jiang, J., Tokar, E. J., Malone, C. C., Petrovich, R. M., & Mason, R. P. (2017). Fluorescent proteins such as eGFP lead to catalytic oxidative stress in cells. *Redox biology*, *12*, 462–468. https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.002

Gekenidis, M. T., Qi, W., Hummerjohann, J., Zbinden, R., Walsh, F., & Drissner, D. (2018). Antibiotic-resistant indicator bacteria in irrigation water: High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli. PloS one*, *13*(11), e0207857. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207857

Glick B. R. (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology advances*, *13*(2), 247–261. https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)00004-a

Godeux, A. S., Lupo, A., Haenni, M., Guette-Marquet, S., Wilharm, G., Laaberki, M. H., & Charpentier, X. (2018). Fluorescence-Based detection of natural transformation in drugresistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of bacteriology*, *200*(19), e00181-18. https://doi.org/10.1128/JB.00181-18

Gohl, O., Friedrich, A., Hoppert, M., & Averhoff, B. (2006). The thin pili of *Acinetobacter sp.* strain BD413 mediate adhesion to biotic and abiotic surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1394–1401. https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1394-1401.2006

Golet, E. M., Strehler, A., Alder, A. C., & Giger, W. (2002). Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. *Analytical chemistry*, *74*(21), 5455–5462. https://doi.org/10.1021/ac025762m

Golet, E. M., Xifra, I., Siegrist, H., Alder, A. C., & Giger, W. (2003). Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environmental science & technology*, *37*(15), 3243–3249. https://doi.org/10.1021/es0264448

Gomaa, F. A. M., Helal, Z. H., & Khan, M. I. (2017). High prevalence of bla<sub>NDM-1</sub>, bla<sub>VIM</sub>, qacE, and qacEΔ1 genes and their association with decreased susceptibility to antibiotics and common hospital biocides in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms*, *5*(2), 18. https://doi.org/10.3390/microorganisms5020018

Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *57*(Pt 1), 81–91. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64483-0

Goswami, C., Fox, S., Holden, M., Leanord, A., & Evans, T. J. (2021). Genomic analysis of global *Staphylococcus argenteus* strains reveals distinct lineages with differing virulence and antibiotic resistance gene content. *Frontiers in microbiology*, *12*, 795173. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.795173

Gravet, A., Colin, D. A., Keller, D., Girardot, R., Monteil, H., & Prévost, G. (1998). Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS letters*, *436*(2), 202–208. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01130-2

Grohs, P., Tillecovidin, B., Caumont-Prim, A., Carbonnelle, E., Day, N., Podglajen, I., & Gutmann, L. (2013). Comparison of five media for detection of extended-spectrum Beta-lactamase by use of the wasp instrument for automated specimen processing. *Journal of clinical microbiology*, *51*(8), 2713–2716. https://doi.org/10.1128/JCM.00077-13

Grossmann, A., Froböse, N. J., Mellmann, A., Alabi, A. S., Schaumburg, F., & Niemann, S. (2021). An in vitro study on *Staphylococcus schweitzeri* virulence. *Scientific reports*, *11*(1), 1157. https://doi.org/10.1038/s41598-021-80961-x

Gullberg, E., Albrecht, L. M., Karlsson, C., Sandegren, L., & Andersson, D. I. (2014). Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. *mBio*, *5*(5), e01918-14. https://doi.org/10.1128/mBio.01918-14

Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens*, 7(7), e1002158. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158

Haaber, J., Penadés, J. R., & Ingmer, H. (2017). Transfer of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Trends in microbiology, 25(11), 893–905. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.011

Hachani, A., Giulieri, S. G., Guérillot, R., Walsh, C. J., Herisse, M., Soe, Y. M., Baines, S. L., Thomas, D. R., Cheung, S. D., Hayes, A. S., Cho, E., Newton, H. J., Pidot, S., Massey, R. C., Howden, B. P., & Stinear, T. P. (2023). A high-throughput cytotoxicity screening platform reveals *agr*-independent mutations in bacteraemia-associated *Staphylococcus aureus* that promote intracellular persistence. *eLife*, *12*, e84778. https://doi.org/10.7554/eLife.84778

Han, S., Caspers, N., Zaniewski, R. P., Lacey, B. M., Tomaras, A. P., Feng, X., Geoghegan, K. F., & Shanmugasundaram, V. (2011). Distinctive attributes of β-lactam target proteins in *Acinetobacter baumannii* relevant to development of new antibiotics. *Journal of the American Chemical Society*, 133(50), 20536–20545. https://doi.org/10.1021/ja208835z

Han, S., Li, X., Huang, H., Wang, T., Wang, Z., Fu, X., Zhou, Z., Du, P., & Li, X. (2021). Simultaneous determination of seven antibiotics and five of their metabolites in municipal wastewater and evaluation of their stability under laboratory conditions. *International journal of environmental research and public health*, *18*(20), 10640. https://doi.org/10.3390/ijerph182010640

Hangas, A., Aasumets, K., Kekäläinen, N. J., Paloheinä, M., Pohjoismäki, J. L., Gerhold, J. M., & Goffart, S. (2018). Ciprofloxacin impairs mitochondrial DNA replication initiation through inhibition of Topoisomerase 2. *Nucleic acids research*, *46*(18), 9625–9636. https://doi.org/10.1093/nar/gky793

Haugland, R. P, Spence, M. T. Z, Johnson, I. D, & Basey, A. (2005). The Handbook: A Guide to fluorescent Probes and labeling Technologies. 10th ed. Eugene (Or.): Molecular Probes. https://doi.org/10.1134/S0006297911110101

Hawkey, J., Ascher, D. B., Judd, L. M., Wick, R. R., Kostoulias, X., Cleland, H., Spelman, D. W., Padiglione, A., Peleg, A. Y., & Holt, K. E. (2018). Evolution of carbapenem resistance in

Acinetobacter baumannii during a prolonged infection. *Microbial genomics*, *4*(3), e000165. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000165

Heaton, C. J., Gerbig, G. R., Sensius, L. D., Patel, V., & Smith, T. C. (2020). *Staphylococcus aureus* epidemiology in wildlife: A systematic review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *9*(2), 89. https://doi.org/10.3390/antibiotics9020089

Hembach, N., Alexander, J., Hiller, C., Wieland, A., & Schwartz, T. (2019). Dissemination prevention of antibiotic resistant and facultative pathogenic bacteria by ultrafiltration and ozone treatment at an urban wastewater treatment plant. *Scientific reports*, *9*(1), 12843. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49263-1

Hembach, N., Schmid, F., Alexander, J., Hiller, C., Rogall, E. T., & Schwartz, T. (2017). Occurrence of the *mcr-1* colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plants in Germany. *Frontiers in microbiology*, *8*, 1282. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01282

Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L., & Dragacci, S. (2012). *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS microbiology reviews*, *36*(4), 815–836. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x

Heuer, H., & Smalla, K. (2007). Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental microbiology*, *9*(3), 657–666. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01185.x

Heuer, H., Kopmann, C., Binh, C. T., Top, E. M., & Smalla, K. (2009). Spreading antibiotic resistance through spread manure: Characteristics of a novel plasmid type with low %G+C content. *Environmental microbiology*, *11*(4), 937–949. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01819.x

Hoch J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current opinion in microbiology*, *3*(2), 165–170. https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00070-9

Holstein, N. (2021). Mutationen und Eigenschaften von Antibiotika-resistenten *Acinetobacter baylyi* Klonen. Projektarbeit im Rahmen des Bachelorstudiums Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.

Holt, D. C., Holden, M. T., Tong, S. Y., Castillo-Ramirez, S., Clarke, L., Quail, M. A., Currie, B. J., Parkhill, J., Bentley, S. D., Feil, E. J., & Giffard, P. M. (2011). A very early-branching *Staphylococcus aureus* lineage lacking the carotenoid pigment staphyloxanthin. *Genome biology and evolution*, *3*, 881–895. https://doi.org/10.1093/gbe/evr078

Hynninen, A., Touzé, T., Pitkänen, L., Mengin-Lecreulx, D., & Virta, M. (2009). An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. *Molecular microbiology*, 74(2), 384–394. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06868.x

Hülter, N., Wackernagel, W. (2008). Double illegitimate recombination events integrate DNA segments through two different mechanisms during natural transformation of *Acinetobacter baylyi*. Molecular microbiology, 67(5), 984–995. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06096.x

Ibrahem, S., Salmenlinna, S., Virolainen, A., Kerttula, A. M., Lyytikäinen, O., Jägerroos, H., Broas, M., & Vuopio-Varkila, J. (2009). Carriage of methicillin-resistant Staphylococci and their SCC*mec* types in a long-term-care facility. *Journal of clinical microbiology*, *47*(1), 32–37. https://doi.org/10.1128/JCM.01085-08

Ibrahim, A., Gerner-Smidt, P., & Liesack, W. (1997). Phylogenetic relationship of the twenty-one DNA groups of the genus *Acinetobacter* as revealed by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *International journal of systematic bacteriology*, *47*(3), 837–841. https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-837

Jadimurthy, R., Mayegowda, S. B., Nayak, S. C., Mohan, C. D., & Rangappa, K. S. (2022). Escaping mechanisms of ESKAPE pathogens from antibiotics and their targeting by natural compounds. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, *34*, e00728. https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00728

Jäger, T., Alexander, J., Kirchen, S., Dötsch, A., Wieland, A., Hiller, C., & Schwartz, T. (2018). Live-dead discrimination analysis, qPCR assessment for opportunistic pathogens, and population analysis at ozone wastewater treatment plants. *Environmental pollution* (*Barking, Essex: 1987*), 232, 571–579. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.089

Jäger, T., Hembach, N., Elpers, C., Wieland, A., Alexander, J., Hiller, C., Krauter, G., & Schwartz, T. (2018). Reduction of antibiotic resistant bacteria during conventional and advanced wastewater treatment, and the disseminated loads released to the environment. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2599. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02599

Jechalke, S., Heuer, H., Siemens, J., Amelung, W., & Smalla, K. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in microbiology*, *22*(9), 536–545. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005

Jechalke, S., Kopmann, C., Richter, M., Moenickes, S., Heuer, H., & Smalla, K. (2013). Plasmid-mediated fitness advantage of *Acinetobacter baylyi* in sulfadiazine-polluted soil. *FEMS microbiology letters*, *348*(2), 127–132. https://doi.org/10.1111/1574-6968.12284

Jensen, M. A., Fukushima, M., & Davis, R. W. (2010). DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PloS one*, *5*(6), e11024. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011024

Jiang, B., You, B., Tan, L., Yu, S., Li, H., Bai, G., Li, S., Rao, X., Xie, Z., Shi, X., Peng, Y., & Hu, X. (2018). Clinical *Staphylococcus argenteus* Develops to Small Colony Variants to Promote Persistent Infection. *Frontiers in microbiology*, *9*, 1347. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01347

Jiang, Z., Wei, J., Liang, Y., Peng, N., & Li, Y. (2020). Aminoglycoside antibiotics inhibit mycobacteriophage infection. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *9*(10), 714. https://doi.org/10.3390/antibiotics9100714

Johansson, C., Rautelin, H., & Kaden, R. (2019). *Staphylococcus argenteus* and *Staphylococcus schweitzeri* are cytotoxic to human cells *in vitro* due to high expression of alpha-hemolysin Hla. *Virulence*, *10*(1), 502–510. https://doi.org/10.1080/21505594.2019. 1620062

Johnson, T. L., Waack, U., Smith, S., Mobley, H., & Sandkvist, M. (2015). *Acinetobacter baumannii* is dependent on the type II secretion system and its substrate LipA for lipid utilization and *in vivo* fitness. *Journal of bacteriology*, 198(4), 711–719. https://doi.org/10.1128/JB.00622-15

Josten, M., Reif, M., Szekat, C., Al-Sabti, N., Roemer, T., Sparbier, K., Kostrzewa, M., Rohde, H., Sahl, H. G., & Bierbaum, G. (2013). Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. *Journal of clinical microbiology*, *51*(6), 1809–1817. https://doi.org/10.1128/JCM.00518-13

Josten, M., Dischinger, J., Szekat, C., Reif, M., Al-Sabti, N., Sahl, H. G., Parcina, M., Bekeredjian-Ding, I., & Bierbaum, G. (2014). Identification of agr-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 304(8), 1018–1023. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.005

Juni, E., & Janik, A. (1969). Transformation of *Acinetobacter calco-aceticus* (*Bacterium anitratum*). *Journal of bacteriology*, *98*(1), 281–288. https://doi.org/10.1128/jb.98.1.281-288.1969

Kaden, R., Engstrand, L., Rautelin, H., & Johansson, C. (2018). Which methods are appropriate for the detection of *Staphylococcus argenteus* and is it worthwhile to distinguish *S. argenteus* from *S. aureus*?. *Infection and drug resistance*, *11*, 2335–2344. https://doi.org/10.2147/IDR.S179390

Kahn L. H. (2006). Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. *Emerging infectious diseases*, *12*(4), 556–561. https://doi.org/10.3201/eid1204.050956

Kampf G. (2018). Adaptive microbial response to low-level benzalkonium chloride exposure. *The Journal of hospital infection*, *100*(3), e1–e22. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.05.019

Karageorgopoulos, D. E., & Falagas, M. E. (2008). Current control and treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *The Lancet. Infectious diseases*, 8(12), 751–762. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70279-2

Karah, N., Jolley, K. A., Hall, R. M., & Uhlin, B. E. (2017). Database for the *ampC* alleles in *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*, *12*(5), e0176695. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176695

Karakonstantis, S., Kritsotakis, E. I., & Gikas, A. (2020). Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: A systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *75*(2), 271–282. https://doi.org/10.1093/jac/dkz401

Kehl, K., Schallenberg, A., Szekat, C., Albert, C., Sib, E., Exner, M., Zacharias, N., Schreiber, C., Parčina, M., & Bierbaum, G. (2022). Dissemination of carbapenem resistant bacteria from hospital wastewater into the environment. *The Science of the total environment*, *806*(Pt 4), 151339. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151339

Kendall, J. M., & Badminton, M. N. (1998). *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. *Trends in biotechnology*, *16*(5), 216–224. https://doi.org/10.1016/s0167-7799(98)01184-6

Khan, S., Beattie, T. K., & Knapp, C. W. (2017). The use of minimum selectable concentrations (MSCs) for determining the selection of antimicrobial resistant bacteria. *Ecotoxicology (London, England)*, *26*(2), 283–292. https://doi.org/10.1007/s10646-017-1762-y

Kim, M., Weigand, M. R., Oh, S., Hatt, J. K., Krishnan, R., Tezel, U., Pavlostathis, S. G., & Konstantinidis, K. T. (2018). Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance. *Applied and environmental microbiology*, *84*(17), e01201-18. https://doi.org/10.1128/AEM.01201-18

Kleinert, F. (2015). Die Rolle von Insertionselementen in der Evolution der Antibiotikaresistenz von *Staphylococcus aureus*. Dissertation an der Rheinischen Friedrich-Willhelms-Universität Bonn.

Kleinert, F., Kallies, R., Hort, M., Zweynert, A., Szekat, C., Nagel, M., & Bierbaum, G. (2017). Influence of IS256 on genome variability and formation of small-colony variants in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *61*(8), e00144-17. https://doi.org/10.1128/AAC.00144-17

Klenotic, P. A., Moseng, M. A., Morgan, C. E., & Yu, E. W. (2021). Structural and functional diversity of resistance-nodulation-cell division transporters. *Chemical reviews*, *121*(9), 5378–5416. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00621

Kluytmans, J., van Belkum, A., & Verbrugh, H. (1997). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical microbiology reviews*, *10*(3), 505–520. https://doi.org/10.1128/CMR.10.3.505

Knauf, G. A., Cunningham, A. L., Kazi, M. I., Riddington, I. M., Crofts, A. A., Cattoir, V., Trent, M. S., & Davies, B. W. (2018). Exploring the antimicrobial action of quaternary amines against *Acinetobacter baumannii*. *mBio*, *9*(1), e02394-17.

Kneuper, H., Cao, Z. P., Twomey, K. B., Zoltner, M., Jäger, F., Cargill, J. S., Chalmers, J., van der Kooi-Pol, M. M., van Dijl, J. M., Ryan, R. P., Hunter, W. N., & Palmer, T. (2014). Heterogeneity in ess transcriptional organization and variable contribution of the Ess/Type VII protein secretion system to virulence across closely related *Staphylocccus aureus* strains. *Molecular microbiology*, *93*(5), 928–943. https://doi.org/10.1128/mBio.02394-17

Kok, R. G., van Thor, J. J., Nugteren-Roodzant, I. M., Brouwer, M. B., Egmond, M. R., Nudel, C. B., Vosman, B., & Hellingwerf, K. J. (1995). Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Molecular microbiology*, 15(5), 803–818. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02351.x

Koreen, L., Ramaswamy, S. V., Graviss, E. A., Naidich, S., Musser, J. M., & Kreiswirth, B. N. (2004). *Spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: Implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *Journal of clinical microbiology*, *42*(2), 792–799. https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.792-799.2004

Kraupner, N., Ebmeyer, S., Bengtsson-Palme, J., Fick, J., Kristiansson, E., Flach, C. F., & Larsson, D. G. J. (2018). Selective concentration for ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* grown in complex aquatic bacterial biofilms. *Environment international*, *116*, 255–268. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.029

Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., & Tragiannidis, A. (2021). *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *10*(3), 373. https://doi.org/10.3390/pathogens10030373

Larsson, D. G. J., Andremont, A., Bengtsson-Palme, J., Brandt, K. K., de Roda Husman, A. M., Fagerstedt, P., Fick, J., Flach, C. F., Gaze, W. H., Kuroda, M., Kvint, K., Laxminarayan, R., Manaia, C. M., Nielsen, K. M., Plant, L., Ploy, M. C., Segovia, C., Simonet, P., Smalla, K.,

Snape, J., Wernersson, A. S. (2018). Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environment international*, *117*, 132–138. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.04.041

Lavis, L. D., & Raines, R. T. (2008). Bright ideas for chemical biology. *ACS chemical biology*, 3(3), 142–155. https://doi.org/10.1021/cb700248m

Leong, C. G., Bloomfield, R. A., Boyd, C. A., Dornbusch, A. J., Lieber, L., Liu, F., Owen, A., Slay, E., Lang, K. M., & Lostroh, C. P. (2017). The role of core and accessory type IV pilus genes in natural transformation and twitching motility in the bacterium *Acinetobacter baylyi*. *PloS one*, *12*(8), e0182139. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182139

Leopold, S. R., Goering, R. V., Witten, A., Harmsen, D., & Mellmann, A. (2014). Bacterial whole-genome sequencing revisited: portable, scalable, and standardized analysis for typing and detection of virulence and antibiotic resistance genes. *Journal of clinical microbiology*, 52(7), 2365–2370. https://doi.org/10.1128/JCM.00262-14

Leuchtle, B. (2015). Mikrobiologische Kontamination von Heizöl - Ursachen und Auswirkungen auf Brennstoff und Tank. Dissertation an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen.

Levin-Reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shoresh, N., & Balaban, N. Q. (2017). Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 355(6327), 826–830. https://doi.org/10.1126/science.aaj2191

Li, H., Tang, T., Stegger, M., Dalsgaard, A., Liu, T., & Leisner, J. J. (2021). Characterization of antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus* from retail foods in Beijing, China. *Food microbiology*, *93*, 103603. https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103603

Li, S., Skov, R. L., Han, X., Larsen, A. R., Larsen, J., Sørum, M., Wulf, M., Voss, A., Hiramatsu, K., & Ito, T. (2011). Novel types of staphylococcal cassette chromosome *mec* elements identified in clonal complex 398 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*(6), 3046–3050. https://doi.org/10.1128/AAC. 01475-10

Li, S. Z., Li, X. Y., Wang, D. Z. (2004). Membrane (RO-UF) filtration for antibiotic wastewater treatment and recovery of antibiotics. *Separation and Purification Technology*, 34 (1-3), 109-114. https://doi.org/10.1016/S1383-5866(03)00184-9

Li, Y., Sierra, A. M., Ai, H. W., & Campbell, R. E. (2008). Identification of sites within a monomeric red fluorescent protein that tolerate peptide insertion and testing of corresponding circular permutations. *Photochemistry and photobiology*, *84*(1), 111–119. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00206.x

Lilly, J., & Camps, M. (2015). Mechanisms of theta plasmid replication. *Microbiology spectrum*, *3*(1). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0029-2014

Lin, Y. C., Sheng, W. H., Chang, S. C., Wang, J. T., Chen, Y. C., Wu, R. J., Hsia, K. C., & Li, S. Y. (2008). Application of a microsphere-based array for rapid identification of *Acinetobacter spp.* with distinct antimicrobial susceptibilities. *Journal of clinical microbiology*, 46(2), 612–617. https://doi.org/10.1128/JCM.01798-07

Lin, L., Ringel, P. D., Vettiger, A., Dürr, L., & Basler, M. (2019). DNA uptake upon T6SS-dependent prey cell lysis induces sos response and reduces fitness of *Acinetobacter baylyi*. *Cell reports*, *29*(6), 1633–1644.e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.083

Lindberg, R. H., Östman, M., Olofsson, U., Grabic, R., & Fick, J. (2014). Occurrence and behaviour of 105 active pharmaceutical ingredients in sewage waters of a municipal sewer collection system. *Water research*, *58*, 221–229. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.076

Liou, M. L., Soo, P. C., Ling, S. R., Kuo, H. Y., Tang, C. Y., & Chang, K. C. (2014). The sensor kinase BfmS mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of microbiology, immunology, and infection* = *Wei mian yu gan ran za zhi*, *47*(4), 275–281. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.12.004

Liu, A., Fong, A., Becket, E., Yuan, J., Tamae, C., Medrano, L., Maiz, M., Wahba, C., Lee, C., Lee, K., Tran, K. P., Yang, H., Hoffman, R. M., Salih, A., & Miller, J. H. (2011). Selective advantage of resistant strains at trace levels of antibiotics: A simple and ultrasensitive color test for detection of antibiotics and genotoxic agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*(3), 1204–1210. https://doi.org/10.1128/AAC.01182-10

Livermore, D. M., & Tulkens, P. M. (2009). Temocillin revived. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *63*(2), 243–245. https://doi.org/10.1093/jac/dkn511

Loncaric, I., & Künzel, F. (2013). Sequence type 398 meticillin-resistant *Staphylococcus* aureus infection in a pet rabbit. *Veterinary dermatology*, *24*(3), 370–e84. https://doi.org/10.1111/vde.12023

Lundström, S. V., Östman, M., Bengtsson-Palme, J., Rutgersson, C., Thoudal, M., Sircar, T., Blanck, H., Eriksson, K. M., Tysklind, M., Flach, C. F., & Larsson, D. G. J. (2016). Minimal selective concentrations of tetracycline in complex aquatic bacterial biofilms. *The Science of the total environment*, *553*, 587–595. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.103

Ma, J., Lin, H., Sun, W., Wang, Q., Yu, Q., Zhao, Y., & Fu, J. (2014). Soil microbial systems respond differentially to tetracycline, sulfamonomethoxine, and ciprofloxacin entering soil under pot experimental conditions alone and in combination. *Environmental science and pollution research international*, *21*(12), 7436–7448. https://doi.org/10.1007/s11356-014-2685-2

Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., & Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(6), 3140–3145. https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140

Maiden, M. C., Jansen van Rensburg, M. J., Bray, J. E., Earle, S. G., Ford, S. A., Jolley, K. A., & McCarthy, N. D. (2013). MLST revisited: The gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature reviews. Microbiology*, *11*(10), 728–736. https://doi.org/10.1038/nrmicro3093

Mallardo, K., Nizza, S., Fiorito, F., Pagnini, U., & De Martino, L. (2013). A comparative evaluation of methicillin-resistant staphylococci isolated from harness racing-horses, breeding mares and riding-horses in Italy. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, *3*(3), 169–173. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60044-1

Manoharan, A., Chatterjee, S., Mathai, D., & SARI Study Group (2010). Detection and characterization of metallo beta lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian journal of medical microbiology*, *28*(3), 241–244. https://doi.org/10.4103/0255-0857.66486

Mantilla-Calderon, D., Plewa, M. J., Michoud, G., Fodelianakis, S., Daffonchio, D., & Hong, P. Y. (2019). Water disinfection byproducts increase natural transformation rates of environmental DNA in *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Environmental science & technology*, 53(11), 6520–6528. https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00692

McLeod, S. M., Shapiro, A. B., Moussa, S. H., Johnstone, M., McLaughlin, R. E., de Jonge, B. L. M., & Miller, A. A. (2018). Frequency and mechanism of spontaneous resistance to sulbactam combined with the novel β-Lactamase inhibitor ETX2514 in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *62*(2), e01576-17. https://doi.org/10.1128/AAC.01576-17

McKinnon K. M. (2018). Flow cytometry: An overview. *Current protocols in immunology*, *120*, 5.1.1–5.1.11. https://doi.org/10.1002/cpim.40

Mehlin, C., Headley, C. M., & Klebanoff, S. J. (1999). An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: Isolation and characterization. *The Journal of experimental medicine*, *189*(6), 907–918. https://doi.org/10.1084/jem.189.6.907

Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C. A., Zentz, E. B., Leopold, S. R., Rico, A., Prior, K., Szczepanowski, R., Ji, Y., Zhang, W., McLaughlin, S. F., Henkhaus, J. K., Leopold, B., Bielaszewska, M., Prager, R., Brzoska, P. M., Moore, R. L., Guenther, S., Rothberg, J. M., & Karch, H. (2011). Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PloS one*, *6*(7), e22751. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022751

Merod, R. T., & Wuertz, S. (2014). Extracellular polymeric substance architecture influences natural genetic transformation of *Acinetobacter baylyi* in biofilms. *Applied and environmental microbiology*, *80*(24), 7752–7757. https://doi.org/10.1128/AEM.01984-14

Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C. S., Manaia, C. M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., & Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: a review. *Water research*, *47*(3), 957–995. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.027

Mohsen, S., Dickinson, J. A., & Somayaji, R. (2020). Update on the adverse effects of antimicrobial therapies in community practice. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, *66*(9), 651–659.

Moussa, S. H., Shapiro, A. B., McLeod, S. M., Iyer, R., Carter, N. M., Tsai, Y.-K., Siu, L. K., & Miller, A. A. (2023). Molecular drivers of resistance to sulbactam-durlobactam in contemporary clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 67(11), e0066523. https://doi.org/10.1128/aac.00665-23

Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. *Frontiers in microbiology*, *10*, 539. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539

Mullins J. M. (1994). Overview of fluorophores. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 34, 107–116. https://doi.org/10.1385/0-89603285-x:107

Murray, A. K., Zhang, L., Yin, X., Zhang, T., Buckling, A., Snape, J., & Gaze, W. H. (2018). Novel insights into selection for antibiotic resistance in complex microbial communities. *mBio*, *9*(4), e00969-18. https://doi.org/10.1128/mBio.00969-18

Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Shara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhaus, G., Hamadani, B. H. K., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., Agarwal, R., Akech, S., Albertson, A., Amuasi, J., Andrews, J., Aravkin, A., Ashley, E., Bailey, F., Baker, S., Basnyat, B., Bekker, A., Bender, R., Bethou, A., Bielicki, J., Boonkasidecha, S., Bukosia, J., Carvalheiro, C., Castañeda-Orjuela, C., Chansamouth, V., Chaurasia, S., Chiurchiù, S., Chowdhury, F., Cook, A. J., Cooper, B., Cressey, T. R., Criollo-Mora, E., Cunningham, M., Darboe, S., Day, N. P. J., De Luca, M., Dokova, K., Dramowski, A., Dunachie, S. J., Eckmanns, T., Eibach, D., Emami, A., Feasey, N., Fisher-Pearson, N., Forrest, K., Garrett, D., Gastmeier, P., Giref, A. Z., Greer, R. C., Gupta, V., Haller, S., Haselbeck, A., Hay, S. I., Holm, M., Hopkins, S., Iregbu, K. C., Jacobs, J., Jarovsky, D., Javanmardi, F., Khorana, M., Kissoon, N., Kobeissi, E., Kostyanev, T., Krapp, F., Krumkamp, R., Kumar, A., Kyu, H. H., Lim, C., Limmathurotsakul, D., Loftus, M. J., Lunn, M., Ma, J., Mturi, N., Munera-Huertas, T., Musicha, P., Mussi-Pinhata, M. M., Nakamura, T., Nanavati, R., Nangia, S., Newton, P., Ngoun, C., Novotney, A., Nwakanma, D., Obiero, C. W., Olivas-Martinez, A., Olliaro, P., Ooko, E., Ortiz-Brizuela, E., Peleg, A. Y., Perrone, C., Plakkal, N.,

Ponce-de-Leon, A., Raad, M., Ramdin, T., Riddell, A., Roberts, T., Robotham, J. L., Roca, A., Rudd, K. E., Russell, N., Schnall, J., Scott, J. A. G., Shivamallappa, M., Sifuentes-Osornio, J., Steenkeste, N., Stewardson, A. J., Stoeva, T., Tasak, N., Thaiprakong, A., Thwaites, G., Turner, C., Turner, P., van Doorn, H. R., Velaphi, S., Vongpradith, A., Vu, H., Walsh, T., Waner, S., Wangrangsimakul, T., Wozniak, T., Zheng, P., Sartorius, B., Lopez, A, D., Stergachis, A., Moore, C., Dolecek, C., & Naghavi, M., (Antimicrobial Resistance Collaborators) (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet (London, England)*, 399(10325), 629–655. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0

Müller, H., Sib, E., Gajdiss, M., Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Albert, C., Schallenberg, A., Timm, C., Zacharias, N., Schmithausen, R. M., Engelhart, S., Exner, M., Parcina, M., Schreiber, C., & Bierbaum, G. (2018). Dissemination of multi-resistant Gramnegative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS microbiology ecology*, *94*(5), 10.1093/femsec/fiy057. https://doi.org/10.1093/femsec/fiy057

Nabal Díaz, S. G., Algara Robles, O., & García-Lechuz Moya, J. M. (2022). New definitions of susceptibility categories EUCAST 2019: clinic application. *Revista espanola de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia*, 35 Suppl 3(Suppl 3), 84–88. https://doi.org/10.37201/req/s03.18.2022

Nelson, K., Rubio-Aparicio, D., Tsivkovski, R., Sun, D., Totrov, M., Dudley, M., & Lomovskaya, O. (2020). *In Vitro* activity of the ultra-broad-spectrum beta-lactamase inhibitor QPX7728 in combination with meropenem against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii. Antimicrobial agents and chemotherapy*, *64*(11), e01406-20. https://doi.org/10.1128/AAC.01406-20

Nocera, F. P., Attili, A. R., & De Martino, L. (2021). *Acinetobacter baumannii*: Its clinical significance in human and veterinary medicine. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *10*(2), 127. https://doi.org/10.3390/pathogens10020127

Novo, A., André, S., Viana, P., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2013). Antibiotic resistance, antimicrobial residues and bacterial community composition in urban wastewater. *Water research*, *47*(5), 1875–1887. https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.010

Obara, M., & Nakae, T. (1991). Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in Acinetobacter calcoaceticus. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *28*(6), 791–800.

Ozbek Celik, B., Mataraci-Kara, E., & Yilmaz, M. (2014). Effects of various antibiotics alone or in combination with doripenem against *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in an intensive care unit. *BioMed research international*, 2014, 397421. https://doi.org/10.1155/2014/397421

Palethorpe, S., Farrow, J. M., 3rd, Wells, G., Milton, M. E., Actis, L. A., Cavanagh, J., & Pesci, E. C. (2022). *Acinetobacter baumannii* regulates its stress responses via the BfmRS two-component regulatory system. *Journal of bacteriology*, *204*(2), e0049421. https://doi.org/10.1128/JB.00494-21

Palmen, R., Vosman, B., Buijsman, P., Breek, C. K., & Hellingwerf, K. J. (1993). Physiological characterization of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of general microbiology*, *139*(2), 295–305. https://doi.org/10.1099/00221287-139-2-295

Palmen, R., & Hellingwerf, K. J. (1997). Uptake and processing of DNA by *Acinetobacter calcoaceticus* - a review. *Gene*, *192*(1), 179–190. https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97) 00042-5

Pancu, D. F., Scurtu, A., Macasoi, I. G., Marti, D., Mioc, M., Soica, C., Coricovac, D., Horhat, D., Poenaru, M., & Dehelean, C. (2021). Antibiotics: conventional therapy and natural compounds with antibacterial activity - a pharmaco-toxicological screening. *Antibiotics* (*Basel, Switzerland*), 10(4), 401. https://doi.org/10.3390/antibiotics10040401

Patangia, D. V., Anthony Ryan, C., Dempsey, E., Paul Ross, R., & Stanton, C. (2022). Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *MicrobiologyOpen*, *11*(1), e1260. https://doi.org/10.1002/mbo3.1260

Patel, G. K., & Finlay, A. Y. (2003). Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management. *American journal of clinical dermatology*, *4*(3), 165–175. https://doi.org/10.2165/00128071-200304030-00003

Patel, R. N., Mazumdar, S., & Ornston, L. N. (1975). Beta-ketoadipate enol-lactone hydrolases I and II from *Acinetobacter calcoaceticus*. *The Journal of biological chemistry*, 250(16). https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41104-6

Paterson D. L. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *The American journal of medicine*, *119*(6 Suppl 1), S20–S70. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.013

Periasamy, S., Chatterjee, S. S., Cheung, G. Y., & Otto, M. (2012). Phenol-soluble modulins in staphylococci: What are they originally for?. *Communicative & integrative biology*, *5*(3), 275–277. https://doi.org/10.4161/cib.19420

Pillai S. K., Moellering R. C., Jr., Eliopoulos G. M. Antimicrobial combinations. In: Lorian V., editor. Antibiotics in Laboratory Medicine. Philadelphia, Pa, USA: Lippincott Williams and Wilkins; 2005. pp. 365–440.

Pitt, S. J., & Gunn, A. (2024). The One Health concept. *British journal of biomedical science*, 81, 12366. https://doi.org/10.3389/bjbs.2024.12366

Polianciuc, S. I., Gurzău, A. E., Kiss, B., Ştefan, M. G., & Loghin, F. (2020). Antibiotics in the environment: causes and consequences. *Medicine and pharmacy reports*, *93*(3), 231–240. https://doi.org/10.15386/mpr-1742

Porrero, M. C., Mentaberre, G., Sánchez, S., Fernández-Llario, P., Casas-Díaz, E., Mateos, A., Vidal, D., Lavín, S., Fernández-Garayzábal, J. F., & Domínguez, L. (2014). Carriage of *Staphylococcus aureus* by free-living wild animals in Spain. *Applied and environmental microbiology*, *80*(16), 4865–4870. https://doi.org/10.1128/AEM.00647-14

Prathapan P. (2022). A determination of pan-pathogen antimicrobials?. *Medicine in drug discovery*, *14*, 100120. https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100120

Price, J., Gordon, N. C., Crook, D., Llewelyn, M., & Paul, J. (2013). The usefulness of whole genome sequencing in the management of *Staphylococcus aureus* infections. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(9), 784–789. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12109

Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, *20*(3), 440–458. https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07

Rahman, M. R. T., Fliss, I., & Biron, E. (2022). Insights in the development and uses of alternatives to antibiotic growth promoters in poultry and swine production. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *11*(6), 766. https://doi.org/10.3390/antibiotics11060766

Ramesh Sawant, A., Pagal, S., & Prashanth, K. (2024). Role of the NtrC family response regulator in nitrogen metabolism of Acinetobacter baumannii. *Gene*, *924*, 148552. https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148552

Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, *13*(6), 151–171. https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003

Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2017). Amikacin: uses, resistance, and prospects for inhibition. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(12), 2267. https://doi.org/10.3390/molecules22122267

Ramos, J. L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R., & Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, *69*(2), 326–356. https://doi.org/10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005

Randall, L. P., Kirchner, M., Teale, C. J., Coldham, N. G., Liebana, E., & Clifton-Hadley, F. (2009). Evaluation of CHROMagar CTX, a novel medium for isolating CTX-M-ESBL-positive *Enterobacteriaceae* while inhibiting AmpC-producing strains. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63(2), 302–308. https://doi.org/10.1093/jac/dkn485

Ransom, E. M., Ellermeier, C. D., & Weiss, D. S. (2015). Use of mCherry Red fluorescent protein for studies of protein localization and gene expression in *Clostridium difficile*. *Applied and environmental microbiology*, *81*(5), 1652–1660. https://doi.org/10.1128/AEM.03446-14

Reid, C. J., Blau, K., Jechalke, S., Smalla, K., & Djordjevic, S. P. (2020). Whole genome sequencing of *Escherichia coli* from store-bought produce. *Frontiers in microbiology*, *10*, 3050. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03050

Ribeiro, A. R., Sures, B., & Schmidt, T. C. (2018). Cephalosporin antibiotics in the aquatic environment: a critical review of occurrence, fate, ecotoxicity and removal technologies.

Environmental pollution (Barking, Essex : 1987), 241, 1153–1166. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.040

Rico, L. G., Juncà, J., Ward, M. D., Bradford, J. A., Bardina, J., & Petriz, J. (2018). Acoustophoretic orientation of red blood cells for diagnosis of red cell health and pathology. *Scientific reports*, *8*(1), 15705. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33411-0

Ringel, P. D., Hu, D., & Basler, M. (2017). the role of type VI secretion system effectors in target cell lysis and subsequent horizontal gene transfer. *Cell reports*, *21*(13), 3927–3940. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.020

Riva, V., Patania, G., Riva, F., Vergani, L., Crotti, E., & Mapelli, F. (2022). *Acinetobacter baylyi* Strain BD413 can acquire an antibiotic resistance gene by natural transformation on lettuce phylloplane and enter the endosphere. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, *11*(9), 1231. https://doi.org/10.3390/antibiotics11091231

Rodloff, A., Bauer, T., Ewig, S., Kujath, P., & Müller, E. (2008). Susceptible, intermediate, and resistant - the intensity of antibiotic action. *Deutsches Arzteblatt international*, *105*(39), 657–662. https://doi.org/10.3238/arztebl.2008.0657

Rodríguez-Lázaro, D., Oniciuc, E. A., García, P. G., Gallego, D., Fernández-Natal, I., Dominguez-Gil, M., Eiros-Bouza, J. M., Wagner, M., Nicolau, A. I., & Hernández, M. (2017). Detection and Characterization of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in Foods Confiscated in EU Borders. *Frontiers in microbiology*, *8*, 1344. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01344

Rodriguez-Mozaz, S., Vaz-Moreira, I., Varela Della Giustina, S., Llorca, M., Barceló, D., Schubert, S., Berendonk, T. U., Michael-Kordatou, I., Fatta-Kassinos, D., Martinez, J. L., Elpers, C., Henriques, I., Jaeger, T., Schwartz, T., Paulshus, E., O'Sullivan, K., Pärnänen, K. M. M., Virta, M., Do, T. T., Walsh, F., Manaia, C. M. (2020). Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environment international*, *140*, 105733. https://doi.org/ 10.1016/j.envint.2020.105733

Rosenfeld, N., Bouchier, C., Courvalin, P., & Périchon, B. (2012). Expression of the resistance-nodulation-cell division pump AdelJK in *Acinetobacter baumannii* is regulated by

AdeN, a TetR-type regulator. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *56*(5), 2504–2510. https://doi.org/10.1128/AAC.06422-11

Saier, M. H., Jr, Reddy, V. S., Tamang, D. G., & Västermark, A. (2014). The transporter classification database. *Nucleic acids research*, *42*(Database issue), D251–D258. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1097

Salama, N. A., Abou-Raya, S. H., Shalaby, A. R., Emam, W. H., & Mehaya, F. M. (2011). Incidence of tetracycline residues in chicken meat and liver retailed to consumers. *Food additives & contaminants. Part B, Surveillance*, *4*(2), 88–93. https://doi.org/10.1080/19393210.2011.585245

Samir, R., Hussein, S. H., Elhosseiny, N. M., Khattab, M. S., Shawky, A. E., & Attia, A. S. (2016). Adaptation to potassium-limitation is essential for *Acinetobacter baumannii* pneumonia pathogenesis. *The Journal of infectious diseases*, *214*(12), 2006–2013. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw476

Saranathan, R., Pagal, S., Sawant, A. R., Tomar, A., Madhangi, M., Sah, S., Satti, A., Arunkumar, K. P., & Prashanth, K. (2017). Disruption of tetR type regulator adeN by mobile genetic element confers elevated virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Virulence*, *8*(7), 1316–1334. https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1322240

Saunders, N. A., & Holmes, A. (2014). Multilocus sequence typing (MLST) of *Staphylococcus aureus*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1085*, 113–130. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-664-1\_7

Savin, M., Bierbaum, G., Hammerl, J. A., Heinemann, C., Parcina, M., Sib, E., Voigt, A., & Kreyenschmidt, J. (2020). Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving municipal wastewater treatment plants. *The Science of the total environment*, 727, 138788. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138788

Schaumburg, F., Köck, R., Friedrich, A. W., Soulanoudjingar, S., Ngoa, U. A., von Eiff, C., Issifou, S., Kremsner, P. G., Herrmann, M., Peters, G., & Becker, K. (2011). Population structure of *Staphylococcus aureus* from remote African Babongo Pygmies. *PLoS neglected tropical diseases*, *5*(5), e1150. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001150

Schmithausen, R. M., Kellner, S. R., Schulze-Geisthoevel, S. V., Hack, S., Engelhart, S., Bodenstein, I., Al-Sabti, N., Reif, M., Fimmers, R., Körber-Irrgang, B., Harlizius, J., Hoerauf, A., Exner, M., Bierbaum, G., Petersen, B., & Bekeredjian-Ding, I. (2015). Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and of *Enterobacteriaceae* expressing extended-spectrum beta-lactamases on a model pig farm. *Applied and environmental microbiology*, 81(21), 7633–7643. https://doi.org/10.1128/AEM.01713-15

Schulz-Stübner S. (2017). Spezielle Erreger und Infektionen. Repetitorium Krankenhaushygiene, hygienebeauftragter Arzt und ABS-beauftragter Arzt, 299–374.

Schuster, D. (2013). Untersuchungen zur Einordnung eines *Staphylococcus auereus* Isolates von einem wildlebenden Gorilla aus Gabun. Projektarbeit im Rahmen des Bachelorstudiums Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.

Schuster, D. (2015). Untersuchung zur Typisierung von Styphlokokken per MALDI-TOF MS. Masterarbeit im Rahmen des Masterstudiums Mikrobiologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

Schuster, D., Axtmann, K., Holstein, N., Felder, C., Voigt, A., Färber, H., Ciorba, P., Szekat, C., Schallenberg, A., Böckmann, M., Zarfl, C., Neidhöfer, C., Smalla, K., Exner, M., & Bierbaum, G. (2022). Antibiotic concentrations in raw hospital wastewater surpass minimal selective and minimum inhibitory concentrations of resistant Acinetobacter baylyi strains. *Environmental microbiology*, *24*(12), 5721–5733. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16206

Schuster, D., Josten, M., Janssen, K., Bodenstein, I., Albert, C., Schallenberg, A., Gajdiss, M., Sib, E., Szekat, C., Kehl, K., Parčina, M., Hischebeth, G. T. R., & Bierbaum, G. (2018). Detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci harboring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 308(5), 522–526. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.05.001

Schuster, D., Rickmeyer, J., Gajdiss, M., Thye, T., Lorenzen, S., Reif, M., Josten, M., Szekat, C., Melo, L. D. R., Schmithausen, R. M., Liégeois, F., Sahl, H. G., Gonzalez, J. J., Nagel, M., & Bierbaum, G. (2017). Differentiation of *Staphylococcus argenteus* (formerly: *Staphylococcus aureus* clonal complex 75) by mass spectrometry from *S. aureus* using the first strain isolated from a wild African great ape. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 307(1), 57–63. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.11.003

Secor, P. R., Jennings, L. K., James, G. A., Kirker, K. R., Pulcini, E. D., McInnerney, K., Gerlach, R., Livinghouse, T., Hilmer, J. K., Bothner, B., Fleckman, P., Olerud, J. E., & Stewart, P. S. (2012). Phevalin (aureusimine B) production by *Staphylococcus aureus* biofilm and impacts on human keratinocyte gene expression. *PloS one*, *7*(7), e40973. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040973

Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., & Grossart, H. P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in microbiology*, *4*, 47. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047

Sezmis, A. L., Woods, L. C., Peleg, A. Y., & McDonald, M. J. (2023). Horizontal gene transfer, fitness costs and mobility shape the spread of antibiotic resistance genes into experimental populations of *Acinetobacter baylyi. Molecular biology and evolution*, *40*(3), msad028. https://doi.org/10.1093/molbev/msad028

Shaffer R. K. (2013). The challenge of antibiotic-resistant Staphylococcus: lessons from hospital nurseries in the mid-20th century. *The Yale journal of biology and medicine*, *86*(2), 261–270.

Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in microbiology*, *6*, 242. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00242

Shittu, A. O., Mellmann, A., Schaumburg, F. (2020). Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Complex From Fomites in Nigeria. *Infect. Genet. Evol.* 85, 104504. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104504

Sib, E., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Klanke, U., Savin, M., Hembach, N., Schallenberg, A., Kehl, K., Albert, C., Gajdiss, M., Zacharias, N., Müller, H., Schmithausen, R. M., Exner, M., Kreyenschmidt, J., Schreiber, C., Schwartz, T., Parčina, M., & Bierbaum, G. (2020). Bacteria isolated from hospital, municipal and slaughterhouse wastewaters show characteristic, different resistance profiles. *The Science of the total environment*, *746*, 140894. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140894

Sib, E., Voigt, A. M., Wilbring, G., Schreiber, C., Faerber, H. A., Skutlarek, D., Parcina, M., Mahn, R., Wolf, D., Brossart, P., Geiser, F., Engelhart, S., Exner, M., Bierbaum, G., & Schmithausen, R. M. (2019). Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in biofilms in

clinical wastewater networks. *International journal of hygiene and environmental health*, 222(4), 655–662. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.03.006

Silva, F., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2012). Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli. Biotechnology advances*, *30*(3), 691–708. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.12.005

Singer, J. T., van Tuijl, J. J., & Finnerty, W. R. (1986). Transformation and mobilization of cloning vectors in *Acinetobacter spp. Journal of bacteriology*, *165*(1), 301–303. https://doi.org/10.1128/jb.165.1.301-303.1986

Sinthuchai, D., Boontanon, S. K., Boontanon, N., & Polprasert, C. (2016). Evaluation of removal efficiency of human antibiotics in wastewater treatment plants in Bangkok, Thailand. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 73(1), 182–191. https://doi.org/10.2166/wst.2015.484

Slavetinsky, C. J., Peschel, A., & Ernst, C. M. (2012). Alanyl-phosphatidylglycerol and lysyl-phosphatidylglycerol are translocated by the same MprF flippases and have similar capacities to protect against the antibiotic daptomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *56*(7), 3492–3497. https://doi.org/10.1128/AAC.00370-12

Smith, W. P. J., Vettiger, A., Winter, J., Ryser, T., Comstock, L. E., Basler, M., & Foster, K. R. (2020). The evolution of the type VI secretion system as a disintegration weapon. *PLoS biology*, *18*(5), e3000720. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000720

Snell, R. G., & Wilkins, R. J. (1986). Separation of chromosomal DNA molecules from *C.albicans* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic acids research*, *14*(11), 4401–4406. https://doi.org/10.1093/nar/14.11.4401

Sopirala, M. M., Mangino, J. E., Gebreyes, W. A., Biller, B., Bannerman, T., Balada-Llasat, J. M., & Pancholi, P. (2010). Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*(11), 4678–4683. https://doi.org/10.1128/AAC.00497-10

Spagnolo, F., Trujillo, M., & Dennehy, J. J. (2021). Why Do Antibiotics Exist?. *mBio*, *12*(6), e0196621. https://doi.org/10.1128/mBio.01966-21

Stanton, I. C., Murray, A. K., Zhang, L., Snape, J., & Gaze, W. H. (2020). Evolution of antibiotic resistance at low antibiotic concentrations including selection below the minimal selective concentration. *Communications biology*, *3*(1), 467. https://doi.org/10.1038/s42003-020-01176-w

Stingley, R. L., Liu, H., Mullis, L. B., Elkins, C. A., & Hart, M. E. (2014). *Staphylococcus aureus* toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) production and *Lactobacillus* species growth in a defined medium simulating vaginal secretions. *Journal of microbiological methods*, *106*, 57–66. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.002

Strätz, M., Mau, M., & Timmis, K. N. (1996). System to study horizontal gene exchange among microorganisms without cultivation of recipients. *Molecular microbiology*, *22*(2), 207–215. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.00099.x

Stuani, L., Lechaplais, C., Salminen, A. V., Ségurens, B., Durot, M., Castelli, V., Pinet, A., Labadie, K., Cruveiller, S., Weissenbach, J., de Berardinis, V., Salanoubat, M., & Perret, A. (2014). Novel metabolic features in *Acinetobacter baylyi* ADP1 revealed by a multiomics approach. *Metabolomics : Official journal of the Metabolomic Society*, *10*(6), 1223–1238. https://doi.org/10.1007/s11306-014-0662-x

Suárez, G. A., Dugan, K. R., Renda, B. A., Leonard, S. P., Gangavarapu, L. S., & Barrick, J. E. (2020). Rapid and assured genetic engineering methods applied to *Acinetobacter baylyi* ADP1 genome streamlining. *Nucleic acids research*, *48*(8), 4585–4600. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa204

Sullivan, C. B., Diggle, M. A., & Clarke, S. C. (2005). Multilocus sequence typing: data analysis in clinical microbiology and public health. *Molecular biotechnology*, *29*(3), 245–254. https://doi.org/10.1385/MB:29:3:245

Svebrant, S., Spörndly, R., Lindberg, R. H., Olsen Sköldstam, T., Larsson, J., Öhagen, P., Söderström Lindström, H., & Järhult, J. D. (2021). On-Site pilot testing of hospital wastewater ozonation to reduce pharmaceutical residues and antibiotic-resistant bacteria. *Antibiotics* (*Basel, Switzerland*), 10(6), 684. https://doi.org/10.3390/antibiotics10060684

Taghizadeh, R. R., & Sherley, J. L. (2008). CFP and YFP, but not GFP, provide stable fluorescent marking of rat hepatic adult stem cells. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2008, 453590. https://doi.org/10.1155/2008/453590

Tandukar, M., Oh, S., Tezel, U., Konstantinidis, K. T., & Pavlostathis, S. G. (2013). Long-term exposure to benzalkonium chloride disinfectants results in change of microbial community structure and increased antimicrobial resistance. *Environmental science & technology*, *47*(17), 9730–9738. https://doi.org/10.1021/es401507k

Taylor, W. H., & Juni, E. (1961). Pathways for biosynthesis of a bacterial capsular polysaccharide. I. Characterization of the organism and polysaccharide. *Journal of bacteriology*, *81*(5), 688–693. https://doi.org/10.1128/jb.81.5.688-693.1961

Taylor, W. H., and Juni, E. (1961). pathways for biosynthesis of a bacterial capsular polysaccharide II. carbohydrate metabolism and terminal oxydation mechanisms of a capsule-producing coccus. *Journal of bacteriology*, *81*(5), 694-703. https://doi.org/10.1128/jb.81.5.694-703.1961

Taylor, W. H., & Juni, E. (1961). Pathways for biosynthesis of a bacterial capsular polysaccharide. III. Syntheses from radioactive substrates. *The Journal of biological chemistry*, 236, 1231–1234. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64154-7

Thaipadungpanit, J., Amornchai, P., Nickerson, E. K., Wongsuvan, G., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., & Peacock, S. J. (2015). Clinical and molecular epidemiology of *Staphylococcus argenteus* infections in Thailand. *Journal of clinical microbiology*, *53*(3), 1005–1008. https://doi.org/10.1128/JCM.03049-14

Timková, I., Maliničová, L., Nosáľová, L., Kolesárová, M., Lorková, Z., Petrová, N., Pristaš, P., & Kisková, J. (2024). Genomic insights into the adaptation of *Acinetobacter johnsonii* RB2-047 to the heavy metal-contaminated subsurface mine environment. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 37(2), 371–387. https://doi.org/10.1007/s10534-023-00555-0

Tokuda, M., Suzuki, H., Yanagiya, K., Yuki, M., Inoue, K., Ohkuma, M., Kimbara, K., & Shintani, M. (2020). Determination of plasmid pSN1216-29 host range and the similarity in oligonucleotide composition between plasmid and host chromosomes. *Frontiers in microbiology*, *11*, 1187. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01187

Tomaras, A. P., Flagler, M. J., Dorsey, C. W., Gaddy, J. A., & Actis, L. A. (2008). Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology (Reading, England)*, *154*(Pt 11), 3398–3409. https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/019471-0

Tombolini, R., Unge, A., Davey, M. E., de Bruijn, F. J., & Jansson, J. K. (1997). Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged Pseudomonas fluorescens bacteria. FEMS Microbiology Ecology, 22(1), 17-28. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1997.tb00352.x

Tong, S. Y. C., Schaumburg, F., Ellington, M. J., Corander, J., Pichon, B., Leendertz, F., Bentley, S. D., Parkhill, J., Holt, D. C., Peters, G., & Giffard, P. M. (2015). Novel staphylococcal species that form part of a Staphylococcus aureus-related complex: the non-pigmented Staphylococcus argenteus sp. nov. and the non-human primate-associated Staphylococcus schweitzeri sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 65(Pt 1), 15–22. https://doi.org/10.1099/ijs.0.062752-0

Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β-Lactamases and β-Lactamase inhibitors in the 21st century. *Journal of molecular biology*, *431*(18), 3472–3500. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002

Toth, M., Lee, M., Stewart, N. K., & Vakulenko, S. B. (2022). Effects of inactivation of d,d-transpeptidases of *Acinetobacter baumannii* on bacterial growth and susceptibility to β-Lactam antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *66*(1), e0172921. https://doi.org/10.1128/AAC.01729-21

Townsend, J., Park, A. N., Gander, R., Orr, K., Arocha, D., Zhang, S., & Greenberg, D. E. (2015). Acinetobacter infections and outcomes at an academic medical center: a disease of long-term care. *Open forum infectious diseases*, *2*(1), ofv023. https://doi.org/10.1093/ofid/ofv023

Treiber, F. M., & Beranek-Knauer, H. (2021). antimicrobial residues in food from animal origin-a review of the literature focusing on products collected in stores and markets worldwide. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(5), 534. https://doi.org/10.3390/antibiotics10050534

Turlej, A., Hryniewicz, W., & Empel, J. (2011). Staphylococcal cassette chromosome *mec* (Scc*mec*) classification and typing methods: an overview. *Polish journal of microbiology*, 60(2), 95–103.

Uppalapati, S. R., Sett, A., & Pathania, R. (2020). The outer membrane proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* confer a two-pronged defense in facilitating its success as a potent human pathogen. *Frontiers in microbiology*, *11*, 589234. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589234

Vallenet, D., Nordmann, P., Barbe, V., Poirel, L., Mangenot, S., Bataille, E., Dossat, C., Gas, S., Kreimeyer, A., Lenoble, P., Oztas, S., Poulain, J., Segurens, B., Robert, C., Abergel, C., Claverie, J. M., Raoult, D., Médigue, C., Weissenbach, J., & Cruveiller, S. (2008). Comparative analysis of Acinetobacters: three genomes for three lifestyles. *PloS one*, *3*(3), e1805. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001805

Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(18), 5649–5654. https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112

Van den Honert, M. S., Gouws, P. A., & Hoffman, L. C. (2021). A preliminary study: antibiotic resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* from the meat and feces of various south african wildlife species. *Food science of animal resources*, *41*(1), 135–144. https://doi.org/10.5851

Vaneechoutte, M., Young, D. M., Ornston, L. N., De Baere, T., Nemec, A., Van Der Reijden, T., Carr, E., Tjernberg, I., & Dijkshoorn, L. (2006). Naturally transformable *Acinetobacter sp.* strain ADP1 belongs to the newly described species *Acinetobacter baylyi*. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 932–936. https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.932-936.2006

Van Wamel, W. J., Rooijakkers, S. H., Ruyken, M., van Kessel, K. P., & van Strijp, J. A. (2006). The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *Journal of bacteriology*, *188*(4), 1310–1315. https://doi.org/10.1128/JB.188.4.1310-1315.2006

Ventola C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T : a* peer-reviewed journal for formulary management, 40(4), 277–283.

Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrovic, M., & Barceló, D. (2012). Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *The Science of the total environment*, *430*, 109–118. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.055

Vincze, S., Stamm, I., Monecke, S., Kopp, P. A., Semmler, T., Wieler, L. H., Lübke-Becker, A., & Walther, B. (2013). Molecular analysis of human and canine *Staphylococcus aureus* strains reveals distinct extended-host-spectrum genotypes independent of their methicillin resistance. *Applied and environmental microbiology*, *79*(2), 655–662. https://doi.org/10.1128/AEM.02704-12

Voigt, A. M., Faerber, H. A., Wilbring, G., Skutlarek, D., Felder, C., Mahn, R., Wolf, D., Brossart, P., Hornung, T., Engelhart, S., Exner, M., & Schmithausen, R. M. (2019). The occurrence of antimicrobial substances in toilet, sink and shower drainpipes of clinical units: A neglected source of antibiotic residues. *International journal of hygiene and environmental health*, 222(3), 455–467. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.12.013

Voigt, A. M., Zacharias, N., Timm, C., Wasser, F., Sib, E., Skutlarek, D., Parcina, M., Schmithausen, R. M., Schwartz, T., Hembach, N., Tiehm, A., Stange, C., Engelhart, S., Bierbaum, G., Kistemann, T., Exner, M., Faerber, H. A., & Schreiber, C. (2020). Association between antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in anthropogenic wastewater - An evaluation of clinical influences. *Chemosphere*, *241*, 125032. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125032

Von Eiff, C., Proctor, R. A., & Peters, G. (2000). *Staphylococcus aureus* small colony variants: formation and clinical impact. *International journal of clinical practice. Supplement*, (115), 44–49.

Walker, J., Fox, A. J., Edwards-Jones, V., & Gordon, D. B. (2002). Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *Journal of microbiological methods*, *48*(2-3), 117–126. https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00316-5

Bubeck Wardenburg, J., Bae, T., Otto, M., Deleo, F. R., & Schneewind, O. (2007). Poring over pores: alpha-hemolysin and Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Nature medicine*, *13*(12), 1405–1406. https://doi.org/10.1038/nm1207-1405

Wardyn, S. E., Kauffman, L. K., & Smith, T. C. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in central lowa wildlife. *Journal of wildlife diseases*, *48*(4), 1069–1073. https://doi.org/10.7589/2011-10-295

Weber, B. S., Kinsella, R. L., Harding, C. M., & Feldman, M. F. (2017). The Secrets of Acinetobacter Secretion. *Trends in microbiology*, *25*(7), 532–545. https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.005

Weese, J. S., Rousseau, J., Deckert, A., Gow, S., & Reid-Smith, R. J. (2011). *Clostridium difficile* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* shedding by slaughter-age pigs. *BMC veterinary research*, 7, 41. https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-41

Weis, S., Kimmig, A., Hagel, S., & Pletz, M. W. (2017). Antibiotic Stewardship am Beispiel der *Staphylococcus aureus* Bakteriämie [Antibiotic stewardship and *Staphylococcus aureus* Bacteremia]. Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin, 112(3), 192–198.

Wilson, D. J., Shi, C., Teitelbaum, A. M., Gulick, A. M., & Aldrich, C. C. (2013). Characterization of AusA: a dimodular nonribosomal peptide synthetase responsible for the production of aureusimine pyrazinones. *Biochemistry*, *52*(5), 926–937. https://doi.org/10.1021/bi301330q

Wistrand-Yuen, E., Knopp, M., Hjort, K., Koskiniemi, S., Berg, O. G., & Andersson, D. I. (2018). Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. *Nature communications*, *9*(1), 1599. https://doi.org/10.1038/s41467-018-04059-1

Witteveen, S., Hendrickx, A. P. A., de Haan, A., Notermans, D. W., Landman, F., van Santen-Verheuvel, M. G., de Greeff, S. C., Kuijper, E. J., van Maarseveen, N. M., Vainio, S., & Schouls, L. M. (2022). Genetic Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus argenteus* Isolates Collected in the Dutch National MRSA Surveillance from 2008 to 2021. *Microbiology spectrum*, *10*(5), e0103522. https://doi.org/10.1128/spectrum.01035-22

Wolters, M., Rohde, H., Maier, T., Belmar-Campos, C., Franke, G., Scherpe, S., Aepfelbacher, M., & Christner, M. (2011). MALDI-TOF MS fingerprinting allows for

discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 301(1), 64–68. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.06.002

Wong, D., Nielsen, T. B., Bonomo, R. A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., & Spellberg, B. (2017). Clinical and pathophysiological overview of Acinetobacter infections: a century of challenges. *Clinical microbiology reviews*, *30*(1), 409–447. https://doi.org/10.1128/CMR.00058-16

Worthing, K. A., Abraham, S., Pang, S., Coombs, G. W., Saputra, S., Jordan, D., Wong, H. S., Abraham, R. J., Trott, D. J., & Norris, J. M. (2018). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Australian animals and veterinarians. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, *24*(2), 203–212. https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0032

Wright G. D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?. *BMC biology*, *8*, 123. https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123

Xiong, L., Cao, Y., Cooper, R., Rappel, W. J., Hasty, J., & Tsimring, L. (2020). Flower-like patterns in multi-species bacterial colonies. *eLife*, *9*, e48885. https://doi.org/10.7554/eLife.48885

Yagi, T., Wachino, J., Kurokawa, H., Suzuki, S., Yamane, K., Doi, Y., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., & Arakawa, Y. (2005). Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli. Journal of clinical microbiology*, *43*(6), 2551–2558. https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2551-2558.2005

Yang, K., Chen, M. L., & Zhu, D. (2023). Exposure to benzalkonium chloride disinfectants promotes antibiotic resistance in sewage sludge microbiomes. *The Science of the total environment*, *867*, 161527. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161527

Yang, Q., Gao, Y., Ke, J., Show, P. L., Ge, Y., Liu, Y., Guo, R., & Chen, J. (2021). Antibiotics: an overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods. *Bioengineered*, *12*(1), 7376–7416. https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1974657

Zack, K. M., Sorenson, T., & Joshi, S. G. (2024). Types and mechanisms of efflux pump systems and the potential of efflux pump inhibitors in the restoration of antimicrobial susceptibility, with a special reference to *Acinetobacter baumannii*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 13(3), 197. https://doi.org/10.3390/pathogens13030197

Zanichelli, V., Sharland, M., Cappello, B., Moja, L., Getahun, H., Pessoa-Silva, C., Sati, H., van Weezenbeek, C., Balkhy, H., Simão, M., Gandra, S., & Huttner, B. (2023). The WHO AWaRe (Access, Watch, Reserve) antibiotic book and prevention of antimicrobial resistance [Livre sur les antibiotiques AWaRe (Access, Watch, Reserve) de l'OMS et prévention de la résistance aux antimicrobiens]. Bulletin of the World Health Organization, 101(4), 290–296.

Zhang, D. F., Zhi, X. Y., Zhang, J., Paoli, G. C., Cui, Y., Shi, C., & Shi, X. (2017). Preliminary comparative genomics revealed pathogenic potential and international spread of Staphylococcus argenteus. *BMC genomics*, *18*(1), 808. https://doi.org/10.1186/s12864-017-4149-9

Zimmermann, M., & Fischbach, M. A. (2010). A family of pyrazinone natural products from a conserved nonribosomal peptide synthetase in *Staphylococcus aureus*. *Chemistry & biology*, 17(9), 925–930. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.08.006

Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H., & Bakhrouf, A. (2011). Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *staphylococci. BMC research notes*, *4*, 453. https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-453

## 7. Danksagung

Für meine Mutter

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Frau Prof. Dr. Gabriele Bierbaum herzlichst für die Möglichkeit diese Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie absolvieren zu dürfen bedanken. Sie hat mich auf einen langen Weg meiner akademischen Zeit, von der Bachelorarbeit über die Masterarbeit, bis zur Dissertation begleitet. Stets mit viel guter Laune und vielen guten Ideen im Gepäck. Ich möchte mich ausdrücklich für die mir entgegengebracht Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen bedanken.

Frau Prof. Dr. Tanja Schneider danke ich sehr für das Interesse an meiner Arbeit und dafür diese als Zweitbetreuerin zu begleiten.

Herrn Prof. Dr. Martin Baunach und Herrn Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck danke ich sehr für ihre Bereitschaft als Mitglied der Prüfungskommission tätig zu sein.

Herrn Dr. Fabian Grein danke ich für die Bereitstellung der Fluoreszenzgene für GFP und mCherry, sowie seine Zeit bei der Einführung zum Fluoreszenzmikroskop. Bei Prof. Dr. Kornelia Smalla und ihrer Arbeitsgruppe möchte ich mich für die Bereitstellung des Stammes *A. baylyi* BD413 bedanken.

Bei Frau Michaele Josten möchte ich mich sehr herzlich bedanken für die Hilfe rund ums Thema MALDI-TOF und all die vielen Spektren die sie im Laufe der Jahre für mich angefertigt hat. Ebenfalls möchte ich mich besonders bei Frau Christiane Szekat bedanken, die mir mit vielen Tipps und Tricks zur Seite stand. Insbesondere möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit und Arbeitsatmosphäre bei den ganzen Mitgliedern in "unserem" Labor und der "AG Sonnenschein" bedanken. Ihr habt mir stets ein Lächeln ins Gesicht gezaubert.

Außerdem danke ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Bierbaum, Schneider, Sahl, Parčina und Piel für die äußerst freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppen und die stets angenehme Arbeitsatmosphäre. Zudem ein großes Dankeschön allen ehemaligen und heutigen Mitarbeitern des IMMIP, sowie all denen die mich auf diesem Weg begleitet haben.

Danke an die Flow Cytometry Core Facility am Institut für Experimentelle Immunologie am Uniklinikum Bonn, sowie Herrn Dr. Manuel Ritter für die Hilfe bei den Messungen mit dem Durchflusszytometer.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Förderschwerpunktes des Bundesministeriums für Bildung und Forschung "Nachhaltiges Wassermanagement" (NaWaM) und Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf

(RiSKWa) durchgeführt, genauer im Verbundprojekt HyReKA. Ich danke für die finanzielle Unterstützung und allen Beteiligten im Verbund für die großartige Zusammenarbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die hingebungsvolle Unterstützung während meines gesamten Studiums.

## 8. Anhang

## 8.1. Nukleotidsequenz des Vektors pEPSA5

tggcattctacgactataacttaaatttatattttttactttataatatatatattgattatagaataatgttgct  $\verb|catatcgtttgccaacatctagtactcaaattacactatgttacacttggtaatattaaccgaacttcccctgtc|\\$  $\verb|caaattagataagaggtaataattagaaaattaattttatagtaaattgaaaattgagaagcgtgtattaaaaca| \\$ aattttcaataacagcaatatttcacgaacacaaatatcgaagaatttagaacttaataaagctactatttctaa  $\verb|cattctgaacaacttaaaacacaagagtttagttaatgaagtaggagaaggtaatagtactaaaagtggtggacg| \\$ aaagcctattttactcgaaattaaccaaaaatatggctactatatttctatggatttaacatatgattccgttga attaatgtacaactactttgatgctactatattaaagcaagattcctacgaattaaatgataaaaatgtaagcag tatattacaaattttaaaatctaatataaacgtctcagaaaaatatgatacgttatatgggttacttggtatatc  $\verb|atttaccg| at taa a gtcattcaca | at ttaccg| at tataga | at ttaccg$ tgaaaaaagtttatatattaattcaaacataaataatttgattactttaagtattcacaagggtataggcgctgg catcataataaataaaaaactttatcgtggctcaaatggagaggctggagagataggtaagacattggttttgga atctataaataacaatgacaacaaatattataaaatcgaagatatatgctcccaagacgctttaatacagaaaat aaataataggttgggcgtcacattgacgtttacagaactaatccaatattacaacgaaggaaattcaattgttgc tcatgaaattaaacaatttattaataaaatgacagttctgattcataatttgaatacacaatttaacccagacgc tatttatattaactgtcctttaattaatgaattaccaaatattttaaatgaaattaaagagcaattctcctgttt $\verb|ttctcaaggcagtccaattcaattaactttaactactaatgtaaaacaagctactttattgggtggcactttagc||$ aataatgcaaaaaacattaaatataaataacattcaaatgaatattaaataattacagcagtctgagttataaaa tgtttattaaattaaccaactaaaatgtagaattcgagctcggtacccggggatcctctagagtcgacctgcagc  $\verb|caag| \verb|cttggg| cttttcag| \verb|cctgat| acag| attaaatcag| aacg| caga| ag| cggtctgat| aaaacag| aatttgcctgg|$ cggcagtagcgcggtggtcccacctgaccccatgccgaactcagaagtgaaacgccgtagcgccgatggtagtgt ggggtctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggcct ttcgttttatctgttgtttgtcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccgggagcggatttgaacgttg  $\verb|tcctgacggatggcctttttgcgtttctacaaactctttttgtttatttttctaaatacattcaaatatgtatcc|\\$ tggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgttcatccatagtt gcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccg  $\verb|tccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccccatgttgtgcaaaaaaagcggttagctccttcggtcct|\\$  $\verb|ccgatcgttgtcagaagttagttggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttact| \\$ gtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgtatgcgg  $\verb|cgaccgag| ttgctcttgcccggcgtcaacacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatc|$  $\verb|attggaaaacgctcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaacccact| \\$ cgtgcacccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaat

 $\tt gccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcctttttcaatattattgaagc$ atttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaacaaataggggttccg  $\verb|cgcacatttccccgaaaaagtgccacctggcggccgcataagatgatcttcttgagatcgttttggtctgcgcgta|\\$  $\verb|atctcttgctctgaaaaccgaaaaaaccgccttgcagggcggtttttcgaaggttctctgagctaccaactctttg|$ aaccgaggtaactggcttggaggagcgcagtcaccaaaacttgtcctttcagttttagccttaaccggcgcatgac ttcaagactaactcctctaaatcaattaccagtggctgctgccagtggtgcttttgcatgtctttccgggttgga  $\verb|ctcaagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcggactgaacggggggttcgtgcatacagtccagcttgga|\\$ gcgaactgcctacccggaactgagtgtcaggcgtggaatgacaaacgcggccataacagcggaatgacaccgg  $\verb|ctttgccgcggccctctcacttccctgttaagtatcttcctggcatcttccaggaaatctccgccccgttcgtaa|\\$ gccatttccgctcgccgcagtcgaacgaccgagcgtagcgagtcagtgagcgaggaagcggaatatatcctgtat  $\verb|cacatattctgctgacgcaccggttgcagccttttttctcctgccacatgaagcacttcactgacaccctcatcag| \\$ tgccaacatagtaagccagtgcggccgcttctttcctgcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgc $\verb|ctttgagtgagctgataccgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaaga| \\$  $\tt gcgcctgatgcggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcataagatcccctcgacctgcagg$  $\verb|catgcaag| \verb|cttctgtagg| \verb|ttttaggcataaaactatatgatttacccctaaatctttaaaatgccccttaaaat| \\$  $\verb|tcaa| a at a a agg cattta| a a at atttcttgtgata| a agtttgtta| a a agg agg tggtttt| at gactgtt| teasing a constraint of the constraint$ atgtggttatcgattataggtatgtggttttgtattggaatggcattttttgctatcaaggttattaaaaataaa  $\verb| aattagaccacgcatttatgccgagaaaatttattgtgcgttgagaagaacccttaactaaacttgcagacgaat| \\$ gtcggcatagcgtgagctattaagccgaccattcgacaagttttgggattgttaagggttccgaggctcaacgtc  $\verb| aataaagcaattggaataaagaagcgaaaaaggagaagtcggttcagaaaaagaaggatatggatctggagctgt| \\$ aatataaaaaccttcttcaactaacggggcaggttagtgacattagaaaaccgactgtaaaaagtacagtcggca  $\verb|ttatctcatattataaaaagccagtcattaggcctatctgacaattcctgaatagagttcataaacaatcctgcat|\\$  $\tt gataaccatcacaaacagaatgatgtacctgtaaagatagcggtaaatatattgaattacctttattaatgaatt$  $\verb|ttcctgctgtaataatgggtaaggtaattactattattattgatatttaaggttaaacccagtaaatgaagtcc||$ tctctacatcagaaaggtataaatcataaaactctttgaagtcattctttacaggagtccaaataccagagaatg ttttagatacaccatcaaaaattgtataaagtggctctaacttatcccaataacctaactctccgtcgctattgt  $\verb|cttcttgttttatgtttcggtataaaacactaatatcaatttctgtggttatactaaaagtcgtttgttggttca||$  $\verb| aata | at taa | at tate | to the tensor |$  $\verb|caatattactgtaacataaatatattttaaaaatatcccactttatccaattttcgtttgttgaactaatggg|$ tgctttagttgaagaataaagaccacattaaaaaatgtggtcttttgtgtttttttaaaaggatttgagcgtagcg  ${\tt aaaaatccttttctttcttatcttgataataagggtaactattgccggcgaggctagttacccttaagttattgg}$ tatgactggttttaagcgcaaaaaagttgctttttcgtacctattaatgtatcgttttaaatgactagtaaaaa  ${\tt acatacatagaaaggggaaaaagcaacttttttattgtcatagtttgtgaaaactaagttgtttttatgtgttta}$ taacatggaaaagtatactgagaaaaaacaaagaaatcaagtatttcagaaatttattaaacgtcatattggaga gaatcaaatggatttagttgaagattgcaatacatttctgtcttttgtagctgataaaactttagaaaaacagaa gggtttatctttgatgatgcaatatattaagcagcaagagaaaaaggagtttatctttttaactttgactacacc

## 8.2. Nukleotidsequenz des Plasmids pHHV216

gttagtaagaccaaccaatccgcatatcgtatagacaattttattgcgtttactaattaactcgacaatagaaaga  ${\tt tcttgatttttcattccatgatccttagtagcttgagcaatactgcatttctctataaccatgaagcatattcac}$  $\verb|cagaacc|| attaattggttaaggtatgtgcaaggtaatccatttaattcagggaatttttcccacattaaatattt|| attaattaattggttaaggtatgtgcaaggtaatccatttaattcagggaatttttcccacattaaatattt|| attaattaggtaaggtaatccatttaattcagggaatttttcccacattaaatattt|| attaattaggtaaggtaatccatttaattcagggaatttttcccacattaaatattt|| attaattaggtaaggtaatccatttaattcagggaatttttcccacattaaatattt|| attaattaggtaaggtaatccatttaattcagggaatttttcccacattaaatattcagggaatttttccccacattaaatattccatttaattcagggaattttttcccacattaaatatttt|| attaattcagggaatttttcccacattaaatattttcccacattaaatattccattaa$ atctttgtaaagaaagctatttctcttaaatttttcttggccagataattcaattttcatttgttcaagctgctt aaaatgctcaaccacatcgtctggaatcggcatattgagcgctacactcttaccattcaaccaatattggattgg  $\verb|tcggacgtta| at a gattcatta| a a gcctata gctttga a a ta a tccctta ctgcttca gcgtta ta ga a cccca a$ tgattcaactagcagtttaaaatctgcatttgtcattatataccgtccttaatcagattaaatttgattatatag tccacaggtggacaaaacaagcaatatccaaagtttaaccttctattagtttagtagatcatggactgccaatg ttattgtctggtccataatctctaaaacgtctaatcccgatgcttggacaattgctgcaagctgcagctattatc $\verb|caggcatctattctacctatctaatgcagatccatagcagacatatcagagcaaagtgtctactttgcgaactga|\\$ cgcaatcagttaaattttcccttccctgattaccgttgattttcaagcgagctttaaaaagctgtgctttttaaa tggcgaccgcagaaaatgaactactcccatttgatccagtaacgagatataaaaaaacattcttaatgggtgttt $\verb|ctgctgttttggagcattggcatcataagccgttaatttttggcttatgaaatttctgatttttgaatatcggtatt|\\$ ttgggcttcccacttccctttatttgctaatgtttgaactcttgcgcctgttggcagtccagttttaggatcaat ttctttagtattcacttcgactttgttagaccctttataggtcaggacaatatcatcattcttaataatattttg ttctttcaaaqtacqttccaqatccttcqcccaqattqtatttttttcacctttactattttcaataqtqqcqta gtagctgctgttatttttaggatcatgcttataaggtgctgcgccatgatccactaattttccaacgtgcatttt tttctgattaagttgttcaaccgcaacttctatactggctgtgcgctgcttttctgtgaaaccgtctgctttcat tacctctttaccttgttctttttcatatcattgagcaaggctagatcaatatcacgaggttcatagccctttac tgtcatccccttcattgaagcttcaagccatacattccgtttaaattcttcagagcctttaacctgtattgtttc  $\verb|ccattttttagcttttgctacctccaccattgaagcagcaatatgcttatcatcattgtggtttttaaggcttt|\\$ gagcaatgcttttaggtatgccttcttcactagattctttactgtcatcagctttttagctttttggtatcagttac

 $\verb|cttagtttcttcaggatcttgattaataccttttgtgttttttgaaatatctttattttcagctttttcaatcga|\\$ tttatcgaccttgtttgattcagtcatgatcaagtccttattgattagaaatattttggcgacgtgctgcttcgt  $\verb|caata| at cattlet t g g tt t g a a tattlet t t t t t t g t t a g a g t g c g a t t t g t c t t t c a g t t t c a g t g c t t a a a t c t t t c g t g t t a g a g t g c g a t t t g t c t t c a g t t t c a g t g c t t a a a t c t t t c g t t a g a g t g c g a t t t g t c t t t c a g t t t c a g t g c t t a a a t c t t c g t t a g a g c g a t t t g c t t t c a g t t t c a g t c c a g t c a g t c c a g t c a$ tattttgctgatatacagctatgctttgcatatagttttttacagtgtcaggctgattaaccgctttagatgaaa agccattatgactggtcacagctttatttgaagtacagcccacaactgaaaaagatagggtaatgctgattaatg agate t gaat ttte tata gate e gttt t gae ette at egget geaact g g g tt g te e t g tagate tte at ea at te e gea e gae e $\tt gaaaattcagattcagcacaattaaaaaacgtatcgactatttgttcggcatccatttcgtcataactaaattca$ gtgtcatcaactgaaataaggttttccaattgttctggttcatctactgcaatcagattttccatttctgcaatc atggccagaggatctgattcatctgctgcaactagattttccgcttgttctggttcatctactgcaatcagattt $\verb|ttcatttctgcaatcatggccagaggatcggaatcatcttgctgcaactagattttccgcttgttctgatgcacct| \\$  $\verb|accgcaactaggctttctactggattttcagcactagcttccacctggctaaagaaatcatcgacgatattttgt|$ gcttcagtatcttcttcccattcaatagccgcaaagaattgatcgaccacttgtagacattcttcgggttgtgga  $\tt gcctgttctactgtagtaattgcagctatacgtttttcaatttttgccttatgcagctttacgtctaaatcagga$  $\verb|ttcatgctaggagaaacggactttaggcgatccacaaaagcactgtcattaaaatacttagccttttcacacatg|$ a taggttttgtattttccataaagataatttctttatcttgcgacaattcttttagctcttgagggagcattaaagctcgtctttgatctgattcattttctgaattagagccaccttgcccccatgccatagaacggctttggccctta gatttggctttgaaagtgaaatagccaagcatttcactatattcattagcatctcgttgctctctaggcgggtaa  ${\tt acgatttgcaaagcatggttagttacaagccccctagtttgagttttataaacgtcctctaactggccaatagac}$ tgaataattgttaataaacgaatgttatagcccgcaataaatgagttagcgtctgcaattttcgctactttaccg a cag ccgttgcttcatcatcacaactag gcactggtatttcaa agatgaatcttgttgtggcagtgtttttag attcacatcaattaagagtgaataaaacagattgattaagtttttagcatctcctaagcggttaggttgaacacca  $\tt aaataaatagacattctttgtctgcgtacatcttcaagtttaaagtcacttgatgaagttgcagcgtccacaatc$ gggttcgcaaaaatcgttaaaggtgaggtaaaagtagaaatgatgttaccaagcgtattgtctggtgaacttaaa  $\tt aaacggtttaaaagcatctaggcaagtatcactaagcggtttatcactttgcgctctttcatcaataatagatcta$  $\verb|atatgatcctgaattggcttacctttacctgaactctgtcttaaaacctcgcccatagttacaggcagatcttca| \\$ gtttcaaatagatatagggctaggccaagaaataagttattagcattgtcattccagaaatcggttttagcatca  $\verb|ccagtcacagggtagaaacttcgaccaatagcaagaatttcacctactctaaaattttcgtcatgactaacggta|\\$ tcaaatggattccatttgtgagattttagatcttcagaaaatgggctgaatagataaactttctggccattctta gcacgaaatttagaagttaataggaagttttcaagctttaaatccagtacaactacactatccgaatagtttaga  ${\tt aggttaggaataacaatcgctacacctttaccgcttcgtgtcggagcagccagaagtacaaattgctgaccgcca}$ agcatta a at atttat tattat gat atttccct acta a a attccct tatttccc atca atcc agatttct ga atttcttttgttgtggcaaatctggcatcaccgtgtaacgactgttttttattaaacagactagcaatgactaaagcaggg agaaca a agtgata a atagtg cag cgat caag g cacctt g cag ctttttctttt g t g cag g tacatt g t g t g cag g cacctt g cag cttttt ctttt g t g cag g t a catt g t g t g cag g cacctt g cag cttttt ctttt g t g cag g t a catt g t g cag g cacctt g cag c catt g t g cag g cacctt g cacctt g cacctt g cacctt g cacct g cacctt g cacctataaatcccaataatacccccacgttgtcagattcacttcaggaaatggattggtcttattagctaagtaataa agaa caccggc cagatatttag taataa agaa accaatgaccgctaa aaaaattgcaaggagtaggatcaggatt $\verb|atttgatttcagaaataaagcgttctttacctattagattactttcatcatcgtattttttcttcacttcaacat|\\$  ${\tt gaacaataatatcaatggttaaagcaactaattcctttagtgtagtggcatcgtagatatttgcttgttcatgtt}$ 

 $\verb|ctttgcacataaagacgtagcgatcataagccagtgaacagctttcagcgtgataacttgtaatagatccactgt|\\$ gaccagttgtaagcaatttcagaaagtcaaaagcttctccaccacgtaattcagcaagtaatacacggtctggct tcatacgcatattactagcgatcagatcagatggagttaccttagctttaccttgaccacctttagaataaagta ggtgaaccttgttttcatgtggaacgaaaagttcacgtacatcttcaatagtgacaagacgttcatctttaggaa tgtactgacaaattgccttcataaaagtggttttaccagaaccagtatcaccaacaactgcaatatttttcttac  $\verb|attgaacagcgaatttaaaaaatccctcaagatctttgttttctaaaaactggactagcttaatatcttcagtac| \\$  $\tt gtaatacaggtttaaactgctcaaactctttagatttcccatatctgaagtggtcaaaaaaagccttgatctttat$ gtagaacaatctgaatacgctctccatcaggcaattgagcagacaatatagggttttcttggccaattcgttgat tgg tatagg tag caataa cattagc taa ag ctg ttatttg ccc catttc cag at ttataga at gcttttc ccatc $\verb|ctttattagattccgtccaaacttcattaggtgcgttaattgcaatttcagtcacccctttagtttttaagaatt|\\$  $\verb|tttctaatggaagtaatagctgtctaaccattacatccttgcttaaaacattattttgcgcggagttcatacaca| |$  $\verb|cctctgaaatcaatatctttggccacgtaaattgaagctacatcaccctgatttttataaattgttggcttgata|\\$  $\verb|ttgattgtttcattcaacactgtttcagccattgatttacccatgtctgaagtgttttgaagcatataaggagtg|\\$  $\verb|ccgatacgtgcgccccaacggttatctactcgaccacttaaaccacctgttcctaaatggtctgctgcgggagaa| \\$ tcaatatcgacaataacaccatgcggagtttttaagcgtgaccagatgatacctaaacgtctttgaccttgtgct  $\tt gcaatacttttgtattctccaatgacttcagatcccgcttcagcaaggactacacgaccattatcagaataaaca$ ggttgtggaaggacacatgaagccataccgccaatttctgaaacgactttaactgacaggttgcaacggattaca  $\verb|cgacctttagcaattaagtaatttcgatccccaataaacctagcctggactttattagaagaatgactagccatg|$  $\verb|ttagttgtagcttgttgtggctgatgctgcataggttcatcatcatcatgcgctaaagacatcaaaccagat| \\$  $\verb|ccagagaa| attaccaga acggctattact attctgatcctgttcaaactgtttcatcatgcctgttacttggtta|$ taagctgcttgatgattcatgcttgacggctggccaaccgccccgccttgttgtgaaggattgacaaaaatcccg  $\verb|ccaccgtaacggcttccattgtttaaaggtacatattgagcttgttgttgttgttgttggctgtaattactacaggc|\\$ tgttgatttgctgcttgttgttcaactactggcgcagcttcaggctgtcttaaaaatctgctgaccattttggcat tgaaaaaccaacatgccgttataagttaaagcattgccgttattgtctgttaactgtctaggaatactttgatcc tgacaggcatctaggctttgaaattgagcattttgatctgcatccattggcacaggatcagtattagtaaaatcc  $\verb|cgtcttttagctgaagcatctaggcttggatctatctgattttcttttaattgggctgcttcttcagcatcacta|\\$  $\verb|ctatctgaaaagaagttataggcaaagaccgctataacagtaaaaagtaccgccataactgcaataaacgctatt|\\$ tcatcaggagcttgttgatcatctaatggtttttgatcattaatattcattagttcatatccccagtaatgacac gtttaacaccctctacagtagtgccatcttgtggagcaacaccgacaggatcataagattcattgaaaatgctca  $\verb|ctacgccttttccttgacgtaaaacaaattttttagctagagcttcaacaatcaaaagttttggatcttctttac||$  $\verb|atcgcatataggtaaaacgaccgtcatcaaatagcatttctggaacaaaatgcttccctttactgtttgcggctt|\\$  $\tt gacgata attcca attttt agggataggt gcag cattggct a aacgat gct gt a aacca a aattc agt aagtt$ ggctttcttcttttaattgtgctgcataagcgttatagcgttgagcttcttcctgtttacgttttcttcttctt gtgggtatttaaagacaacacgatacatcggtttttctttggcattatttagaacttgaaaatcaaaactataat  $\verb|cacgcttattagtgcgtaactctaagttattccgagtagccttatcctttggcttcacccatactaaatttgatc| \\$  $\verb|cagtatccgcaaaaaatacaccaattggtgtcatccttttcacagtctgaagggtatccagtagcagcaccacgct| \\$  $\verb|ctaaa| attenticae cette aceta ataca atgegggtta eagtgeettttttga eagta attegata aa eateatenticae eagtgeette eagtgeette eagtgas eagtgeette eag$ taggaacatagttgattgttctaatacgtgaatcggtaggcatagctttaggcgtaattgctgcataagagatcc  $\verb|catgcacagccaaagccaagcaagaattaatttttcatgtaatgatcctttacattccttgttgagcttgtgg| \\$ ctgaacagcagccccgccttgttgaatcggaacatagacttgctgactaggttcaacaaccgcagcttgcgctac  ${\tt aggtctgttaggagatagttcaggatcgacacgatagcccacgaccttaaagccgaatggatttttaattagatc}$  $\verb| tttttctaccagtttatttagattgttcggagcatattcatatcgaatacttgcaatataatattgtggctgttc| \\$ atcacgattagcttcgactgaatgcaaagtcttagtgaagcggacactagcggtaaaacctgtttcatcctgatt agtctggacagaaatcacatcaacttttaattcatattttttgccgtactttttatctcttgcgctatcaccttcat agagt gaag caa agt cattaccg acctg at tactg ctcatagt cat gactaa at cata at ctg gct gta at a a constant and the constant at a constant at atacttgctgatcatcaacacgcctacgtattcaacatttccttgagctttatctactgtgaaaacaacaggtac  ${\tt agtctggcgcattggagctaatgtcactaatccaatggcttctaagacggccacgccaccgctacttttgcaat}$  $\verb| tttagcttcttcagcagcagatacttttttaagtttgttcatgatagacccgatagaccctattagagttatttc| \\$  $\verb|tctaagtatgccaaaaatataaaaatcgtaaaccaaaataatatttttggttttgtaaattcaatgttttctg|$  $\tt aagaatgttgccttttttgggcagcacgttttaatcggccttcaatttcaagctgttgtgctgcatctttttgagc$  $\verb|ttgcgcttgcgcctgcatcaaagcaattcggtttgcatcattagcaacttgtgactgttccgcttgaatcctagc||$  $\verb|ctgtaactcagcgatagctttagcatcagtagtgttattaatctgtttacgcagattatcaatctgctcagtacg| \\$  $\verb|cagatccgtaacgcctaacgcttgctgatttaaagcctgtgttttgtgcattgttatttaatgcagcttgacaggc|\\$  $\verb|tttatagttctggccagttctagaagcacagtcataaaccattgtggcatcacgaatgtttctagctgctgaagt|\\$  $\verb|cataccattgacaccgccttgttggatgcctttataaatgtcagcaacgtcacttggaatcacgtctttaagata| \\$ tggattattgacagcatcaccgaaaccacgaataccagtaatggaatcgtattgctgttttgcctgttggatctg gttcaccatctgattgtattgctcaccccaagccaccatattttgaacagcttgaacaaggttagcaccgtcaat gacaggaatacctgtagcattggcttgaccactaataaacaaagatgaacctaaacccaaagctaacaattgttt  $\verb|cctgtattcgagctattggaattattagagctgctagaattcccttgaacacttcccccagtagtaggagtagct|\\$ tgaacacccgccccacctgttatggctgaagccatcgttggaatgttccacatgatcactacaatagttcccgca  ${\tt acaatacagagggaaactacagaagtaagaatgtcacccgcatcaaagttattagcgatttgcgtacacatgcct}$ gaaacgaaagcaaagagcatactgataattgctgtgataaagcctatggtgaaaacatagctcaatgtttgagaa agttgcagactgatttttgccagtaaatataggccagtaccaatgaagaacaataggaattgagcgacagaaaca  $\verb|acagcag| acagcagata a atacagggaaa acgccagaagctgattcagcttcttcaccta atttttgg|$  $\verb|attaaatcaccccacggaacgctcacttgatccagtaaagcacctaacgaagattcaccacctggactaacaatc|$ tgaattaaacctatggctagtccgttaatagcttcaacaacaaggattgatagactcccgcacttaaagcaatt  $\verb|ccaccaacaaaagcgatcttaaaaaacttccataaagcggtataaatagaatcttcttgtgcgccagtcgcaata|\\$ ttgtagccaatgatcaggatataaattgttgcagcagtcaaagctataggaacaattgcagaagcgatattacta ctaacacctgtcacgtaacttgctaatagagaatcaatttttgtttctaatgtagtaataattgccattgcaatc  $\verb|ccctatgaatccttaattattttgaatctgggttatatccatcgaggatatttcccgatccttttttagtttctg|$ gttttactgctttttgcggtgcagaaggatcatattcatcaagaatattgcccttttgggatgctctagccttgc  $\tt gctgcttcagttcttcttgctgttcagcagttaagtcttgaggttttaattgttgtgcagccttcacttcttctt\\$ ttaactgcttaacctgttccttatcatcagaacatgcagttgttaaagtagaaataaccaacaactagatagtg 

gcctgaaataatctgtaaaacgtcacgcatttcacctagatccattttgcagagtgcggaacggctaccctgctt  $\tt aactaaaaacatgcgtgagttttcttctagctctttaataatttcaaattcttgcggagtgaccttaaagccgtt$ aatgtcagaatctaaaacgtcacttggggattgcgtcataaagacacctagaccattcaatttacgaatagtttt tggactaccatcaatcaatgaatctgtgatgtgtaatagataagccatgattggtgtacggacttcaggatcatc taaaaattccgtgtagtcataaccaaagattggcattttggctttagaaaagtcttgagtatcgtatggattatc  $\tt aaagacccatgataaatttccgtcatgatcagcagtgttacaccatttagctaaacgatcctgaagcgaatcacc$  $\verb|tccgccatttactttcagattcatatataaaactgaaagtctgcggagttctaacggcatatcatcacgcataat|$  $\tt ggtacgaacagcctgactgatttccagatcttcggcagcattacgaacgccacctaccagaatttttacaagctt$  $\verb|ttctacaaactgaatatttgtttcagtcggtggtagctgcaacggattaaagccagttggtacaccacgctctaa||$ ggcatagtattgccccccaatccgtctaatcccaatttctgcgcccctatctttatcaaagaaaacacccttcag atttttatacttacaagcaaacatcatcatggccatgactagggttgttttacccacaccagttgttccaatgac a cac gtattacct gg catctt gt catct gtag a atctt gcttat cag gg ctaa cat gat gat taa a a gtaa a atgg $\verb|ttggccacttggagttttaaataaagctagtgcttctccccaaggattgccgtcacgcttacctcttgcgaagtt|\\$ atgaaaagggcttaaagcagaaaaatttaggcttgtgagatatgcttctcttggacgcatattaaagttaccagc ta attgcg aga accatg cacattc agga acag tatca atta cag ccattttga aacctg ctt catctga tag agc ${\tt agttctggcactcgaaacatttagagcaacttgatttggtgaatcgccaaaaatcgcaagcgtatagtgatattc}$ gcctaactggaaattcccgctattagcttcactcatagccagatcaatatcacgaatctcttgatctgaaacgtc  $\verb|ctctacagaatttagttggcctttaattgtttttaatttatctacagcatcacgcttgccataaaccgtgaaact|\\$  $\verb|ttgagtttcaatgtattcatagtttccatacaggatggaattgcacattcctgattctgataaacgtggaaattc| \\$ ttgaatatccagaaagcctacatatttttgagcttcaggatgtttgatctgtaaatagccatttttgtcaccaaa gaacaagcgactacttggaatatattgatcaagattagcctgtcttaaagggatttcttcccaaactccattagt taagaaaccaagcagattacacatttcggagtagacaaaacctttcttggtataggtcaccagacgttctggatt gtagtgatatagacttgcttcaacctgtttggctacatcatccaaaatatcgagatcccgcttaatctgcttttt  $\verb|cagggctactggatcacgactagctttactcttaaaaatctttgttaatctggaaatttcaggacgataaagaat| \\$ tgttaaatacaattcagtagccatctgtttattcttttcaccctgaaactgctgataatatctttcattaaaatc agca at a a at cattitica ta a acgc cattitaga c gtt catta act c c c c tacga at c t tatg c g t c c a a cag c cattiticata acgc $\tt aaagtgaccgccacctaaagcacgataaaaattatttaatccttctttacggattctaataatatcggcttcaac$ tgtttcaaacgaaatgccttctaatttccatgtagcaatatattcaccatttttaagcttaataacattgttgga  ${\tt aacatgattacca} aacgg cagatagtctg {\tt aaattgc} gacttcag catttgcg ctatctttaacttgctgttttga$  ${\tt acgcatgatattgttatttccttttaatttaagtggcgaaaatgagattgctccccatttttgatggttct}$  $\tt ggatctgtttccctcttatgcgccaccgcatcaatacttgctttaatcgttggtcatctacttttgttattgccc$  $\verb| aacccgctaaaagaattgctaccccgtcaccaacaaaaaggcaacattggaacgccaaaaagcatggcaggac| \\$ gagtgcaacccctgaaaattggatcagaaaattcgacattagttaatcagccaagcagcgatacccgcagcacc  ${\tt accagtcgttttagtcgttatttgcgtttgatttgctttcattattttctccaagtgaagcaattaagacct}$ agcgcattaagtaccaagaacaatatttttggaaaataaaatattgttcattggtactgtatatttaatatatta

tctgtgccgttagttaagaaaaatgaaggccgtttctccactactggaaggctttgaagttctgtattttcggta tatccactggagttaggcatatctgcattagtagcaaaatatgcaagctgttccgagctattcataggaggtgag ggaggattgaattttacaggcatggtattgagtgaaccattagcaaaataattcaaatttcttgatactttcgct  ${\tt acatacccatttctaaatcctgatgaatggttgccagtgttatagcaagacatagctttataaatatctttgcct}$ tttgccctatttcggcagtcattaaagataaattgcattgcgcttagattggtgcagggatcaaaaacttgctcg  $\verb|acacta| agattt | agtcttt | ttgaaatta| gcactatta | atttgagcaa | acacta | acata | acacta |$ attaattttttggccatagatacagcttcttcatagctagtcggctgttttttaagacctgcggcacgattaacc  $\verb|cctatcgcaaaaggattaaatgaggattcagatttaacaattgcagacgcaatattcacatcaacttgtggcgca|\\$ cattgttgtgccaaaactacgaaatcaatcattactttttcacctcaaatttttggcttacctttttgatctggat aagtageggageacccatttttatagttggtacacccccaaaaatagccatttgccccattgatccgtcttaaat $\verb|cactggcacattgaggacatgaatagacttcaagaagtggctttttattaacttcaggcaaaaagactttgcaat|\\$ ctgtttcccgattgggacagaaccagatcggatctttaccttcttttttggatctgaataatggcgttgagcatt tagggcaaggatatttgattttctctactggctgacctttcttgtcgtccatagagtgcttacattcctgatcat  $\verb| aatgaata| actttttcgactggtttacccttgtcgtcatccatagagtgcttacagtcctcactgctaca| aatcc| \\$  ${\tt aaaaaaaattgattggttttagtattcttaaatttctttaactggcttttacactttggacaatgtattgcgttta}$ tagctgtaagttttgaagctgtacttagctcttgagcaagttgagtgtataaggcagaaacaaccgaattatatg ${\tt aagtttcaccagatgcaattttatctagctgcaactccatctcttttgaatagtgcagatccagaaagctaaact}$ tagctttcaacagactaccaattagatcattccctaatttagttggttttaagactttcttctctacctccagaa agcccttattcaga at attggccat gattgatga at aagtagaagggcgacca atcccgca actttcca attttttaattagtgaagcttctgtatagcgttttggtggcttagttttgttttgcaataacttcaccgctttcaatatcaa  $\tt aaatcatccacccttttttttattaactcacggcttttagcatggaacttatatttcccatcttcagacagtaatt$  $\verb|cca| a a gta a c g g c t t t a t a t t c a g c t t t g g c c a a t t g a c t t g a a a t a g t a c g t t c c c a a a t c a a t t g a t a t a a g g c c a a g t a c g t t c c c a a a t c a a t t g a t a t a a g g c c a a g t a c g c t t c c c a a a t c a a t t g a t a t a a a g c c a a g c c a a a t c a a a t c a a t c a a t c a a t c a a t c a a a t c a a t c a a t c a a a t c a a t c a a a t c a a a t c a a$ ctttttgttctggtgactttcctagatctttatcaattatgtgaacaggtcggattgcttcatgggcattttgcg  $\verb|ccccatctttttccttaaacttattaggcttttcaggtaaagaaaattgatgttcattagcataagcaaagattt| \\$ gtgctgcttttggttgtttgttgagggctaaagcctaacgctacactagcagcttgtaaaagtagggctgtagaga acggagaaggagcatttgaatactctgttttttcagtgcagtttaaaaactttaactttcttagttttttgcaactt cttcagctaaggaactatctaaaacataaggctgatcctcagttacaaaatctgttgtaacccattgcgagatcc atttttttaggctctttatcaaaactcaaattaacgccaaagtggttagtaactttgaatttctggatttcgattt  $\verb|caataggggaaactagatagcccaccagacgatctaaagccctacgtgcttcttgagcatatacaagctgataat| \\$  $\verb|ctaaaccacgcccattattaatggcttctttaatagctttttctgaaatctcattaaattctattcgttcaaatt|\\$ gaccatcttccagacctaaacattcttttaaatgccatgaaatagcttcaccttccctgtctggatcggtagcta  $\verb| aataaatcttgtctgctttattcaaaaaggcttttatttttcaatacgtttttcgccaccgtcaaaagttctgt| \\$  $\verb|cacta| act ttggcatcaggaataaatgaatattccattgcaaaatcattggctatatcaatacctaagccttttc| \\$ ttggtagatcccgaacatggccaacactggccacaactttaaaatcagatcctaaataacttccaatttttgaac atttgttaggagattcaacgattacaagattcatgggttatttccaaattgtaaaatttaggaaactcgaaagcc  $\verb|cacaaagaaaagatgaatataagaaagcaactacttgaaatttagtgaaatctataaggatttctaaaagcagtg|$ catcttgtggcatgaagcacacaagataaacacatgaaataactagaaaaaattttaaaaaaatttccatatttat

ttaaacttatagccattttcttaaatcccatcttagagctttaaagaatataatccaaaatataccatattggaa ttaagcctagtcagatccttaaagatcctagctttatctttttctcgtcttgttgttaaagtccaaaccttttgg tgtttattagattcctctagcaccacctctgaaatagaaaaatcaggatcaatatttataaaatcagtcatccat  $\verb| aaaaccttttaaagcacccataacaaaggtgcattatgatcaatttaggtaatcttggtaaagttttttaaataa| \\$ tttaaagaaattttaaatattttagctaaattctgctttagtcatgactaaaaacctcgatgcttggataaaaagc tgcagcgtttatccaggcatctatattacctatctaatccagatccatagcagacatatcagagcaaagtgtcta  $\verb|ctttgcgaactggcgcaatcagttaaatttacccttccctgattaccgttgattttcaagcgagctttaaaaagc||$ tgtgctttttaaatggcgaccgcagaaaataaactgctcccatttgatttagtagcgggatttaaatagtacata gcatgaggttattaaaagggttataacctcacgttaaaacatactattgcaatgctactcctcataaatggcgac  $\verb|tcgatataagtagtaaattatttgaaaaggacttaatatccacctgtggacatttattaaattggataagttatg|$  $\verb|actgaagaactaggaacagaaacagaagcagaaacagaaggaaaggtattagatcgcagaaaaagatatagaaaa|$ aagcctactaccaaaactccactatcagtttatttcaatatggatgttcctgaagatgttgaagcattggaagcc  $\verb|ttagaatatttaaaagatatttatggcggggaaaaacaaggaaaaagtgtagcagtcaaagaagttttaagaatt|\\$ aactgtagtgactaacttgtcatctacataaagataaactcttttattatgtgtataagatgaaattttaggttg  $\verb|tccttctccccctccaacagatccatcttgattactgctgacgaatgaacagtgaggaaagcctttacctttagc|$  $\verb|tttatacacaag| tagtcactctatttagatgagttttccagtacgaataacttgccttcaaagtttagagatatt| \\$ gttttggcattgctgcacattgaataaatctcttgaatcaagaagggtaaattccgtgtgaatcgaatttttcct gcaagcctataactatacgttttgtcgctataactatacgttttgtcgctataactatacgttttgtcgctacaa ctatacgttttgtcgctacaactatacgttttgtcacatatctatacgttttgtcgtaaataatccacaagctta tattttttgcgtattttttagccttaatccatgctgcactctcaaaactatacgttttgtcgcaacttccccgcat attcttgcaaatctaataagttattgttttatatgaataattatattaaagaacgatttttattttttggtgcta agttataaatattcaaaattgaatattttttatctggtttttgtgttaaaaatagccatacgttttgtcgcatcg gtaattttactgatttttaataaatatatattttaaaaacaatatcttataatcttagttaataaccatacttga taa atatacttg tatagttata at gatttca agagga at aacggatttaca aa aa aatgcaga aa attattggct $\verb|cacaaggcttagaggactatacacaatcaaatacaagggcaaaattgaccgatttagttgtgacccgcaatgatt|\\$ 

atgagcttcaaaataagacctcaattactcatgacgacttcatttatgtgagtagcgaaaactttggagaattga  $\verb|cttcccca| atggctaga| aggaagtgcttacagca| acagataaacgtgaaattcagagaaatgctgaaactgctt| acagagaaattcagagaaatgctgaaactgctt| acagagaaattcagagaaatgctgaaactgctt| acagagaaatgctgaaactgctt| acagagaaatgctgaaactgctt| acagagaaatgctgaaactgctgaaactgctgaaactgctagaaactgctt| acagagaaactgctagaactgctagaactg$ taaaacgtatttatacaaaatttgataacccaactatgttggttaaagatggggaatctgacgaacctgctaaag aatatttctatgatctagttaagaaagtagatgaaaaactaagtcatttagtagccatgaactgaagcatatta  $\verb|tcttatttaattcgagctattcccttcgtttgtataggatcttaatgagctatatgtggcgtacatcagaggtca| \\$  $\verb|ctattgatctggaagaattaagatggatgcttgaatgtgaggataaatataaagagttggccaattttaaaagcc||$ gtgtttttgaatgtagctcaggatgaaattaacgaacttagtaatattaatgtcagttttgagaacgtaaaaaatg  $\tt gaaaggaagtagttgctattaagttcatttttaacttgaaaactgaatataaagagcaaggacacatcaaattta$  $tagata a a atga a a agggct at \verb|ctggctgctgctaattccatttagtgatgatggatcacacttta| agcacctg| \\$ atcgtattaag catttcaaacaaccagtaaaag tatctccaaag caaatcag caccttag taaattgcaaag aattgcaaag aattgcaaag caccttag taaattgcaaag aattgcaaag caccttag taaattgcaaag aattgcaaag caccttag taaattgcaaag caccttag caccttag taaattgcaaag caccttag ca $\verb|ttttactagattatggatatttcttaggtaatttagacgaggatacttctaaggtaatcatgagaactctattaa||$ ggattattactaatagcaataatgataagaaggacgatcaggacacagactatcaggattaatatctaaaaagca tacccaccatattatcttaaacagacttcgctaatttaagacaatatggtggttcaatttaaaaccttcaaaaac  $\verb| tcttattaatctatataaaaattatcttttctgttcgcatccaaatagtaaaatttaataattagccagttaata| \\$  $\verb|ccttagtcatgactaaatatgtatgtttagcctaagtggaatattttaccatttttttagaatattaatttacac| \\$  $\verb|ccatataataaaaaacaataacttaatcttaatgtttcccaaaatttggccaaacctgtaatattttgtcaataaa||$  $\verb| tttagtttgataagttttaagttttttgccttaccctacccctaaattttttagttttctatgctatctg| \\$ gtcgccacccatgcgggctggctttaggtatcccattttagatcaaaggggagcagtttattttctacggtcgct tagttcgcaaagtagacactttgctctgatatatcttcatgggatctagtgcatcattttccttagtcatgactaagggggaaacaatttttcatcttgcgtcctttaagctcattttagcgtgttttttggggtttggtgtggggtattag  $\verb|acata| aggtgaaaaaaggctgtcagcagcctaagaattgaaaatataagcattataaaagcagaccagacaaaat|$  $\verb|caggtggactgatataatgattttatcaggacgcatcgggcgacctgaaataaaacaggtatttaaacatgaaac| \\$  $\verb|attttcatcagttacatcattagacgagttaaaacttcagtacaaaaaactagcttttaaaaaatcatcctgatc|$ gtggcggtaaaaccgaagtaatgcaggaaattaacagcgaatatgaacagcttttaaatcgtattattaatgaag  $\verb|catca| a a a gatca gtatca| a gatca gatta coga a a a togatcg togatca to togatca a gatca gatca$ ttgagaaaaaagtaaaacaggctattgatgcaattatcaatctggatggtttagatattgaaattattggcgttt gggttttgggtttctggcgacactaagcagcacaaagaaaaattaaaagaagcgggttttgtctggaatcgagtgc  $\verb| aatgtaaatgggtgttcattggtaaaaaatccaatggtcggggcagaatgactttagatcaaatgcgagagttac| \\$  $\tt gaaagggggctttttttatcaatattcttagtcatgactaagatttctattgaatgtccacaggtggactgatat$  $\verb|atttacaa| actatectac| aggtaa| actggtte atttttgeggte atgaggttttaaetggatetaaetataatat|$ ctggtttccaatctttgatgaaaaaacactattccaagaaattgaaaaaatcatgatgaattgccgagtagccca  $\verb|caatgttactcatattgaaagaatcagaaggggcaacaatgaaaacggttattttgaagattatagaatcactta|\\$ taacttagctgtttaaggcaaacctcccataatgggaggttttttattggggggcaatttttttggtttttagctt gtctaaaaaacataaaaaattgtctatctgttctgctttatatacgctcattttggcctgtttaggtttgtgctg ggataaactaacttcatatataaaaaaggctgtcagaagcctaagaatcgcaaataagaacatctgaaaagcagt ttagccaggtattaaaacagatatttttctactcaattttccctataaaaaattagtcatgactaagcttttgct

tgaaagtccacaggtggactgatataatgattttatcaggacgcatcgggcgacctgaaataaaacaggttaaaa  $\verb|cttagtcctaaattagatggacttgcaaaagaacattataagcatcctatctgcttcacttctgcgctttgggcg| \\$ gtagttgataaggctgtaaaaaatgaaaaatggcttaatgacttagagggcgttattcatgacattttatggatg agccgagcatataagacacccctaagccctagtgcggtacgtttttacagtgattatcacaggcgcaggtcgcaag agaa at catattt tagaatt g cac g tacat g g t g g agat caa g g agaa acc a g t cata a caatt g g t tat c c t g a a g agat catatt t tagaatt g cac g t a cata g g agat caa g g agat caa g g agat catatt t tagaat t g cac g t a catatt g g tgatttttaatttacgtcctccctttatgggaggatttttttatgataaaaacttagtcatgactaagaaaatgc  $\verb|ttgca| at \verb|gtcca| caggttgga| cgttaga| at at acagca ta aggacgca| at agggcga| ccctta at aagccat ta aagca ta aggacgca| cgca| cgca|$  $\verb|ctaggtgaaatatgaaaaagttgttgcttcaaatcaaaagggcggtgtggggaaatctgcaatcatttgccagt|\\$  $\verb|atgcacactatttgaattctttgggcttacgtgtattagtcattgatctagaccaccagaaaaacactacaaaag|$  $\verb|ccttgattactggcggggctgtgactgtagctaatgtatctgctttcgacatgctgactaaagaagatcaaacta|\\$ tttcaaatcctgaaggctttactttggtacaagcaacaccagaattaacagctattgaaaaaaatggcactttgc  $\verb|cca| atcca| atcccg| a cattcg| cca| agtggcttcattg| attgttagtg| actatgttcta| agtcca| attca| gttga| actatgttcta| agtcca| attca| agtcca| attca| agtcca| attgtt| agtga| actatgtt| agtga| agtgct| attgtt| agtga| actatgtt| agtga| agtgc| agtga| ag$ at cagga agct at tgacgg cat tgg tgg at tactgaag cag at cca agca at taat caa aagct aa accca a at taggacg agca at taggacg agcataaaattaatcggcatccttccgaatattgttgaaccaactccattccagaaagacaacctaaaagctattgttcagcatttttcaaagtacctgatcaaaaactcagacggtagctatgctttcgttaaaaaaacgactgcaatcgctg  $\verb|cag| \texttt{tttttgaaagcattaacaagtttattggagatttaaggaatgttagatttatcagcttttggaaggtattgatcaggttttggaaggtattgatcaggatgttaggaaggtattgatcaggatgttaggaaggtattgatcaggatgttaggaaggtattgatcaggatgttaggatggatgttaggatgg$ taggta at cct g cac cagtag caga cggaa caccta a a cagat tc cactta cagat at tctt g a agat ccagat cagat $\verb|ctattagtgttaaaccccaaccagaacaaggcaagtggatcatcaattatggagctagacgttttagagctt|\\$ cagtgatggctggcaaggaaactatccctgcttttgttgataatgatcatgatgattatgatcaggtcatggaga ataaagaacgccttaaccattcacctattgagcttgcacttttcatccaaaagaaaattaagcaaggcgagaaga  ${\tt aaaacgtaatcgctaaaaagttaaatgaagatcctgtttttatttctactcacctagctttagtggatatgccag}$  ${\tt agtgcttatctaaggcttatgatgcaggttttaaatctccaaagactttgtatgacttacgcaaactttgggaat}$  $\verb|cattccctgaagaagtaaacgcttgggtggatgaatctttagagaatggtcaagacattatcagatcgaaagtac||$ aggctctatctaaaaagttaaaagaacctaagcaagctgaagcgactgaagcagatccagaatcagaaccacagg  $\verb|cgcaagaaaaccaagagcaaaccgctattattgatgataatgaatctttcaattttaatgggaatgatcaagctg|$ aagcgactgaagaacttgaagttaaaaaactgatggatcaatcgaaccagaaagagcagccagaagctaaagaag  $\tt aagatccagacaaaatcaaaaaaccgcttttagttgttattcatgacggcagacaagcgaacctgatgcttaata$  $\tt aaaagccttcttctttgggttttgcatggatcaaatacgaagatggaacagaggtatccgtagattgcagcagcc$ ttgaaatcgagtatttacaagaagcctaaacctaccaatggaaaaagaccttgctaatgcaaggtctttttttgg at a a t c t aggg c aggat agg c ag t t a a a a t t g c c a t t t t g t c a c c c ag t t g a t aga a t g g g a t a ag c a a c c a g t t g a t ag a t g g g a t a ag c a a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a t a g a c c a c c a g t t g a c c a c c a g t t g a c c a c c a g t t g a c c a c c a g t t g a c c a c c a g t t g a c c a c c a g t t g a c c a c c a g t t g a c c a c c a g t t g a c c a c c a g t t g a c c a c c a g t t g a c c a c a c c a c a c c a c a c c a $\verb| aatattactttgcttatggaattaatcatgactaaagacaataaaatctttttcagagttgatcgggcagtgctt| \\$ gattggtgggaagcaaagtgtgaaaaacagggaattaagaaaggcgcacctttccaaaaaagcgttagaactttct tatcaaaaagagaatgatccagaatattcaggacaagatttttccttgaatcttgaaaaggacttagccgaaaaa atctat catttag ctaag tttgaag aag tag atccag acctgataaa aaaaa atgat caag gaa aag ttatctag commence of the same ofgaaatagaaaaaacgcaagacgttatagatgtatttgaaaaaaacatcacgcaaagaattacggcttaaaccaagt gctaatgtcacaaaagattcaatattctttagccaggaagaagctcttaaacttggtgaatcaaatagtcagctt

ttggcgattggtagaaacctaaaccaaatggctaagaatatgaatcagggtatttatgaatcttacgatagagaa tttgtcgagcgagtccatcagctagtaaaagctcaagttaggcatgttttcactctattagagcgcaataaaaaag agctactta atggatcta a agttaggcgtgtta atcagaccca a agtttagatactttttta aatgacctgtcta $\verb| aaaagacccctgaagtaatggtcaaggttactggtggaggtaattctatgggtaaggtgaaagctcacatgggat| \\$  $\verb|atatcactcggaatggaca| \verb|atatcagggacggaattgatcaggacggaaataaagttaatggtaaggatgatatagaag| \\$ ttgtattatctatgccgaaaggtacggatgaaaaaggcgtttatgatgctgcaaaagaatttgcagaggaacatt  $\verb|ttaaagaccataaatatatgatggtgcagcatacctttaccaatgacccttcaaaagatccaagtgaaaacccgc|$  $\verb|atgtgcatgttgttaaagctgtttctgaaaaaggtgatcggttaaatattaggaaggctgaccttcaggaat|$ ggcgagaaagttttgctgaaaaattaagatccagagggattgaagcgaatgcgacaaaacgtatagctaggcttc  $\tt aaaaaaaatagaagtgataagcagttaaacaaatgaaagagcagggcaaatcgtttaagcgatatggtaaaa$  $\verb|ataaggccagtccagaacgtgtccagaaagctaaacagcaagaaaaagaagcattgacgcattacaaggaaatta|$  $\verb|ctaaaag| \verb|ctatacag| tcaccag| atccgcaag| atagaaaactagcag| ttgatctagtggactatttacggaaaa| atccgcaag| atccgcaa$  ${\tt aggtagaagttaaaaaaccagtgccacagccacagattcaacctaataagctagatcttcaacacggaaagaaca}$ aggggaaagagcaagaccgttaataatataagggaaggataaggcgcaatactgtgctttagtgccctttaaaaaa $\verb|tcctta| at tttctgagtgggcataccta at ttaaacatcctattaagctcagaaattgcatattttaaatctttt| \\$ t caggtatat g cttaacat caaaatat t caatt t g g ccaaacct a g ctt tatataat g caatt c g tt ctatt ct g ${\tt tgtcgttgcatctgcactgttgacgacataattcgatccattaaatagaataagtaatacgatgtgatctgcata}$ ctgtctttaatcataaatccatgattttttgtacttttatagtcatatagtgtttcatcaatacaaatatctgca  $\verb|tctatcccacctagtgcaacacggatatttgcagaatatctgggattgtatgtgatcagactatcaggcttaata|\\$ agaccattcttaatgaatacattatcaaaatttttgactagggaagatatatcttcataaaccactttctccgtt ggttttagtatgtctttctttgttgctactggtagaaatccagatcgccatagattttctaatttagccaaaaga at a attecacca at a a attect teatt tag tteta a atteg ttt g atttatt agc cag tag a a attetat g t g atttatt agc cag tag a a attetat g t g atteration and a similar accordance of the similar accordance otgaattttttttatacaataccaaaatgcttttgtttttagttttcctctagaaagctgataattttaggctgctca  $\verb| aattccttagcactcaattcagtattcgtgtagtacgcacaaattattttagataagtagtcaaatgctgtacca| \\$  ${\tt accaagectgaatcataactactcgttaatttatgttcactcataacttcataattagtaaaaggaggaatacca}$ ctgtaagttttgaaatctttttttttggggtgcgacactttttataatttcttttacttctttgcacttaggatct gaagatttcagtatcgacattaaagacatattttatactctttatccatatagttactattcaaacaattttaaa  $\verb|actgcttttgggaaaatttttccattacagccgacccaataatttttttatctgcattaaagaaaaatatctcta|\\$  ${\tt agtcataaggtacattgaccatattaaaacaggtataaatcggcttgttccacgtaaagactaacggctttaatg}$ agggattttctttaaaacctatttcttgatcatgttccctatataggtacagagctgttaatttttttccgttaa ${\tt agctaaacgtctttacttctttatcttgatcaaagtaagggttgtaaacctgtttaaaggccataacagacacta}$  $\verb|ctattaaaagagctataaacgctgcatattttaatttcaattcctgttattcctttttagccaggttggcaagtcac| \\$ atgaaaaaaaattgtcttagtcatgactaattatttaacactcataagttgatcccatttaaagtaattgggaga  $\verb|cagcttattacgtgacatattccaatttctatcaggtagcatactggcacctaatcctattttgctcttaccaaa| \\$ tttattttgtatatcatctagtgaatccataagtttattacttgattctactttatccatgtccgtgaacaggtc ataa atat gag tag cttt ag gttc aa gac aa g t gag gat cact cca catttt ttt gaat cca at attctt ct gat a side of the contract oftagctgatcaatcattgatgtagcaattttagaaagtaataagctattgtctgatgaatctggtaaagcgtaaga cacagatttattataaaaaaggttcagaactatcgaatggattagattgaacaaaacaaataatacagccacatag

taagttttcacttcttaaacgacttactgcatccaggacataaagagtaattgcttctttaagatcctcacggct ataaactttttggccaaaggaacggcttgcaattatttgtttttttgattttgggttttgctcaatttcaatgca  $agaa attecct \\ gta attect \\ aatt \\ gt \\ gt \\ gt \\ gt \\ gt \\ gact \\ ata \\ gagaa \\ att \\ gat \\ ctt \\ ta \\ atte \\ att \\ gag \\ gt \\ gaa \\ gt \\ ta \\ att \\ att \\ gat \\ gat$  $\tt gcaaacaaaatctaaaactgtattaatgcttaggctattcagctttttagtatgctttcttccaataccccatac$  $\verb|cggcaaacctagccaacgtaagagccgatctagaattaaatgagcataggcagttaaatcataatttgaagcata|\\$ ggcagttaaatctaaaaaacattcatcaatagaataaatttcttgttcttgaggtgtaacaaattcagataggac ttttataaatctgcgggacatttccgcatatagagcataattactcgaaagaactgtgatgttatgttgctctac  ${\tt aagatccttgagctgaaaaagaggtacacccatctttatacctaaatttttagcttcctgtgaacgagccacagc}$  $a \verb|caaccg| t cattat tagata a tactg gtt tattat tatt cagg cttg gatta a agaca cgtt caca a cttactg size of the contract of the$ at a a cagttat ta a t g t c t a c ca a a g ca a a g a t c t t a t t t t c c a t g t a g a t t a g a c ca a t a g g a t t a g a c ca a t a g g a t t a g a c ca a t a g g a t t a g a c ca a t a g g a t t a g a c ca a t a g g a t t a g a c ca a t a g g a t a g a c ca a t a g g a t a g a c ca a t a g g a t a g a c ca a t $\verb|ttatttatgtttcctaaatggcttaatgacaaaggtcacgacaccccatattaataattcttggcaatcattaag|$ gtgaatatcgtcataatctggattttcagctttaagccaacacttatcaccttcaaccattaatcgcttaacggt  $\tt gaa at cattg t ca atta agg ca at a a ca at atcttc g tg ttt agctt ca agact acg at cc act aga agct catc$  ${\tt atcaatttcaatgcctgcgtcacgcatggaaagaagaagcaactttgacaacaaatgttgcagcttcatttttcac}$ a aggtgtt catt catat cta a agttttat caatat a at cct gtgcgggag agggggaa accag cagct acttttt catat consists a substitution of the consists and consists are consistent and consists and consists and consists and consists are consistent and consists and coaga agc caa agga at a cgttta a at gtt gt aggatta at ta aggta at aga agc cac at cattga a agta gg ctt aggat $\verb|tttattgcccgctaagaaatttttaatctctacaatacgcgattctggtacacgcatagtcttagttggttcatt|\\$ at a a attgcctttcttcctgaacctttcctataaccaccttttgtattcgcattcataaaagcccatttgattttgtgacaaaatcaaataataattagcctacaagatagacaattaaataatgatgaaaggtataagattttctg  ${\tt acggtcggcactttcaaggtgaaatcattctttgggctgttcgttggtattgtaaatatggcatcagctatcgtg}$  $\tt aacttcaggaaatgttggccgaacgtggtgtgaatgtcgatcacaccacgatttatcgctgggttcagcgttatg$  $\verb|ctccagaaatggaaaaacgtttacgttggtattggcgtaatcctacagatcgacatttatggcatctggatgaaa| \\$  $\verb|cttacgtaaaagtgaatggcaaatgggcatatctataccgtgcagttgaccaacgtggccatactcttgatttct| \\$ atctttctgctagacgaaatacccattcagcttattgttttcttggtaagattttgaatcatgtcaaaaaatggc ${\tt agtgtcctgaagacctggagcatcgacagattaaatacaagaataacgtgattgaatgtgatcatggcaagctca}$  ${\tt aacggatcatcaaggctacgttgggattcaagtctatgaaaacggcttatgccacaattaaaggtattgaggtta}$ tgcgtgctctacgcaaaggacaagcttcattattttataacggtaatattctaggagaagtttggctagtaaata gagtttttcggtctctaagcttttttgaagggaaaatcatcgactcagatccctattttgcaacagtgcctattttt tttggtgaatcgcattctgactggttgcctgtcagaggcggagaatctggtgatttttgtttttcgacgtggtgac gggcatgccttcgcgaaaatcgcacctgcttcccgccgcggtgagctcgctggagagcgtgaccgcctcatttgg  $\verb|ctcaaaggtcgaggtgtgcttgccccgaggtgatcaactggcaggaggaacaggagggtgcatgcttggtgata| \\$  $\verb|acggca| attecgggagtaccggctgatctgtctggagcggatttgctcaaagcgtggccgtcaatggggcag| \\$  $\verb|caacttggcgctgttcacagcctatcggttgatcaatgtccgtttgagcgcaggctgtcgcgaatgttcggacgc| \\$ gccgttgatgtggtgtcccgcaatgccgtcaatcccgacttcttaccggacgaggacaagagtacgccgcagctc gatetttttggetegtgtegaaegagetaeeggtgeggetegaeeaagagegeaeegatatggttgtttgeeat ggtgatccctgcatgccgaacttcatggtggaccctaaaactcttcaatgcacgggtctgatcgaccttgggcgg  $\verb|ctcggaacagcagatcgctatgccgatttggcactcatgattgctaacgccgaagagaactgggcagcgccagat|\\$ gaagcagagcgcgccttcgctgtcctattcaatgtattggggatcgaagcccccgaccgcgaacgccttgccttc

tatctgcgattggaccctctgacttggggttgatgttcatgccgcctgtttttcctgctcattggcacgtttcgc aacctgttctcattgcggacaccttttccagcctcgtttggaaagtttcattgccagacgggactcctgcaatcg tcaagggattgaaacctatagaagacattgctgatgaactgcgcggggccgactatctggtatggcgcaatggga ggggagcagtccggttgctcggtcgtgagaacaatctgatgttgctcgaatatgccgggggagcgaatgctctctc  ${\tt acatcgttgccgagcacggcgactaccaggcgaccgaaattgcagcggaactaatggcgaagctgtatgccgcat}$  $\verb|ctgaggaacccctgccttctgcccttctcccgatccgggatcgctttgcagctttgtttcagcgggcgcgcgatg| \\$  $\verb|ccgtcggtctggtcggtgaagtgggctttggcgccgccaatatgttctacgatccggctgacagagacgaccttt|\\$ gtctcgatcctagacgcattgcacagatggcggacgcattctctctgtgcgctggacgtcgatccgcgtcgcctgc  $\verb|tcgaccaggcgtacgcttatgggtgcctttccgcagcttggaacgcggatggagaagaggagcaacgcgatctag|$  $\verb|ctatcgcggccgcgatcaagcaggtgcgacagacgtcatactagatatcaagcgacttctcctatccctgggaa| \\$  $\verb|cacatcaatcttaccggagaatatcgttggccaaagccttagcgtaggatttcgccctctcccgcaaacgacccc| \\$ ataaaaagtaaattaataatgaaatatttgttttttttactcagggtgaatatgattgaaaataactatcataaa at a act at g taacta a acgac tee cetta e ct g et t tat e g t tea acge e g at g t tat g at t g e acgac ag t a acgac e g at g e t tat g at t g e acgac e g e acgac $\verb|cttgggtaaaagaggcttattaattgcgataaaaataaagtcctatcaacgttattaagagcggacaggactttt| \\$ atgatctttata atttctagtatta aggggttga aataa cagctttaggtgtgtttttcttttggtga aaataagtata a ata a agg caa ata a agg g g acca at g at c c c g g ta a tat t g g t t agg c t c acca g a g t a c c t g t a a t t c c g g t a c c t g t a a t t c c g g t a c c t g t a a t t c c g g t a c c t g t a a t t c c g g t a c c t g t a a t t c c g g t a c c t g t a c c c a g a g t a c c t g t a a t t c c g g t a a t a t c c g g t a a t a t g g t t a g g c t c a c c a g a g t a c c t t g t a a t t c c g g t a a t a t t g g t t a g g c t c a c c a g a g t a c c t t g t a a t t c c g g t a a t a t t g g t t a g g c t c a c c a g a g t a c c t t g t a a t t c c g g t a a t a t t g g t t a g g c t c a c c a g a g t a c c t t g t a a t t c c g g t a a t a t t g g t t a g g c t c a c c a g a g t a c c t t g t a a t t c c g g t a a t a t t g g t t a g g c t c a c c a g a g t a c c t t g t a a t t c c g g t a c c t t g t a a t t c c g g t a c c t t g t a a t t c c g g t a c c t t g t a a t t c c g g t a c c t t g t a a t t c c g g t a c c a t g c c c a c g a g t a c c t t g t a a t t c c g g t a c c a c g g c c a a t c c c g g t a c c a c g g c c a a t c c c g g t a c c a c g g c c a a t c c c g g t a c c a c g c c a c c a g g c c a a t c c c g g t a c c a c c a g g c c a a t c c c g g t a c c a c c a g g c c a a t c c c g g t a c c a c c a g g c c a a t c c c g g t a c c $\verb|tcccttgcgcattatcatcgacagattttgataaataaccttgtaatgcgggttgccccatacctcctgccgcta|\\$ agcaaattaatgctggtaagatgacccaaacgtggcctatccacgctaataataaacagcccatcatatcaatag tatgtaatacacccagaaccgccaaagacataccgatagaagttgtgttccaatcaaaacgatattgtgtaaaca  $\tt gcacccagatggtggcaggaatttgcccgataagctggataataaaataggttgctaaccaaaagtagaggcttt$ tettaaaaaaaacagtgaetgtatttgaggeagtttggtttteaggtgteetattggeaacaagegettetettt tatgagcactgatatcacctaataatccccctagcattgggccgataataaggccaacaccaaaagcaccaccta agaaaccaaaatagcgagttcgatttttagcgggagtcacatcactcatcgctgatgcacatacggcacctgttg  $\verb|cgagtgccgcctaaaaagggaaaacagcaagatgggttttctgccgtatttatcagacagtcgtcctagaatag|$ gagcaaaaataacctgcatggtagcatagagcgctaatagcacaccgtaatgggttgccagtgaattttcactga  $\verb|caa| atteattta atagagtagggagtactggcatgataagecegataceaatggcatetaataeggtgateagea| \\$ gtataataattaattgatttattcattgagatcctaaaaatctatcagtgatagagtgggtgtaaaatatctctat atgcgttgattttacttaatgaagttggtattgaaggattaacaacgcgtaagctggcgcaaaaaataggtgtgg $\verb| aacaacccacattgtattggcatgtaaaaaataaacgcgctttgttagatgcattagcagaaactattttgcaaa| \\$ agcaccatcatcatgtttttgccattgccgaatgaaacatggcaggacttttttgcgaaataacgcgaaaagcttcc gccaagccttattaatgtatcgtgatggtggcaaaattcatgcgggaacacgcccctctgaaagtcaatttgaga  $\verb|catcag| a a cag caacta cag tttttgtgtgatgctgggtttagtctatctcaagccgtgtatgcattaagctcta| \\$ ttgcgcattttacattaggctccgtactggaaactcaagagcatcaagaagccaaaaagagcgtgaaaaagtag agacggatactgttgcctatccgccattattaacccaagccgttgcaattatggatagtgataatggtgatgctg 

gctgacgcccttttttggctaattagttgcccttgtatgtcagcgataccaatgtgagcaatacaacctgcattaa  $\verb|attgta| a tagtcatcttcg | attgta| a tagtcatattctctgg | catcatattgcagtg| | attgta| a tagtcatcttcgatgcatcattgcagtg| | attgta| attgta|$ gtgagtcaggctcaatagtgccaaaagtcagtgcaacacctgttgttctacttggaaatggctctcttacactaa  $\verb|attgtagctttcgatcactccagctaaaagccttgtaatagagggtgcgaagcttctcctgtaattgccatcgcac| \\$ cagcaagaatagattgaaaccacccgttgatcccaatcctgttgatacaataatgcctgatgaagattgcactt  $\verb|cta| at a a ggatt gaccat catt ggtt gtt gctt gt gcaa a a gt gaccgtt tta a a t gg catt tt ttatt a t gg$ tgttaataactgtctcttttaattgccctatttcaaagggtaataatttaccatcccaccttgatggatcaggat ttatggcaatgataggctgtccattaaggtatttcagcgtattggcaacaagcccatcttgaccaatcaccacca  $\verb|caatatcgtgaggtgagaattgatagctgggtaataagcctctttctaaaagttgaaatcgtcctaatgatttta|\\$  $\tt aaatcaactcagcttctgtgagttgcttttgatataaattgtgttcattgagataatcctttacctcaacattgt$  ${\tt aggtgtgatattcaactcgccgatttttcctgaattcagtgctaaggtttcaaattgccattgccattaattgttg}$ tgagtccatttttgctaatgccattgcttttaggttctcaactggtaattcacgataagcacgcatggtagcttc  $\tt aatagcataagcatccgcttctgattgtgttcgctgattttcagcacttaatgcgactagttctttgcgttttgc$ taaacgtgcttcttcaatctcttggcgtttacgttgaacagataaatcggtttctaattcagcctctttaatggtgcgctcttgttctactgagaatttacgacgagcataaatggcatcgtcggcttctttcagtaaggattctctcgc  $\verb|ttcagcttctagtgcttttaaggtttctggtgatggtgattgccgctatagagacatctaaaatggggtcgtt|\\$ tgcgggaggggggggaatcctacgctaaggctttggccagcgatattctccggtgagattgatgtttcccatcc gagcggcgaaacatgggccaagagatcgggcgatagcagctttccatcgcgtttctggtttgcaacgacctcgcc gagetteatggtgtteeagaagatgatgatggeggegageagatteatgeeggegatgeggtaatgetggeette  $\tt ggcggaacggtcgcggatttcaccgcggcggtggaagctgattgcccgcttcagcgcatgatgagcttcgccttt$ gttgagcccgatctgggcacgccgttggagttcggcatccagaatccagtcgatcatgaacagggtgcgctcgac  $\tt gcgaccgacttcccgcagggctgtcgcgagctcgttctgccgcggataggaggcgagtttccgcagaatctggct$ tggcgcgacggtcccggcagcaatggtggcggcgatgcgcaggatgtcgggccaattgcgctcgatcatggcttg gttgacctttccgccgatcaacgctcgcaggtgcgccggggcggccgacggattgaacgcgtagagccgtttgga tggcaggtcgcggatgcgcggagcgaaccggtagccgagaatggcacatgcggcaaagacgtgatcggtgaagcc gcccgtgtcggtgaactgctcgcggatatggcgtccagcatcgttcatcagcaggccatcgaggatgtaaggcgc  $\verb|ttcgcttgccgttgcaggaatcacctgggttgcgaacggcgcatattggtcggagacgtggctataggctttcag||$ gcccggggtattgccatatttcgcgttgaccaggttcatggcctcaccttgctctgtagcgacgaagaactgtcc gtcgctcgaagccgacgtgcccatgccccagaaccgggccatgggtaacgctgcctgtgcctcgaccaccatggc tgtcgcatccgccattttgcgcaagccgaggttgatcccttccgccaagataacgttcattagcccgatccggtc agg cagg gt g ctcct gt g cg cag at gg gt g aac g cttcg gt g aag ccg gt cg ccg cat ccacct ccag cagg ag $\verb|acgaccgccttccgcgatggattgtgccggaacgagtgcgtgtttcagatcgccatagcgccgggacctagtaag|$ ccagacatctccggagcggaacgcatcgcgcagatggaacagcaccgcgatctcccataggcgagcgtcgccagc  $\verb|cctctgggcccgaaggttggcgattgccatttcgagctgggccgcaagaagctggtcatcgcggcatcgttcaaacc||$ 

ggtacgaagggccgtcaccgcttccagaagcggcagtgcaacgggcgcagctcgcagatcgagcaggcgcaacat gcgtggagcgtatcggcggaagcggtgataaccgtcgagcacatgattgagcggatcgtcggccatggtggcggt  $\verb|cagcctggttgccattgcaacaagggtttttaagccgtcccaccctgacccactcgcgatgacatcgcccagcgg| \\$  $\verb|ctggccatcatcctgtgcatcgaccagggcgccccgatctcggcgaaggatttcagggtgtcacgcaccacccc| |$ egettegtetgegaeetttgeatggeaaataegeteegaageaeggtagagaeggeegaegateeggtegtgggt ttcgaccactgcgtcggccaacatcgcctgccattccgagacgcaaacagccaagatcgcaagccgcctgtcctc  $\verb|cgggagatcgcgcatgccgtcggcata| a taccgttcaccctgcctgcgcagacgagtcacccgatgggcaggaac| \\$ gccggcaagcagatcctcggggagatcgatgcgttgcagatattcgagccggtcgagcagccggttggccgacga agagttc gagc caggctc gaactg gc gc agc caca caa aac gg gt caccc gat cat cag cc gt ct cct c gag caa $tgc cag caact {\tt gttctcggatcgacataggccgactggcgatcctcgtctcgatgcgtcgctcggcatcgac}$  $\tt gagagccgcggcacaaagccgctcgatcgtggatgtcgcgggaaggacagtgcgggtgcgtcggcactcggctac$  ${\tt accacgtccggaagaggtgcggaagccgtagagccccgtaactcggcaagatgctcgtgccgtgtttcctcgcg}$ ggcagcatagtctacgagatcgtcggcacccaggccaagctgcgctccgataaattcgatgacctctgcagggat  $\verb|cag| t t c g c c t g g a g c c a g c c c g g c c g g g a t a g c g a a c a c a a t t g c a g g g c g a a g c c g a t c t g t t g t g$ aggggggggggggggtgttcatcactcagggtatagtgcttgagcaaatccgtctgtgaagtcggcaagcgcaacagcgcgtctttctgccgatcggttagagtgacgcgacgcggcatacatgttcctttttc  $\tt aaaatctgatagcgttcaagacgctttgtttatgaagctggttgagatacatttccagaggtcaatgcaatcgtg$ gccgaagcgccgcctcaaaccaacgtttgtgatacatgctgatcggatatgcccgcgtctccaaagccgatggct  $\verb|cgcagtctctcgacctgcagcacgacgccttgcgcgcaggtgtcgaacggtacaatatctatgatgatcttg|$ cttccggcggtcgtgatgatcgccctggcttgactgcctcaagtcattgcgtgacggcgatgtgctggtgg  $\verb|tctggaagctcgatcgcctcggacgatcgcttgcccatctggtcaacacggtgaaggagctgtcagaccgcaaga| \\$ teggeetgegggttetgaetggaaagggegeteagategaeaceaegaetgegteeggtegeatggtgtteggaa tettegeeacettggeegagttegagegggatetgateegagagegeaceatggegggtetegeeteegegagag  $\verb|cgcgcggtcgcaagggcggacgaaaattcgcgctcaccaaagctcaggtgcgtctcgcgcaagccgccatggccc| \\$ agggggatacttcagtttccgatctctgcaaggaactcggcatcgagcgcgtcactctctaccgatatgtcggtcttctgactggttgcctgtcagaggcggagaatctggtgattttgtttttcgacgtggtgacgggcatgccttcgc gaaaatcgcacctgcttcccgccgcggtgagctcgctggagagcgtgaccgcctcatttggctcaaaggtcgagg tgtggcttgccccgaggtgatcaactggcaggaggaacaggagggtgcatgcttggtgataacggcaattccggg agtaccggcggctgatctgtctggagcggatttgctcaaagcgtggccgtcaatggggcagcaacttggcgctgt $\verb|tcacagcctatcggttgatcaatgtccgtttgagcgcaggctgtcgcgaatgttcggacgcgccgttgatgtggt|$  $\tt gtcccgcaatgccgtcaatcccgacttcttaccggacgaggacaagagtacgccgcagctcgatcttttggctcg$ tgtcgaacgagagctaccggtgcggctcgaccaagagcgcaccgatatggttgtttgccatggtgatccctgcat  $\tt gccgaacttcatggtggaccctaaaactcttcaatgcacgggtctgatcgaccttgggcggctcggaacagcaga$ tegetatgeegatttggeaeteatgattgetaaegeegaagagaaetgggeagegeeagatgaageagagegege  $\verb|ccctctgacttggggttgatgttcatgccgcctgtttttcctgctcattggcacgtttcgcaacctgttctcatt|\\$  $\tt gcggacaccttttccagcctcgtttggaaagtttcattgccagacgggactcctgcaatcgtcaagggattgaaa$ cctatagaagacattgctgatgaactgcgcggggccgactatctggtatggcgcaatgggaggggagcagtccgg ttgctcggtcgtgagaacaatctgatgttgctcgaatatgccggggagcgaatgctctctcacatcgttgccgag

 $\verb|cacggcgactaccaggcgaactaatggcgaagctgtatgccgcatctgaggaacccctg|$  $\verb|ccttctgcccttctcccgatccgggatcgctttgcagctttgtttcagcgggcgcgcgatgatcaaaacgcaggt| \\$ tgtcaaactgactacgtccacgcggcgattatagccgatcaaatgatgagcaatgcctcggaactgcgtgggcta ggtgaagtgggctttggcgccgccaatatgttctacgatccggctgacagagacgacctttgtctcgatcctaga cgcattgcacagatggcggacgcattctctcgtgcgctggacgtcgatccgcgtcgcctgctcgaccaggcgtac gcttatgggtgcctttccgcagcttggaacgcggatggagaagaggagcaacgcgatctagctatcgcggccgcg at caage aggt gegaca gac gt catactaga tat caage gac tt ct cct at cccct gggaac acat caat ct tac $\verb|cggagaatatcgttggccaaagccttagcgtaggatttcgccctctcccgcaaacgaccccatccttgatcacct|\\$ gaagcacaaagccgaaaccagcgggaccagggcgttacccgaaagccgggcgccaccggctgagctgctcctggg  $\verb|tctgtttgactgacgacctgaaggccaacgataccaatcaaaatgctgcgttcacagcgccgcggcagggatcc| \\$ gccgtgctggttgtcggaaaaggagccgctagtgggaaagaggggtaaattttcagcgttgctggctccccgt  $\verb|cagccggattgggttgcatcgcaggggtgtcgaaagagtcaactgcggtccaaagctgttggacttgggtgaaaa| \\$ gggcgtttattcttcctatacgtgccgcgttccaggcggcgactatgagggctatgtcgatgcccatgtgcgccg  $\tt gctggaggcgctacgccggtatcgtcgagcggatcgacgccgaccaatggcgcatccccgatgatctggt$  $\verb|cagccgtgccgcccatgacgccggccgagacagtcaggccagcgttcgcgtcctttccccggtcgatctgaa| \\$  $\verb|ccgcagccgggacagccgcgt| cttctaccggcgcaaccttctcgccatcctgcgggagcgcgaggtagccggcgt|$ taccggaaccgtgcatctatcgagcggcaagttcgccgtggtcgagaaatcccatgagttcacccttgtcccgtg  $\tt gcggccgatcatcgaccgccaactcggccgcgaggttatgggcatcgtgcagggcgggtcggttgtcgtggcagtt$ agggcggcagagggggctggaacgctgagtgcgcccatgccgcattgcgaagcaaaagataatcggataaaatgt agcaattcatattcgtaagcgtggagtaatcagatgggaaattccaagtcagcagacaagtaagccgcaacaacc agtattgttgttgcggcgctctgtaaggctagtctcatctgattgctgacgagcagacgtcgcccggtattcctt $\verb| aatcgagggttgattcgtcatgaccaccacgccccgcgtgggcctatacgctgccggcagcactgctgctgat| \\$ ggctcctttcgacatcctcgcttcactggcgatggatatttatctccctgtcgttccagcgatgcccggcatcct gaacacgacgcccgctatgatccaactcacgttgagcctctatatggtgatgctcggcgtgggccaggtgatttt tggtccgctctcagacagaatcgggcgacggccaattctacttgcgggcgcaacggctttcgtcattgcgtctct gggagcagcttggtcttcaactgcaccggcctttgtcgctttccgtctacttcaagcagtgggcgcgtcggccat gctggtggcgacgttcgcgacggttcgcgacgtttatgccaaccgtcctgagggtgtcgtcatctacggcctttt  $\verb|cag| ttcg| atgcttcg| ttcg| tgcttcg| ttcg| tt$ ggcgatattcattactttggctatactggcgatgctcgcactcctaaatgcgggtttcaggtggcacgaaacccg  $\verb|ccctctggatcaagtcaagacgccgatcttgtcttgccgatcttcgcgagtccggctttttgggtttacactgt|\\$  $\verb|cggctttagcgccggtatgggcaccttcttcgtcttcttctcgacggctccccgtgtgctcataggccaagcgga|\\$ a tattccg agatcg gattcagctttgccttcgccactgtcgcgcttgtaatgatcgtgacaacccgtttcgcgaagtcctttgtcgccagatggggcatcgcaggatgcgtggcgcgtgggatggcgttgcttgtttgcggagcggtcct gttggggatcggcgaactttacggctcgccgtcattcctcaccttcatcctaccgatgtgggttgtcgcggtcgg tattgtcttcacggtgtccgttaccgcgaacggcgctttggcagagttcgacgacatcgcgggatcagcggtcgc  $\tt gttctacttctgcgttcaaagcctgatagtcagcattgtcgggacattggcggtggcacttttaaacggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcggtgacacttggcacttggacacttggcggtgacacttggacacttggcggtgacacttgacacttggacacttggacacttggacacttggacacttggacacttggacacttggacacttgacacttggacacttgacacttggacacttggacacttggacacttggacacttgacacttggacacttcacacttgacacacttgacacttgacacttgacacttgacacttgacacttgacacttgacacttgacacttgacacacttgacacttgacacttgacacacttgacact$ agcgtggcccgtgatctgttacgccacggcgatggcggtactggtttcgttgggggctggtgctccttcggctccg tggggctgccaccgagaagtcgccagtcgtctaaccgacgactggtagcaggcccgctccgatgcggcgcactaa

 $\verb|cgccgagcatctgaattttcggcatgcggccaaggcacttggtatcagccagtcgagcgtcagcgcgcgtgtgaa| \\$  $\tt gcacttcatggagcgtgtcacggcgggtgtcgatcaactcgatcacgcagtgaagaccgcggagtgacgggcact$ ggctggcaatgtctagcaacggcaggcatttcggctgagggtaaaagaactttccgctaagcgatagactgtatg taaacacagtattgcaaggacgcggaacatgcctcatgtggcggccaggacggccagccgggatcgggatactgg tcgttaccagagccaccgacccgagcaaacccttctctatcagatcgttgacgagtattacccggcattcgctgc gcttatggcagagcagggaaaggaattgccgggctatgtgcaacgggaatttgaagaatttctccaatgcgggcg  $\tt gctggagcatggctttctacgggttcgctgcgagtcttgccacgccgagcacctggtcgctttcagctgtaagcg$  $\verb|tcgcggtttctgcccgagctgtggggcgcgggatggccgaaagtgccgccttgctggttgatgaagtactgcc| \\$  ${\tt tgaacaacccat} gcgtcagtgggtgttgagcttcccgtttcagctgcgtttcctgtttgccagccggcccgagat$ catggggtgggtgctgggcatcgtttaccgcgtcattgccacgcacctggtcaagaaagcgggccatacccacca agtggccaagacgggcgcggtcaccctgatccagcgtttttggatcggcgctcaatctgaatgttcacttccacatgctgtttctcgacggtgtgtatgtcgagcaatcccacggctcagcgcgtttccgctgggtcaaggcgccgaccag  $\verb|acgggatgtcgaaaacagctatctggcctcggatgcggtggatgacgacccgatgacacccctgctggggcactc| \\$ gatcacttaccgtatcgctgtcggttcacaggcggggcgaaaggtgttcactttgcaaactctgccgaccagtgg  ${\tt tgatccgttcggtgacgggattggcaaggtagccgggtccagcctgcacgccggcgtggcggccagggccgatga}$  ${\tt acgcaagaagctcgaacggctgttgccggtacatcagccgcccggcggtatccgagaagcggctgtcgttaacacg}$ aggeggeaacgtgegetaccagetcaagacgcegtaccgggacggcaccacgcacgtcattttcgaaccattggatttcattgcaaggctggccgccctggtaccgaagcccagagtcaacctaacccgcttccacggggtgttcgcacc  $\verb|caacagtcggcaccgggcgttggtcacgccggcaaaacggggcaggggcaacaaggtcaggggtggctgatgaacc||$ ggcaacaccagcacaacggcgagcgtcgatgacatgggcgcaacggctcaagcgtgttttcaatatcgacatcga gacctgcagcggctgcggcgccatgaaagtcatcgcctgcattgaagaccctatagtgatcaagcagatcct tgatcacctgaagcacaaagccgaaaccagcggaccagggcgttacccgaaagccgggcgccaccggctgagct gctcctgggtctgtttgactgacgagcctgaaggccaacgataccaatcaaaatgctgcgttcacagcgccgcgg  $\verb|cagggatccgccgtgctggttgtcggaaaaggagccgctagtgggaaagaggggtaaattttcagcgttgctg|\\$ gctccccgtcagccggattgggttgcatcgcaggggtgtcgaaagagtcaactgcggtccaaagctgttggactt gggtgaaaagggcgtttattcttcctatacgttgtcggcagcgggccaaaaaggaatacgtccatgcccatcgag gtgaaaccggctgtgagcgcgggttcaagcatatagcccgacaggcgcgtatccttgccgatcacgacacgatgg  $\verb|cggtggtcaccgcgacgacagacagccatgccgacgcgcaaggcggtttccgccgtcatcgcgcct| \\$ tegttggetttgecaegaataeegtetgtgeegaaatatttgegeaeeataaggtegattateetgtegtegggt  $\verb|cgccctcaaaggggacatgcctgctgaaccgcgaatatagagaaatatcccgaatgtgcagttaacgaattcttg|$  $\verb|ctccacctgcggcggcggcaagctctgcagcgagtgtcgcggccccgacatcccccggaccacggcctgtgagcg|$  $\verb|cgcgcagaaaggatttgcgcgaaacagaagcaccggcaaatcgaagcgcagccgcaattcatcgaaccgcg|$  $\verb|ccagcaccgagaggtttcgggagcagcccccagaaaaaaccccatgccgggatcaaggacaaggcggttgc||$ gtttgataccggcacccgtcagcgccgcgatgcgcgctcaaagaacgccgcaatgtgatccatgatgtcgccag  $\verb|cgggtgcctcgccgatctgcccgtcttgcaccgaatgcataacgacgagtttggcagatgatttcgcca|\\$ attgcggatagaacgcagcgtctggaaaaccgcgaatatcattgagataggccacaccacgcgacaaggcatagg cttgcgtcgcgggttgataactgtcgagcgagacgggaatgccatctgccttgagcgcgtccagcaccggcgcga tacgcgcgatttctgtgtcggacgaaacaggcgcggcgtcgggattgctggatgccggaccgaggtcgatcacat

 $\verb|ctgcccctcggccatcagcttacgcgcctgcgcaatggctgcgtctggcgccagataccggcctccatcggaga| \\$ aactgtccgaggttatgttgacgatgccgaaaatgatgagcgatttattcatgggggcttctataataatctctg tacacgacaaaaatagataactcattgaaataatgtcacaataattgttttctaacgacgaatactatgacacat  $\verb|ctca| at gag ttatatcttatctta aacaa at ctcta aa at gg aacaa gtca cattta aa gtg cttt gcg ctcatc| \\$  $\verb|caatcattttatcgacgtatgcagcgcttctttgcaggtcagtattttgattatcgtcaaatttctcagttgatt|\\$ aatatcctgatgctcgcaatcgtttatcgtggaatagcgatacctatcctttggacattgcttaataaacgtgga  $\verb| aattcagatacgaaagagcgtattgctttgattcaacgctttatagccatttttggtaaagaccgtattgtgaat| \\$  $\tt gtgttcgcagacagaggtttatcggtgagcagtggtttacatggttaattgaacaagacatcaacttctgcatt$ tagaaaatggagagcttttactcgtcgtttctcctcagtttaatgccaatgctattcaggattatgcattacgctgggaaattgaaaccttattcagttgtctcaaaggacgcgggtttaatcttgaaaatacgcgcttgacagacccta  $\tt gacgagtgaaaaaattgattgcggtgttagctataagcttctgttggtgttacttaacgggtgaatggcaacata$  $\verb|atcaaaaaaaagcgataaaaataaagaagcatggacgactctcaatgagtttatttcgctatggtttagactatg|$ ttcaaatggcgattcagcgtttaattggttttgggaaaaaagaagagtttaaggaaattttggcaattttaagaa  $agcaga at \verb|cctg| at \verb|aggata| agggtt \verb|ctg| tgaa at ttgtcgtgt acagagt at \verb|aata| aat \verb|aata| at cgagcat gagagt at the state of the s$ gcagaagagcatacatctggaagcaaagccaggaaagcggcctatggagctgtgcggcagcgctcagtaggcaat ttttcaaaatattgttaagccttttctgagcatggtatttttcatggtattaccaattagcaggaaaataagcca  $\verb|ttgaatataaaagataaaaatgtcttgtttacaataaagtgggagtagtaatttcgttactttgtttagaatttc||$ ttcagaaatatttcttaataaatcgtgtttttcaacaagcgtaaaattactttctaaaatctcttgttgtttagc  $\verb|tcgagtttgggtataagccccataataaaattgacgaggatctttaagcacgtaccaatctttcatttggattac||$ atcgtaggtcgcttcttgataacgtgaagctggtttatcaccaaatcttttttcaatataagcataagtatttcttaaaggcttaactgaagatgttttaatatcaatttgcatataaatcttcctgattttttaataaagactagagtt tttattctctaataccggcctgtccaaatcgccacttcatgcggtcatattcaatctttgcaaaatcatccgtac ttaggtgctgtacttgatggtgtgcgcagaattcttcaaaagccttgactggcataatcatttctacagctaact  $\verb|ctggatcacctatcgaaaattcaaattcgatatatttgtcacgctgagtccctgtaacatgaataaagcaaggag| \\$  $\tt gctgttctacattgagttgctgcataccaaaatcctcatattctccataagattattgcaacttgcatgccaatt$ ttatttattattattttcaaatatttatgattttctcttttttatttcatacaatgttctttatcaaattctta  ${\tt agtcacaatgtatgacttaagaaaattctcaagtgttttatattttctcagttgtataagcacttatagatgatc}$  $\verb| aaccgtaccgggtttgtcggagagttttttatttaagttaggccacctgacctaacgggttaatcttatcatagt| \\$  ${\tt acattgcttcaaaatcaaaaggtgatacataacctagtgcactatgtacacgctctttattgaaccaatctaccc}$  $\verb| aatttagtgtcgcaagttgtacatccgctaaaccttgccaatctgcttttagatattcaatcacctctgttttgt| \\$ at a agc cattcac cgtttcagc caa agc attatcg tatga at cac cagtcg tac cgactg at gct cgt a a atttg $\verb|ctgcttctaaacgattggtatagcgaatggaaagatattgcacacctctgtcggaatgatgaatcacattctttg| \\$  $\tt gcatgcctcgatcatgccatgcttgctccaatgcatcgagcaccatatctgtattcatccgtgtcgatactttcc$ taaagtcactcacccacagttggtcaggatgatcagcagtaaaattacgttttaccaagtcatccgctcgttttt

 $\tt gatcatctcggctacgggtggtttgtttgttcttaccacgccaaacaccttttatacctagcttttgcattaatc$ gagcaacagtacagcgcgcaataatatagccttcacgtttcagtttttgccagactttacgtacaccataccgac ctgaactttccttccaaattcgtttaatctcctcagcatgatgcaagtcatgtaaatctcgctttgctcgatgtt  $\verb|ctggattttcacagagatctagagtccggtaataggttgaaggtgcgatcggtaaaattctacaaatcgcctcga|\\$ aaaagcggctgctttacgtagaatttcattggcgcgttgcagttctttattttcgcgttcgagttgtttgatacgttcttggtctgaaagctgctgtactttaactggattttgtttatctaaatatttttgataccaaacacgtagtgt ttcaggagtacaacccttgcgcagtatactgctcagggagcaatagcggtgatcgcagcccaattcgatggataa tettteteggatteaateaattgaacegetetttetetgattteaggggtatattttaettttteateggg ttaaaccagtcgcattatgaaatgtaatataagtagaaatttcagtataaatggtcatgatcttttctaaatttg  $\verb|tccctactttaaacttttctgcaacacctctaaatgttgaattttcttcagccattgcttttcgtatttcaacat|\\$  $\verb|catcatgactgaaggtcaaattctctttatgaaaaataatggttataccacgatcattcagactattcacaattt|\\$  $\verb|cgttcagatcatttgtattacgtgccagacgatcaatactatgaacatgcaccgtatcaccttcacgcagatagt|\\$  $\verb|cgagcattgcatttaactgaggacgttcacggctaccaccgcttgccttttcagtaaaggtcttatccaggctga|\\$ ttc catcta attgac gtt cag tatttt gtt cag ttgaac t gac tcgaat at atccgac ctgat tag g cattct gtaccgttagagtttagataattaaatacatattgtaccgaaattaaatattaagtctataaatacggtttttgagt tgcttttttaagactttattttgttccgttaggctatactctatagatacatagattttgtgatttattcaatagg  $\verb|tccacatcgttcgacatataagttttgattttagaaaaatagtttatgctttaatacaacatgatttttgattgg|$  $\tt aaaaattaataagaaaaaatgctatttgtatggctgtttttcacaaatatttaaaatgttagagcactcaccat$ taaccaaaatttaaattataactcaaggattatttctgcctaattttgtaaatttattgagcacccccgcatatggacgtttccccttaaagctatgatcagttttaagaggaaagattaaatttaattattattgaagcagctttatac ttagaagctaagtgcaataatcagaaaatactccaatttcttactaaaaataaaatttgcatgtagtatcaagct tgtttttgataaaacttgatgctttgtgctaaatcctattaatttcatcacctaaaaattttgttatgaatatag tgatagataaaattttgagtgataacaaaaataaaaaattgcatcgatgaatatcattgacaaatttaggtgtcgaagcatcatttaaggcaccaaccgcataatctaaaacttttatttctattaaataattaacacctgtactaacaatta tcaatagtagtgatgtgattgctagatatgcaagccctctagttagcaataatctaataggaaatgttcgctcaa tcccattcaaataaccttttaggcgtttatcatcaacactatcaagcttacctactcgagacttatcttctttat tatcttcaaatttattttctttaggttgaatagaaactactgctgctaaagcagcgatatagaatccaggtaaaa tttgaaacaaacttaaaattttatcaaaagctttactttgaaaaaaataacttgtttattaaaatcaaaaaacc a a a gatta at catta a atacatta a aga a ataga ta a aggta ta agc ca at ctatt cta a attt gat g t t g g t c gttccatcctgcaaccatgagataccgaaatatgagtttttcattctagtgtatctagttcatcatcgcccatatc  $\verb|atttgaatcaaactcaagctcctcaatgctattaggattcaaagctcttagctttttacaaagattatcatcata|\\$  $\verb|catattttcttcggtaagaatttgtactctctcaaagccatttaaccaatgttttttagttccaaacgattccaa| \\$ agttgaggattcaggtctgatttcgatagttttatttctcttaccatctttcagtacaagcttaaatacggtaac agattctttagctttggcagatccgtaaaaattagacaactttcgaagattatcaatacaatcctgagcaccttt $\verb|caatg| \verb|tttcgt| a atgattg| a atgatttg| a tttgt| a g ctgttttgt| a g ctgta a caa a atcagcttcagg| agc| caatgttttcgt| a g ctgta a caa a atcagcttcagg| agc| caatgttttcgt| a g ctgta a caa a atcagcttcagg| agc| caatgttttcgt| a g ctgta a caa a atcagcttcagg| agc| caatgttttcgt| a g ctgta a caa a atcagcttcagg| a ctgta a caa a caa a ctgta a caa a caa a ctgta a ctgta a caa a ctgta a ctgta$ tatagaaaacaaatttttatgctctaaaaccaattctacaaagttaccactagatatttttttctacgacatcttc ttcaggcacagattcgatctgcgcctcatattcaatataaaaaggcgtatcgagagtagatggataaatttcacg

gaagaatacgttattcttatcttccatgcttattaacttcagtatacgtttcagaagtaaactagcttgtaatgc tgttgtatttttgcccagtttctaaatgaaatcgaccaaaataagcatctttttttccaatgaatacagcatgaca tggtaaagcttctgtatcagtacagctaaataaaagatcaattactatattattactatcaattggatcttcaat aaatctcatactttctaaagcgtgaacaaaacgttttttgtttctagcccatactttagtgtggtattcatattt tgaaatcaattgaaaaatttcataaggagtccttaacgtcacaggatctcctatcaaatcactatttctacgccc $\verb|attcgttttagatttaaaacttatattatgaaattcgatacaaatatcttgcttaactaatttactaggaatccc|$ tataagcttttcttttgaatcaaggtcaatatttgtatcttgcatatttttgtcataataagtaataaagattg gtttatgatggtttaaacatcatggactggatatgaaatatagatgctgatcactatgtctgacaaagaaattca  $\verb|acgtcttgctgttctgcaagacgttcgagatcatcgtattacacaagtccgtgctgctgaaatccttaatctttc|$ tcaacctggccatcgtcgccatgatgatttattaaaatcaaaatgtctttccattatttccgaacatctgctggg  $\verb|atttggacctaccttggcccatgagaagctcagcagcatatttgacctgaatatcccggtagaaacgcttcggcg|$  $\verb|ctggatgactgcaaatgacctctggattccgcgatccaagcgccttaaacgtccatatcagccacgttataaccg| \\$  ${\tt tgattgcttcggtgagctgatccagattgatggctcatatcatgactggttcgaaggacgcgctgctaagtgctg}$ tttattggtgtatatcgatgatgccactggaaagctgttgcatctgcgcttctgtgaggcagaaacgaccttcga  $\verb|ctatatgctttcaacccgagcctacattgaacaatacggtaagcctctggccttttatagcgataaacattcggt|\\$  $\verb|cttccgagtgaaccagaaatcgagccaggacagcaagatcacgcaatttggccggattctgaatgagttaaacat| \\$ tgatattatctttgccaactcaccacaggctaaaggtcgcgtagaacgcgcgaatagaacccttcaagaccgtttgatcaaggagatgcgtctggaaggcatcagttcaattgccgaagccaatgcctggttaccctgctttattgagca  $\verb|tttcaaccagaagttcgccaagtgtgcgcgaaattcaaagaacttacatcgtccgctaacagagtctgatgctga|\\$  $\tt gctggaggatatattcacctggcaggaaccgcgtaaggtcacgaagaacctcaccatcacctatgacaagtgtat\\$ ttatctgcttgaaccgacagagctgaatcataagcttgttgggcaatacatttcatttctggagtacccggatgg tgaagtggttgagaataaaagattaggctcggttctggcgcatatccagcaacagcatgaagagttggaaaaaca  $\verb| aaataaacgttcccgtctcaagaaaagtatgccgagtcgtaaagctcagaaagcggttattgaacaaagaaattt| \\$  $\verb| aaatcctgtgcttgactcttgcagttaaaaaacaggacattttaaattggtttatcgcatagacattttaattggtg|$  $\verb| aataacaaacccctg| ttagaacccatttaaagtg| tccaagtaagataggaatctctg| ttcacttctctatgagat| tccaagtaagataggaatctctg| tccacttctctatgagat| tccaagtaagataggaatctctg| tcacttctctatgagataggaatctctg| tccaagtaagataggaatctctg| tccaagtaggaatctctg| tccaagtaggaatctctg| tccaagtaggaatctg| tccaagtaggaa$ ttagtgtccattaaaatatggatacgcagactaaaaaccattttcgaaaaatgacacaggttgagtcgttttata  $\verb|ctcgtaatgaaaaaataacacctaataaaaataataggatttttaagattacactgtccagaaatactcgcgtatg|$ aaacaggattcctttatgaagaatcctttttctcttttatttcttcggtggtttgtatcatccagtacatcaaaa 

## 8.3. Sequenz der Genkassetten für GFP und mCherry

### GFP: GFP; Spectinomycin Resistenzgen;

  $\verb|ccaattcttgttgaattagatggtgatgttaatgggcacaaattttctgtcagtggagagggtgaaggtgatgca||$ acatacggaaaacttacccttaaatttatttgcactactggaaaactacctgttccatggccaacacttgtcact  ${\tt actttcgcgtatggtcttcaatgctttgcgagatacccagatcatatgaaacagcatgactttttcaagagtgcc}$ atgcccgaaggttatgtacaggaaagaactatatttttcaaagatgacgggaactacaagacacgtgctgaagtc  ${\tt aagtttgaaggtgatacccttgttaatagaatcgagttaaaaggtattgattttaaagaagatggaaacattctt}$ gttaacttcaaaattagacacaacattgaagatggaagcgttcaactagcagaccattatcaacaaaatactcca attggcgatggccctgtccttttaccagacaaccattacctgtccacacaatctgccctttcgaaagatcccaac gaaaagagagaccacatggtccttcttgagtttgtaacagctgctgggattacacatggcatggatgaactatac tatatgaacataatcaacgaggtgaaatc<u>atgagcaatttgattaacggaaaaataccaaatcaagcgattcaaa</u> cattaaaaaatcgtaaaagatttatttggaagttcaatagttggagtatatctatttggttcagcagtaaatggtg <u>gtttacgcattaacagcgatgtagatgttctagtcgtcgtgaatcatagtttacctcaattaactcgaaaaaaac</u> <u>taacagaaagactaatgactatatcaggaaagattggaaatacggattctgttagaccacttgaagttacggtta</u> <u>ataqtatttctctatttggtcctgattcttcaagtatacttgtctccgtacctttgacagatattcgaagagcaa</u> <u>ttaaggattctttgccagaactaattgaggggataaaaggtgatgagcgtaatgtaattttaaccctagctcgaa</u> tgtggcaaacagtgactactggtgaaattacctcgaaagatgtcgctgcagaatgggctatacctcttttaccta <u>aagagcatgtaactttactggatatagctagaaaaggctatcggggagagtgtgatgataagtgggaaggactat</u> <u>attcaaaggtgaaagcactcgttaagtatatgaaaaattctatagaaacttctctcaattag</u>gctaattttattg caataacaggtgcttacttttggtacc

#### mCherry: mCherry; Spectinomycin Resistenzgen;

 $\verb|ttcaagttagtttgtttattaaattaaggaggaactactatggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatc| \\$ at caaggagt t cat g c g c t t caaggt g cac at g g agg g c t c c g t g a a c g g c c a c g a g t t c g ag g g c g a g c a c g a g c c a c g a g t t c g ag g g c g a g c a c g a g c c a c g a c c a c g c c a c g a c c a c g a c c a c g c c a c g a c c a c g c c a c g a c c a c g a c c aggcgagggccgcccctacgagggcacccagaccgccaagctgaaggtgaccaagggtggcccccttgcccttcgcc tgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaccccgccgacatccccgactac ttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggcgtggtgaccgtg acccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaacttcccctccgac ggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggaggcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggccctg  ${\tt aagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggccgccactacgacgctgaggtcaagaccacctacaag}$ gccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggac  ${\tt tacaccatcgtggaacagtacgaacgcgccgagggccgccactccaccggcggcatggacgagctgtacaagtaa}$  $\tt aacataatcaacgaggtgaaatc\underline{atgagcaatttgattaacggaaaaataccaaatcaagcgattcaaacattaa}$ <u>aaatcgtaaaagatttatttggaagttcaatagttggagtatatctatttggttcagcagtaaatggtggtttac</u> <u>gcattaacaqcgatgtagatgttctagtcgtcgtgaatcatagtttacctcaattaactcgaaaaaaactaacag</u> <u>aaaqactaatgactatatcaggaaagattggaaatacggattctgttagaccacttgaagttacggttataaata</u> <u>ggaqtgaagttgtcccttggcaatatcctccaaaaagagaatttatatacggtgagtggctcaggggtgaatttg</u>

#### 8.4. Sequenz der gesamten Genkassetten für GFP und mCherry mit lipA

GFP mit lipA: GFP; Spectinomycin Resistenzgen; lipA1; lipA2

 $\tt aaatgaccaacccgataaaaatatttatcttggtgaaaaactacgtgggcaggaaaagctcgagcgtattcctgt$ taaaattattcctagtactgaaatagcagaaaaaccagattggattcgtaccaaaatcagtgatcccaaagaaat $\verb|caa| acgt | attempts | attemp$  ${\tt aca} {\tt atgttttgga} {\tt agtgcac} {\tt aca} {\tt ccacttttatgattatgggcgatatctgcactcggcgctgccctttttgcga$  ${\tt tgtcgcacatggtcggcccaatacactcgacccattagaaccccaacatttagcagaagcagtatccaatcttca}$ gcttcaatatgtggttatcacctcggtagatcgagatgatcttaaggatggaggagcgcagcattttgttgattg  $\verb|cata| a a a g ca attegt g ca accea at cete at a g g atter a a a attegt g acceg te at a a a a atter at a fine for a constant of the constan$ gtaaaggagaagaacttttcactggagttgtcccaattcttgttgaattagatggtgatgttaatgggcacaaat aactacctgttccatggccaacacttgtcactactttcgcgtatggtcttcaatgctttgcgagatacccagatc atatgaaacagcatgactttttcaagagtgccatgcccgaaggttatgtacaggaaagaactatatttttcaaag atgacgggaactacaagacacgtgctgaagtcaagtttgaaggtgatacccttgttaatagaatcgagttaaaag gtattgattttaaagaagatggaaacattcttggacacaaattggaatacaactataactcacacaatgtataca tcatggcagacaaacaaaagaatggaatcaaagttaacttcaaaattagacacaacattgaagatggaagcgttc  $\verb| aactag cagac cattat caa caa a at act cca attgg cg attgg cctgt ccttt taccag a caac cattacctg terms of the contract of the$ ccacacaatctgccctttcgaaagatcccaacgaaaagagaccacatggtccttcttgagtttgtaacagctg ctgggattacacatggcatggatgaactatacaaataaagtcaagtccagactcctgtgtaaaatcgtccaatct agggtaagtaaattgagtatcaatataaactttatatgaacataatcaacgaggtgaaatc<u>atgagcaatttgat</u>  $\underline{agtatatctatttggttcagcagtaaatggtggtttacgcattaacagcgatgtagatgttctagtcgtcgtgaa}$  $\underline{tcatagtttacctcaattaactcgaaaaaaactaacagaaagactaatgactatatcaggaaagattggaaatac}$ <u>ggattctgttagaccacttgaagttacggttataaataggagtgaagttgtcccttggcaatatcctccaaaaag</u> <u>agaatttatatacggtgagtggctcaggggtgaatttgagaatggacaaattcaggaaccaagctatgatcctga</u>  $\underline{tttqgctattgttttagcacaagcaagaaagaatagtatttctctatttgqtcctgattcttcaagtatacttgt}$  $\underline{\texttt{ctccqtacctttqacaqatattcqaaqaqcaattaaqqattctttqccaqaactaattqaqqqqataaaaqqqtqa}$ tgaqcgtaatgtaattttaaccctagctcgaatgtggcaaacagtgactactggtgaaattacctcgaaagatgt cgctgcagaatgggctatacctcttttacctaaagagcatgtaactttactggatatagctagaaaaggctatcg gqqaqaqtqtqatqataaqtqqqaaqqactatattcaaaqqtqaaaqcactcqttaaqtatatqaaaaattctat <u>agaaacttctctcaattag</u>gctaattttattgcaataacaggtgcttacttttggtacctggtcgactcgaaata gctttaaaaaattctagccagctctccgcctgatgtttttaatcacaatatcgaaactgttccacgtttgtatcgc

gccctgcgaccaggttctgattaccaacattcattaaagcttttacagcaatttaaaaaatattgtccagatgtc
gtcaccaaatgtggtctgatggttggacttggtgaagtagaagctgaagtcattaccttactcaatgatctgcgc
gatcatgatattgagctggtcaccattggacaatacttacaaccctccaaagcgcatgcacctgtacatcgattt
gtttcaccaacagaatttgaacattatgaacagcatggcaaacgtctaggttttaaaaatatctggagtgcaccg
ctggttcgctccagttatcatgcagatcgtcaataccgaggcgaagctgtaccgaagccttttacacgagaagat
ttaaaacaactaaaacataccacatctgatattgc

## mCherry mit lipA: mCherry; Spectinomycin Resistenzgen; lipA1; lipA2

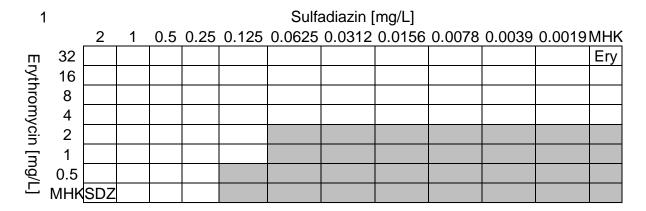
aaatgaccaacccgataaaaatatttatcttggtgaaaaactacgtgggcaggaaaagctcgagcgtattcctgt taaaattattcctagtactgaaatagcagaaaaccagattggattcgtaccaaaatcagtgatcccaaagaaat $\verb|caaacgtattcagactttattacgtcaacaaaaattgcatacggtgtgcgaagaagctgcttgtcctaacttgcc| \\$ acaatgttttggaagtggcacagccacttttatgattatgggcgatatctgcactcggcgctgccctttttgcga tgtcgcacatggtcggcccaatacactcgacccattagaaccccaacatttagcagaagcagtatccaatcttca gcttcaatatgtggttatcacctcggtagatcgagatgatcttaaggatggaggagcgcagcattttgttgattg  ${\tt tgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcacatggagggctccg}$ tgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggccgccctacgagggcacccagaccgccaagctga aggtgaccaagggtggccccctgcccttcgcctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggcct acgtgaagcaccccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtgggagcgcgtga tgaacttcgaggacggcggtggtgaccgtgacccaggactcctccctgcaggacggcgagttcatctacaagg tgaagctgcgcgcaccaacttcccctccgacggccccgtaatgcagaagaaccatgggctgggaggcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggcgcctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcggcc actacgacgctgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctacaacgtcaaca tcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgccgagggccgccact  $\verb|ccaccggcggcatggacgagctgtacaagtaaagtcaagtccagactcctgtgtaaaatcgtccaatctagggta|\\$ agtaaattgagtatcaatataaactttatatgaacataatcaacgaggtgaaatc<u>atgagcaatttgattaacgg</u>  $\underline{tctatttgqttcagcagtaaatggtgqtttacgcattaacagcgatgtagatgttctagtcgtcgtgaatcatag}$ tttacctcaattaactcgaaaaaactaacagaaagactaatgactatatcaggaaagattggaaatacggattc tatatacqqtqaqtqqctcaqqqqtqaatttqaqaatqqacaaattcaqqaaccaaqctatqatcctqattttqqc  $\underline{tattgttttagcacaagcaagaatagtatttctctatttggtcctgattcttcaagtatacttgtctccgt}$ acctttqacaqatattcqaaqaqcaattaaqqattctttqccaqaactaattqaqqqqqataaaaqqtqatqaqcq  $\underline{taatgtaattttaaccctagctcgaatgtggcaaacagtgactactggtgaaattacctcgaaagatgtcgctgc}$ aqaatqqqctatacctcttttacctaaaqaqcatqtaactttactqqqatataqctaqaaaaqqctatcqqqqqaqa <u>gtgtgatgataagtgggaaggactatattcaaaggtgaaagcactcgttaagtatatgaaaaattctatagaaac</u>  $\underline{\texttt{ttctctcaattag}} \texttt{gctaattttattgcaataacaggtgcttacttttggtacctggtcgactcgaaatagcttta}$ aaaattctagccagctctccgcctgatgtttttaatcacaatatcgaaactgttccacgtttgtatcgcgccctg cgaccaggttctgattaccaacattcattaaagcttttacagcaatttaaaaaatattgtccagatgtcgtcacc aaatgtggtctgatggttggacttggtgaagtagaagctgaagtcattaccttactcaatgatctgcgcgatcat

gatattgagctggtcaccattggacaatacttacaaccctccaaagcgcatgcacctgtacatcgatttgtttca ccaacagaatttgaacattatgaacagcatggcaaacgtctaggttttaaaaatatctggagtgcaccgctggtt cgctccagttatcatgcagatcgtcaataccgaggcgaagctgtaccgaagccttttacacgagaagatttaaaa caactaaaacataccacatctgatattgc

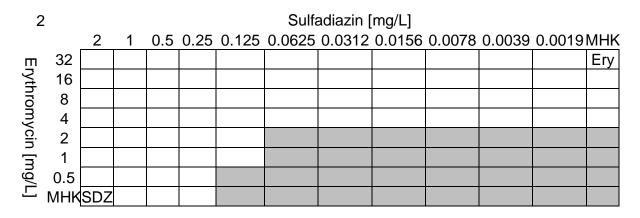
### 8.5. Checkerboard-Assays

Die gezeigten Checkerboard-Assays wurden in Tripletts angefertigt. Hier wird nur das zusammengefasste Ergebnis pro Tag und Stamm dargestellt, da sich die Ergebnisse der jeweiligen drei Tests entsprachen.

1: Checkerboard-Assay vom 17.08.2020 mit *A. baylyi* BD413 GFP gegen Erythromycin (Ery) und Sulfadiazin (SDZ).



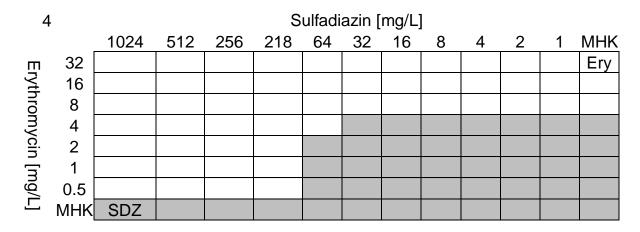
2: Checkerboard-Assay vom 17.08.2020 mit *A. baylyi* BD413 mCherry gegen Erythromycin (Ery) und Sulfadiazin (SDZ).



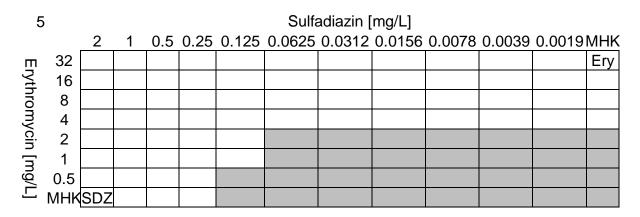
3: Checkerboard-Assay vom 17.08.2020 mit *A. baylyi* BD413 GFP pHHV216 gegen Erythromycin (Ery) und Sulfadiazin (SDZ).

| 3                   |     | Sulfadiazin [mg/L] |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
|---------------------|-----|--------------------|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|-----|
| Erythromycin [mg/L] |     | 1024               | 512 | 256 | 218 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | MHK |
|                     | 32  |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   | Ery |
|                     | 16  |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
|                     | 8   |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
|                     | 4   |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
|                     | 2   |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
|                     | 1   |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
|                     | 0.5 |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
| 二                   | MHK | SDZ                |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |

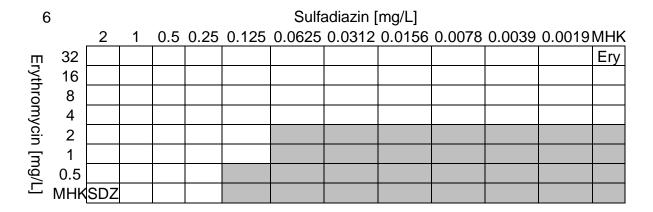
4: Checkerboard-Assay vom 17.08.2020 mit *A. baylyi* BD413 mCherry pHHV216 gegen Erythromycin (Ery) und Sulfadiazin (SDZ).



5: Checkerboard-Assay vom 19.08.2020 mit *A. baylyi* BD413 GFP gegen Erythromycin (Ery) und Sulfadiazin (SDZ).



6: Checkerboard-Assay vom 19.08.2020 mit *A. baylyi* BD413 mCherry gegen Erythromycin (Ery) und Sulfadiazin (SDZ).



7: Checkerboard-Assay vom 19.08.2020 mit *A. baylyi* BD413 GFP pHHV216 gegen Erythromycin (Ery) und Sulfadiazin (SDZ).

| 7                   |     | Sulfadiazin [mg/L] |     |     |  |    |    |    |   |   |   |   |     |  |
|---------------------|-----|--------------------|-----|-----|--|----|----|----|---|---|---|---|-----|--|
| Erythromycin [mg/L] |     | 1024               | 512 | 256 |  | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | MHK |  |
|                     | 32  |                    |     |     |  |    |    |    |   |   |   |   | Ery |  |
|                     | 16  |                    |     |     |  |    |    |    |   |   |   |   |     |  |
|                     | 8   |                    |     |     |  |    |    |    |   |   |   |   |     |  |
|                     | 4   |                    |     |     |  |    |    |    |   |   |   |   |     |  |
|                     | 2   |                    |     |     |  |    |    |    |   |   |   |   |     |  |
|                     | 1   |                    |     |     |  |    |    |    |   |   |   |   |     |  |
|                     | 0.5 |                    |     |     |  |    |    |    |   |   |   |   |     |  |
| 二                   | MHK | SDZ                |     |     |  |    |    |    |   |   |   |   |     |  |

8: Checkerboard-Assay vom 19.08.2020 mit *A. baylyi* BD413 mCherry pHHV216 gegen Erythromycin (Ery) und Sulfadiazin (SDZ).

| 8                   |     | Sulfadiazin [mg/L] |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
|---------------------|-----|--------------------|-----|-----|-----|----|----|----|---|---|---|---|-----|
|                     |     | 1024               | 512 | 256 | 218 | 64 | 32 | 16 | 8 | 4 | 2 | 1 | MHK |
| Erythromycin [mg/L] | 32  |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   | Ery |
|                     | 16  |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
|                     | 8   |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
|                     | 4   |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
|                     | 2   |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
|                     | 1   |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
| JQ/                 | 0.5 |                    |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |
| 二                   | MHK | SDZ                |     |     |     |    |    |    |   |   |   |   |     |

# 9. Publikationen

#### Poster/Vorträge

Schuster D., M. Josten, I. Bodenstein, M. Gajdiss, E. Sib, H.-G. Sahl, G. Bierbaum (2015). Detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by MALDI-TOF MS. Poster im Rahmen der Jahrestagung des DZIF 2015 in München

Schuster D., K. Janssen, M. Josten, I. Bodenstein, C. Albert, A. Schallenberg, M. Gajdiss, E. Sib, C. Szekat, H.-G. Sahl, G. Bierbaum (2017). Detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by MALDI-TOF MS. Poster im Rahmen der 5. Gemeinsamen Jahrestagung der DGHM & VAAM in Würzburg.

Schuster D., P. Ciorba, E. T. Schmierer, G. Bierbaum (2018). Determination of minimal selective concentrations for antibiotics and heavy metals in wastewater. Poster und Vortrag im Rahmen des One Health & Food Safety Congress 2018 in Bonn

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Schuster, D., Rickmeyer, J., Gajdiss, M., Thye, T., Lorenzen, S., Reif, M., Josten, M., Szekat, C., Melo, L. D. R., Schmithausen, R. M., Liégeois, F., Sahl, H. G., Gonzalez, J. J., Nagel, M., & Bierbaum, G. (2017). Differentiation of *Staphylococcus argenteus* (formerly: *Staphylococcus aureus* clonal complex 75) by mass spectrometry from *S. aureus* using the first strain isolated from a wild African great ape. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 307(1), 57–63. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.11.003

Schuster, D., Josten, M., Janssen, K., Bodenstein, I., Albert, C., Schallenberg, A., Gajdiss, M., Sib, E., Szekat, C., Kehl, K., Parčina, M., Hischebeth, G. T. R., & Bierbaum, G. (2018). Detection of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci harboring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 308(5), 522–526. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.05.001

Schuster, D., Axtmann, K., Holstein, N., Felder, C., Voigt, A., Färber, H., Ciorba, P., Szekat, C., Schallenberg, A., Böckmann, M., Zarfl, C., Neidhöfer, C., Smalla, K., Exner, M., & Bierbaum, G. (2022). Antibiotic concentrations in raw hospital wastewater surpass minimal selective and minimum inhibitory concentrations of resistant *Acinetobacter baylyi* strains. *Environmental microbiology*, 24(12), 5721–5733. https://doi.org/10.1111/1462-2920.16206