

JUNGE

wissenschaft

Jungforscher*Innen publizieren
online | **peer reviewed** | original

Verlag:
Physikalisch-
Technische
Bundesanstalt



Biologie &
Medizin

Antibiotikarück- ständen auf der Spur

Entwicklung eines RNA-basierten Sensors
zum Nachweis des Antibiotikums Tetracyclin

Antibiotika, insbesondere das Breitbandantibiotikum Tetracyclin, sind in der Massentierhaltung weit verbreitet und gelangen so auch in Lebensmittel. Das birgt die Gefahr, dass sich Antibiotika resistente Keime bilden, die nicht mehr bekämpft werden können. Aus diesem Grund wurde ein gentechnisch verändertes Bakterium entwickelt, das zur Detektion von Tetracyclin eingesetzt werden kann. Dafür wurde ein Escherichia coli-Bakterium so verändert, dass es bei Kontakt mit Tetracyclin grün fluoresziert. Das Bakterium enthält dafür ein in dieser Arbeit entwickeltes Plasmid.

DIE JUNGFORSCHERINNEN



© Stiftung Jugend forscht e.V.

Anika Stephan (18)
Linnéa Fröber (18)
Mara Hanse (17)

Carl-Zeiss-Gymnasium Jena

Eingang der Arbeit:

30.7.25

Arbeit angenommen:

27.10.25



Antibiotikarück- ständen auf der Spur

Entwicklung eines RNA-basierten Sensors
zum Nachweis des Antibiotikums Tetracyclin

1. Motivation und Fragestellung

Der häufig unkontrollierte Einsatz von Antibiotika zur Bekämpfung bakterieller Infektionen bei Menschen und Tieren führt zunehmend zu Resistenzen von Bakterien gegenüber gewissen Antibiotika. Dadurch werden Antibiotika in ihrer Wirksamkeit eingeschränkt, was für Menschen, Tiere und die Umwelt fatale Konsequenzen haben kann. Daher ist es wichtig, Antibiotikarückstände in der Umwelt nachzuweisen.

Zur Analyse eines Antibiotikavorkommens können bisher klassische mikrobiologische Hemmstofftests durchgeführt werden. Dabei werden alle Stoffe, die mikrobielles Wachstum hemmen, detektiert. Diese Tests sind einfach und kostengünstig. Zur spezifischeren Detektion wird üblicherweise eine HPLC-Massenspektrometrie eingesetzt.

Mit dem Ziel, sowohl auf die Gefahr der wachsenden Antibiotikaresistenzen als auch auf die Chancen der Gentechnik einen stärkeren Blick zu werfen, wird in dieser Arbeit ein auf Ribonukleinsäure (RNA) basierender Sensor für das Breitbandantibiotikum Tetracyclin entwickelt.

RNA ist oft nur als mRNA und tRNA während der

Proteinbiosynthese bekannt, doch es gibt zahlreiche weitere RNA-Typen, darunter Riboschalter, welche regulatorische Funktionen besitzen. In dieser Arbeit reguliert ein Riboschalter (hier als Tetracyclin-Riboschalter bezeichnet) die Synthese eines fluoreszierenden Proteins abhängig vom Tetracyclin-vorkommen [5]. Dieser molekularbiologische Nachweis hat eine hohe Effektivität und Spezifität und könnte sich in Zukunft langfristig sogar als kostengünstiger als die chemischen Analysemethoden herausstellen.

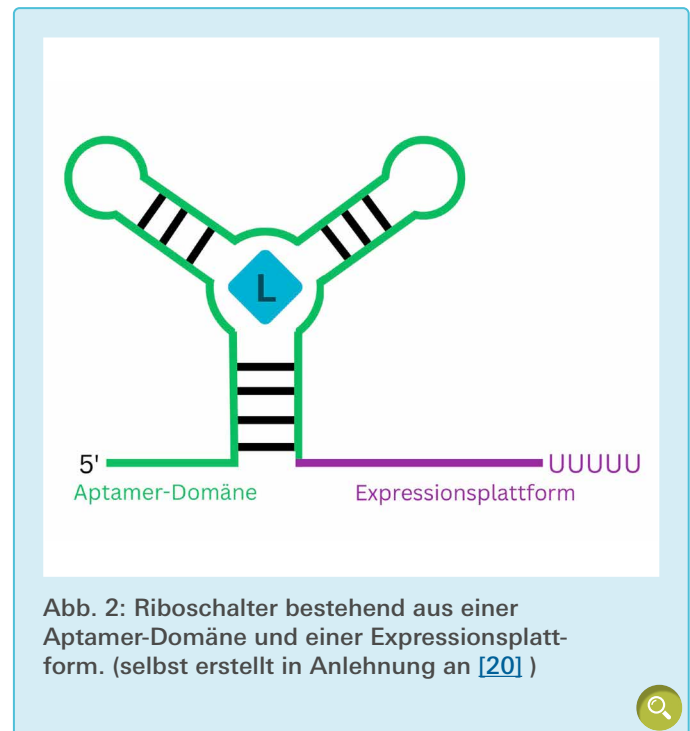
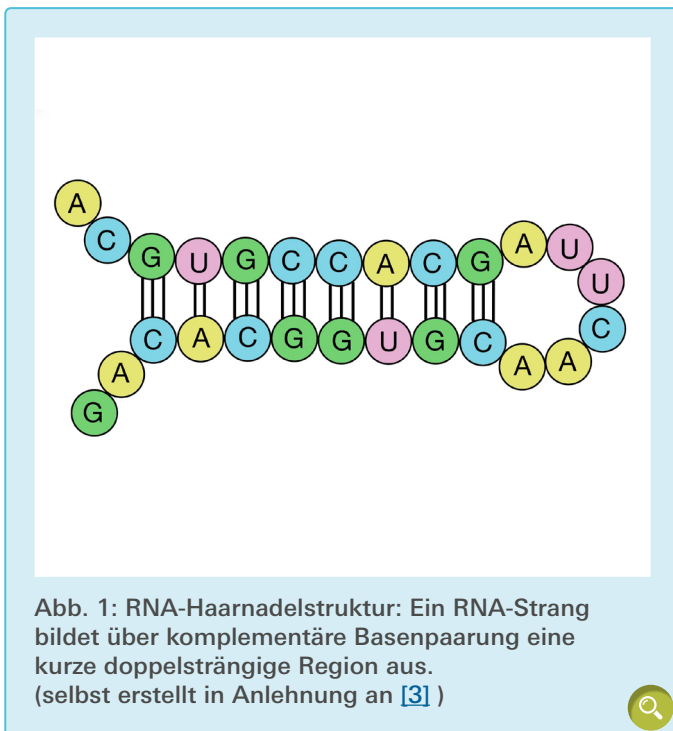
2. Hintergrund und theoretische Grundlagen

Tetracyclin wird nach der Einnahme durch die Darmwandzellen in die Blutgefäße resorbiert und gelangt anschließend in verschiedene Organe und Gewebe. Erreicht das Antibiotikum krankheitserregende Bakterien, hemmt es die ribosomale Proteinbiosynthese und damit das Bakterienwachstum [1].

Durch den vermehrten Einsatz haben bereits einige Bakterienstämme eine Resistenz gegen Tetracyclin entwickelt [2]. Ist ein Bakterienstamm resistent gegen Tetracyclin, so ist eine Resistenz gegen andere Antibiotika der Tetracyclin-Gruppe zu befürchten.

Biosensoren wie Riboschalter beruhen auf Ribonukleinsäure (RNA). Da RNA in der Regel einzelsträngig ist, kann diese verschiedene Sekundärstrukturen einnehmen: Unter einer Haarnadelschleife (siehe [Abb. 1](#)) versteht man eine RNA-Struktur, bei der ein Teil eines RNA-Stranges über komplementäre Basenpaare mit einem anderen Teil desselben RNA-Stranges einen kurzen Doppelstrang ausbildet [3].

Riboschalter bestehen aus zwei zusammenhängenden Untereinheiten – der Aptamer-Domäne und der Expressions-Plattform (siehe [Abb. 2](#)). Die Aptamer-Domäne dient als Sensor und bildet eine hochselektive Bindetasche, die einen als Ligand bezeichneten Stoff binden kann. Als Liganden dienen hierbei meist kleine, organische Moleküle – in dieser Arbeit das Tetracyclin. Die Ligandenbindung bewirkt eine strukturelle Änderung der Aptamer-Domäne. Dadurch erfährt auch die angrenzende Expressionsplattform eine Konformationsänderung. Durch die Konformationsänderung der Expressionsplattform wird die Expression der nachfolgenden Gene beeinflusst.



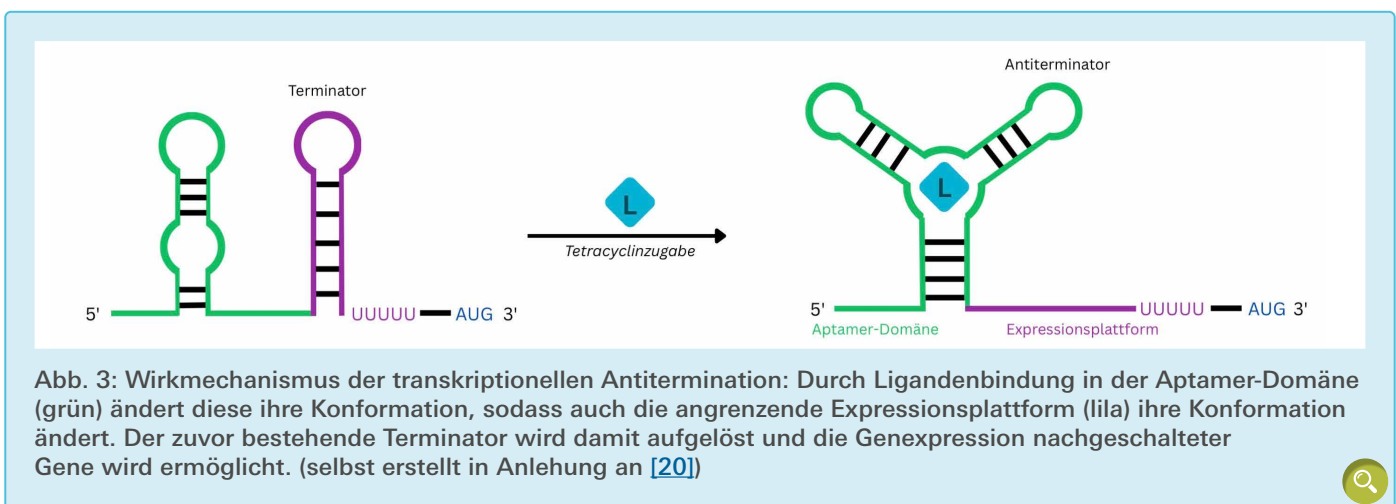
Die Wirkmechanismen der Expressionsplattformen sind verschieden. Beispielhaft wird im Nachfolgenden die transkriptionelle Antitermination betrachtet (siehe [Abb. 3](#)). Der Riboschalter reguliert hierbei den Ablauf der Transkription. Eine Bindung des Liganden (blaues Viereck) bewirkt die Konformationsänderung von Aptamer-Domäne (grün) und Expressionsplattform (lila), wodurch der Terminator aufgelöst wird. Somit kann anschließend die Transkription erfolgen.

Riboschalter dienen zur Regulation der Proteinsynthese - durch Aktivierung oder Hemmung von Transkription oder Translation. Durch Riboschalter wird folglich die Menge eines Proteins innerhalb einer Zelle reguliert [\[4\]](#).

Als Fluoreszenz wird die Aussendung von Licht in Folge der Anregung eines Stoffes verstanden [\[6\]](#). Um Fluoreszenz zu regulieren, werden Fluoreszenzgene in das Plasmid hinter einem Promotor eingebaut. Die Konzentration des grü-

nen Fluoreszenzproteins und somit die Intensität des Leuchtens hängen aufgrund der Genregulation des Riboschalters vom Vorkommen des Tetracyclins ab. Werden verschiedene Fluoreszenzproteine parallel verwendet, so müssen sich deren Spektren voneinander unterscheiden [\[7\]](#). Daher werden in dieser Arbeit die Fluoreszenzproteine TurboRFP und mNeonGreen verwendet.

Das Bakterium *Escherichia coli* (kurz *E. coli*) kommt im Dickdarm als Teil der Darmflora des Menschen vor und lebt in Symbiose mit seinem Wirtsorganismus. In dieser Arbeit wird ein Wildtyp von *E. coli* verwendet. *E. coli* ist einer der häufigsten verwendeten Modellorganismen in der Molekularbiologie, da *E. coli* leicht zu handhaben ist, sich schnell vermehrt und zu den besterforschten Prokaryoten zählt. In der Gentechnik wird *E. coli* zur Vermehrung von Gensequenzen wie zum Beispiel von Vektoren, welche als Transportmatrix zur Übertragung von Fremd-DNA dienen, verwendet. So ist es



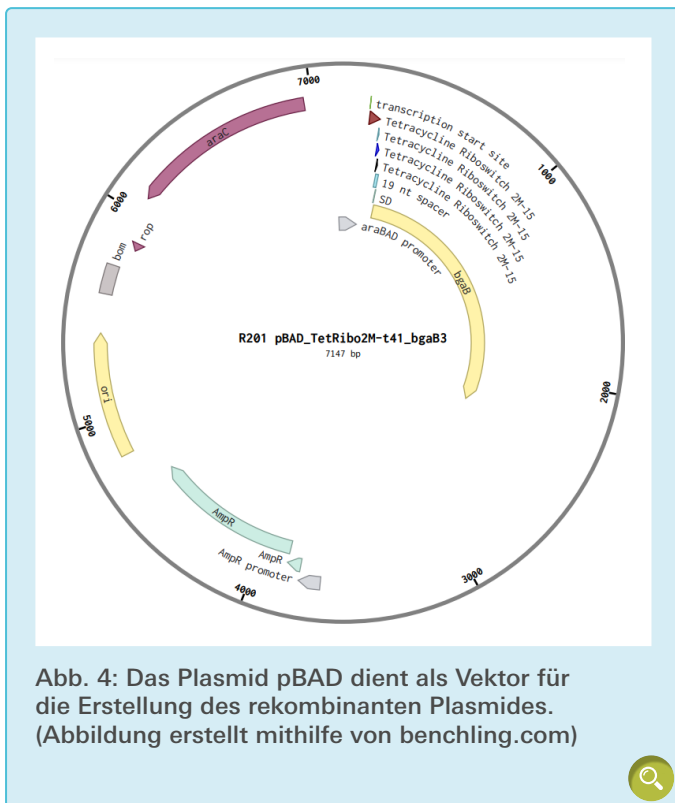


Abb. 4: Das Plasmid pBAD dient als Vektor für die Erstellung des rekombinanten Plasmides. (Abbildung erstellt mithilfe von benchling.com)

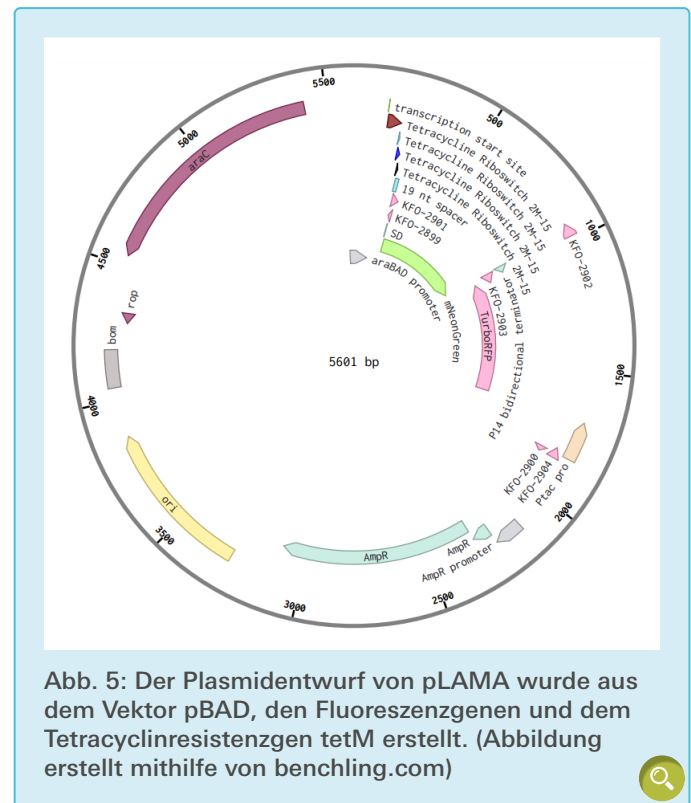


Abb. 5: Der Plasmidentwurf von pLAMA wurde aus dem Vektor pBAD, den Fluoreszenzgenen und dem Tetracyclinresistenzgen tetM erstellt. (Abbildung erstellt mithilfe von benchling.com)

möglich, Plasmide, also Fremd-DNA, in *E. coli* einzuschleusen [8]. In dieser Arbeit sind die Plasmide, welche in *E. coli* eingeschleust werden, Träger der Riboschalter.

3. Vorgehensweise, Materialien und Methoden

3.1 Erstellung des Plasmides pLAMA *in silico*

Die Erstellung des Plasmides erfolgt zunächst *in silico* mit der Entwicklung eines Plasmidentwurfes. Dazu werden die Plattform Benchling für die Erstellung der Abfolge der benötigten Gene und der Rechner OligoCalc für die Ermittlung der Oligonukleotideigenschaften genutzt. Zur Erstellung des eigenen Plasmides pLAMA (siehe Abb. 5) wird das Plasmid R201 pBAD_TetRibo2Mt41_bgaB3 (abgekürzt als Plasmid pBAD) verwendet und mit zwei Fluoreszenzgenen aus anderen Plasmiden zu einem rekombinanten Plasmid zusammengesetzt (siehe Abb. 4 und 5). Außerdem wird ein weiteres Plasmid benötigt, um das Gen tetM zu isolieren und anschließend in das Bakteriengenom für die Tetracyclinresistenz einzusetzen. Ziel ist es, ein Plasmid zu entwerfen, welches die notwendigen Genabschnitte enthält, um abhängig vom Tetracyclin-Vorkommen die Fluoreszenz zu regulieren.

Zur tetracyclinabhängigen Regulation der Fluoreszenz in dem rekombinanten Plasmid wird der Tetracyclin-Riboswitch aus pBAD genutzt und in gleiche Laufrichtung vor die mNeonGreen-codierende Gensequenz geschaltet. mNeonGreen ist ein besonders hell gelbgrün fluoreszierendes Protein.

Zum Start der Genexpression wird ein Promotor benötigt. Hierfür wird der *araBAD* Promotor in gleiche Laufrichtung vor den Riboswitch geschaltet. Bei dem *araBAD* Promotor handelt es sich um einen bidirektionalen Promotor, der durch den Zucker L-Arabinose aktiviert wird. Das bedeutet, dass die Promotorsequenz zwischen zwei Genpaaren liegt und bei L-Arabinosevorkommen die Transkription in beide Richtungen startet. Das synthetisierte AraC ist für die L-Arabinose abhängige Regulation am Promotor notwendig. Wenn sowohl Arabinose als auch Tetracyclin vorhanden sind, wird das Fluoreszenzprotein mNeonGreen vom *araBAD* Promotor aus synthetisiert [9].

Neben der grünen Fluoreszenz zum Nachweis von Tetracyclin soll auch das rote Fluoreszenzprotein TurboRFP codiert werden. TurboRFP soll während der gesamten Zeit produziert werden und lediglich als Kontrolle dienen. Dadurch lässt sich die Abwesenheit der Plasmide als Fehlerquelle ausschließen. Außerdem wird gezeigt, dass ein Nachweis der synthetisierten Fluoreszenzproteine möglich ist. Zur Initiierung der Transkription von *turboRFP* wird der *tac*-Promotor in gleicher Laufrichtung vor das Gen *turboRFP* geschaltet. Damit der *tac*-Promotor konstitutiv ist und somit die Synthese von TurboRFP unabhängig von spezifischen Regulatoren erfolgen kann, wird der LacI-Repressor, der zu dem *tac*-Promotor gehört, nicht mit in das Plasmid eingefügt [10]. Wie jedes Plasmid benötigt pLAMA für die DNA-Replikation zur Vermehrung der Plasmide den Replikationsursprung *ori*. Je mehr Kopien des Plasmides in *E. coli* enthalten sind, desto größere Mengen des Fluoreszenzproteins mNeonGreen können bei zeitgleichem Vorkommen von Tetracyclin und L-Arabinose

Tab. 1: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes

Taq Mix	5x Puffer	DMSO	Primer 1	Primer 2	dNTPs	Template	Taq Pol	H ₂ O	Summe
Volumen in µl	10,00	2,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	35,00	50,00

synthetisiert werden. Daraus resultiert ein genaueres Ergebnis bei der Fluoreszenzmessung.

Das Gen *rop* codiert das Regulatorprotein Rop, welches die Rate der Plasmidreplikationsinitiierung herabsetzt und somit als Repressor der Replikation dient. Das *rop* Gen wird als Bestandteil des Plasmides benötigt, um die Kopienzahl des Plasmides zu regulieren und somit zu verhindern, dass die Menge der Plasmide in *E. coli* zu stark ansteigt. Eine große Kopienzahl des Plasmides ist zwar für die zu erzielende Fluoreszenz von Vorteil, bedeutet jedoch auch eine Belastung der Bakterien, sodass eine Regulation notwendig ist [11].

Durch Hinzugabe von Ampicillin kann eine Selektion der Bakterien erfolgen, die das Plasmid enthalten. Zur Erzeugung einer Resistenz wird das Ampicillin-Resistenzgen *ampR* verwendet. Der *ampR*-Promotor startet die Expression des Gens *ampR*, wodurch das Enzym β -Lactamase synthetisiert wird, welches die Wirkung von Ampicillin neutralisiert [12]. Damit liegt in Abb. 5 *in silico* ein Entwurf eines Plasmides vor. Wird das Medium der Bakterien mit Ampicillin versetzt, erfolgt die Selektion von Bakterien, die das Plasmid enthalten. Anhand der roten Fluoreszenz kann das Vorhandensein der Plasmide dauerhaft nachgewiesen werden. Sofern die Bakterien in einem arabinosehaltigem Nährmedium gehalten werden, wird vorkommendes Tetracyclin durch die hinzukommende grüne Fluoreszenz nachgewiesen.

3.2 Isolation benötigter Fragmente

3.2.1 PCR zur Vervielfältigung der benötigten Fragmente

Um die gewünschten Gene in das rekombinante Plasmid pLAMA einzusetzen, müssen die Sequenzen in ausreichender Menge vorhanden sein. Daher werden die gewünschten DNA-Sequenzen mittels PCR vervielfältigt. Zu amplifizieren sind ein Fragment aus dem Plasmid pBAD (ca. 4000 bp) - als Grundlage des rekombinanten Plasmids, die Tetracyclin-Resistenz codierende Sequenz *tetM* (ca. 2000 bp) und die zwei Fluoreszenzgene *mNeonGreen* (ca. 760 bp) und *turboRFP* (ca. 900 bp). Da das Fragment aus pBAD deutlich länger ist und damit die Wahrscheinlichkeit für Punktmutatio-

nen höher ist, wird für diese Sequenz die Q5-Polymerase verwendet, welche spezifischer als andere Polymerasen ist. Für die anderen Fragmente genügt die unspezifischere Taq-Polymerase.

Ansetzen des Mastermixes: Zunächst werden die Reaktionskomponenten in der Reihenfolge Wasser - Puffer – ggf. DMSO – Primer – dNTPs – Template DNA – Polymerase zusammen pipettiert, während alle Substanzen auf Eis gelagert werden. Die jeweiligen Mengen sind in Tab. 1 enthalten. Die Reihenfolge des Hinzugebens der Substanzen ist zu beachten, da die Substanzen ansonsten untereinander unerwünschte Nebenreaktionen eingehen könnten. DMSO wird bei Verwendung der Q5-Polymerase nicht hinzugegeben, ansonsten stimmen die Komponenten der beiden Mastermixe überein. Für die pBAD-Sequenz und die Fluoreszenzgene wird jeweils eine einfache Menge (50 µl gesamt mit 0,5 µl Template-DNA) des Mastermixes angesetzt. Für *tetM* hingegen wird die doppelte Menge angesetzt und dann auf zwei Reaktionsgefäße verteilt.

Reaktion im Thermocycler: Alle Reaktionsgefäße mit gleicher Polymerase werden anschließend in einen Thermocycler gesetzt. Das Programm des Thermocyclers wird entsprechend der Polymerase und dem gewünschten Ergebnis eingestellt, da die Zyklendauern je nach Polymerase voneinander abweichen. Die Schritte 2 bis 4 werden sowohl bei der Taq-Polymerase als auch bei der Q5-Polymerase jeweils 30-mal wiederholt, bevor Zyklus 5 beginnt (Tab. 2). Nur durch diese Wiederholungen kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA.

Tab. 2: PCR-Zyklus-Einstellung im Thermocycler bei Verwendung der Taq-Polymerase

Zyklus	Temperatur in °C	Dauer in s	Beschreibung
1	95	90	Initiale Denaturierung
2	95	10	Denaturierung
3	56	15	Primer-Annealing
4	72	120	Elongation
5	72	120	Finale Elongation
6	6	-	Lagerung

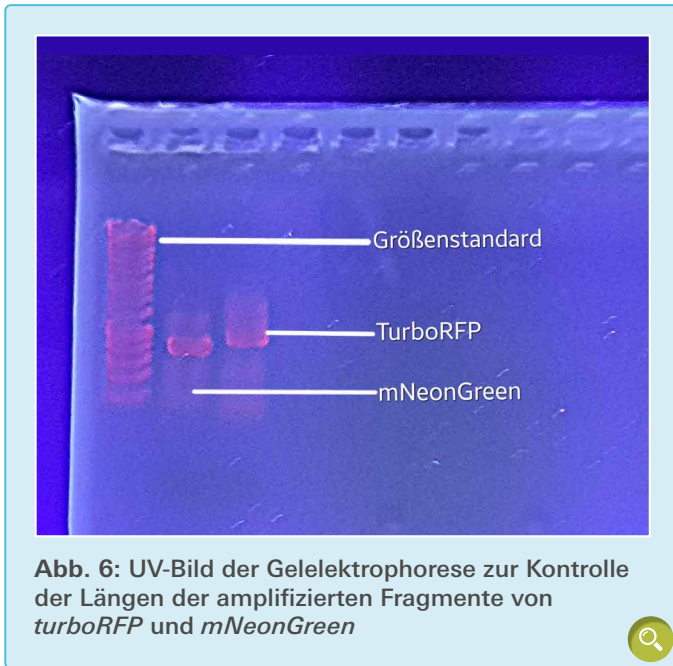


Abb. 6: UV-Bild der Gelelektrophorese zur Kontrolle der Längen der amplifizierten Fragmente von *turboRFP* und *mNeonGreen*

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese zur Kontrolle der Funktion der PCR

Die Gelelektrophorese überprüft nach der PCR das Vorhandensein der entstandenen Produkte und stellt sicher, dass die korrekten Fragmente amplifiziert wurden. Das Gel entsteht durch Erhitzung von 100 ml einer 1%igen-Agaroselösung mit 100 ml eines TAE-Puffers [13]. Anschließend wird das Gel in eine Form gegossen und kleine Öffnungen (Slots) werden mithilfe eines Kamms eingefügt. Danach wird das Gel in eine Elektrophoresekammer in ein Ethidiumbromidbad gesetzt. In die Slots werden je 10 µl eines der PCR-Produkte (*mNeonGreen*, *turboRFP*, pBAD, *tetM*) und ein Größenstandard pipetiert. Dieser Größenstandard dient als Vergleichswert zur Bestimmung der Länge der DNA-Fragmente, da die Abstände zwischen den Fragmentlängen nicht linear sind. Durch das Anlegen einer Spannung an die Elektrophoresekammer werden die negativ geladenen DNA-Stränge im Gel von der Kathode zur Anode bewegt. Je kleiner die DNA-Fragmente sind, desto weniger interagieren diese mit dem Gel, desto schneller bewegen sich diese und desto weiter wandern diese. Die Fragmente werden somit der Größe nach sortiert. Durch das Bestrahlen des Gels mit UV-Licht werden die Fragmente als Banden sichtbar. In Abb. 6 sind von links nach rechts der Größenstandard und die Fluoreszenzgene *mNeonGreen* und *turboRFP* sichtbar. Die Bandenlängen der Fragmente können mit dem Größenstandard verglichen werden. Das Fragment *mNeonGreen* (760 bp) ist kürzer als *turboRFP* (900 bp) und bewegte sich daher, wie in Abb. 6 erkennbar, weiter. Somit stimmen die abgelesenen Längen der Amplifikate mit den erwarteten Längen überein. Die Gelelek-

trophorese zeigt, dass die gewünschten Fragmente amplifiziert werden konnten.

Anschließend werden die amplifizierten Fragmente aufgereinigt. Die Aufreinigung entfernt überschüssige Reaktionskomponenten wie dNTPs und Enzyme, um reine DNA-Fragmente zu erhalten. Hierzu werden die DNA-Sequenzen mit verschiedenen Wasch- und Bindepuffern zentrifugiert und dabei an einer Silicamembran aufgefangen. Alle anderen Komponenten gelangen durch die Silicamembran und werden entfernt. Schließlich wird die aufgereinigte DNA durch erneute Zentrifugation mit destilliertem Wasser von der Silicamembran abgelöst. Die gereinigten Fragmente können nun weiterverwendet werden.

3.3 Zusammensetzen der Fragmente

3.3.1 Messen der entstandenen Konzentrationen

Um die aufgereinigten, amplifizierten DNA-Fragmente korrekt zum Plasmid pLAMA zusammenzusetzen, wird ihre Konzentration mithilfe des NanoDrop Mikrovolumen-Spektrophotometer gemessen und auf Verunreinigungen untersucht. Für diese Messung wird 1 µl der Lösung, welche die jeweils isolierten Fragmente (*pBAD* bzw. *turboRFP/ mNeonGreen*) enthält, auf eine spezielle Probenaufnahmestelle gegeben. Das Gerät zieht aus dem Tropfen einen Flüssigkeitsfaden, durchstrahlt ihn mit Licht und misst die Absorptionsrate des Flüssigkeitsfadens. Zunächst findet eine Routinemessung ohne Probe statt, welche testet, ob das Gerät funktioniert.

Das Spektralphotometer bildet das Verhältnis der Absorptionsraten der Wellenlängen 260 nm und 230 nm, um Salzverunreinigungen auszuschließen. Des Weiteren bildet es das Verhältnis der Absorptionsraten der Wellenlängen 260 nm und 280 nm, um Proteinverunreinigungen auszuschließen (Tab. 3). Das Verhältnis wird immer mit 260 nm gebildet, da dies die Wellenlänge des Lichts ist, bei der das Absorptionsmaximum von DNA und RNA erreicht wird [14]. Liegen die gebildeten Verhältnisse etwa bei 2, wie in den Werten erkennbar, können größere Verunreinigungen ausgeschlossen wer-

Tab. 3: Die Messwerte des Spektralphotometer zeigen, dass die Verhältnisse der Absorptionsraten $\frac{260 \text{ nm}}{280 \text{ nm}}$ und $\frac{260 \text{ nm}}{230 \text{ nm}}$ etwa beim Wert 2 liegen, sodass größere Salz- und Proteinverunreinigungen ausgeschlossen werden können.

Fragment-name	Konzentration in ng/µl	$\frac{260 \text{ nm}}{280 \text{ nm}}$	$\frac{260 \text{ nm}}{230 \text{ nm}}$
mNeonGreen	156,7	1,89	2,46
turboRFP	119,6	1,86	2,44
pBAD	51,6	1,76	2,04

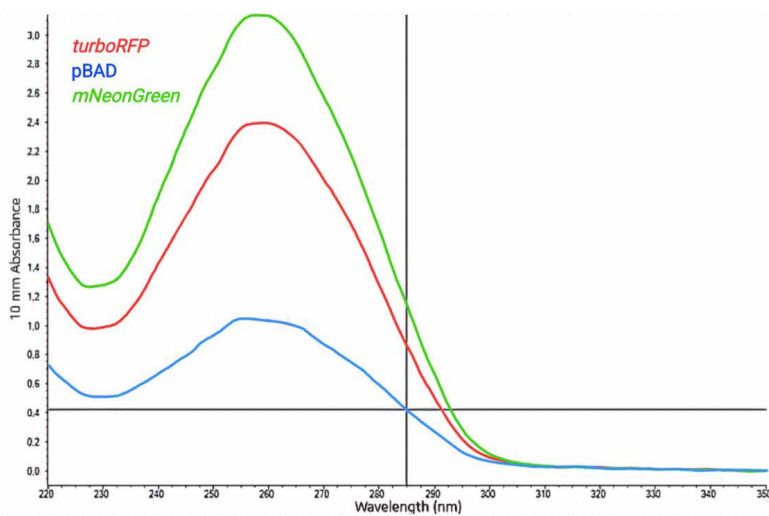


Abb. 7: Abhängigkeit der Absorptionsrate von der Wellenlänge.

den. Das Verfahren wird anschließend für das Tetracyclinresistenzgen *tetM* wiederholt. Hier konnten Verunreinigungen ebenfalls ausgeschlossen werden. Die errechneten Konzentrationen der isolierten Fragmente werden anschließend für das sogenannte Gibson Assembly zur Zusammensetzung des rekombinanten Plasmides pLAMA benötigt.

Anschließend wird die Absorptionsrate des Lösemittels (hier: Wasser) ohne DNA-Fragmente und die Absorptionsrate des Wassers mit DNA bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Aus den Messwerten erstellt das Spektralphotometer ein Diagramm, welches in [Abb. 7](#) zu sehen ist. Es zeigt die Absorptionsrate der Probe in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichtes. Aus dem gemessenen Unterschied zwischen der Absorptionsrate des Lösemittels mit und ohne DNA-Fragmente berechnet das Spektralphotometer die Konzentrationen dieser.

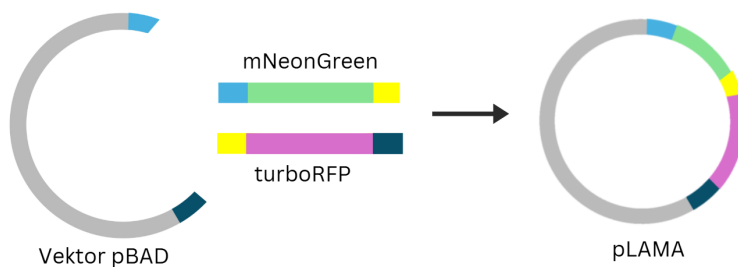


Abb. 8: Beim Gibson Assembly hybridisieren die überlappenden Enden des Vektors pBAD und die Plasmid-Fragmente, die die Gene *mNeonGreen* und *turboRFP* enthalten, miteinander, sodass das Plasmid pLAMA entsteht.

3.3.2 Gibson Assembly zum Zusammenfügen der amplifizierten Fragmente

Durch das Gibson Assembly entsteht das rekombinante Plasmid pLAMA. Die isolierten Fragmente weisen dabei an ihren Enden gleiche Nukleotidsequenzen auf. In dieser Arbeit wird das Gibson Assembly Kit von NEB verwendet.

Die DNA-Sequenzen *mNeonGreen*, *turboRFP* und das pBAD-Fragment werden in ein Reaktionsgefäß gegeben. Das gesamte Volumen der Fragmente sollte hierbei etwa 0,5 μl betragen. Anschließend werden ca. 10 μl des Gibson Assembly Mastermixes, welcher alle benötigten Fragmente enthält, und ca. 9,5 μl destilliertes Wasser in das Reaktionsgefäß hinzugegeben.

Dieses Reaktionsgefäß wird anschließend in den Thermocycler gesetzt und dort für ca. 60 Minuten bei 50 °C erwärmt. Die enthaltene T5-Exonuklease katalysiert die hydrolytische Abspaltung der Nukleotide am 5' Ende, sodass Nukleotide am 3' Ende überhängen. Die entstandenen einzelsträngigen komplementären Basenpaare können anschließend hybridisieren [15]. Die entstehenden Lücken werden durch die $\phi 29$ -DNA-Polymerase geschlossen. Eine Ligase katalysiert im nächsten Schritt die kovalente Verbindung der DNA-Fragmente, sodass eine Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten Nukleotiden entsteht [16].

[Abb. 8](#) zeigt den Ablauf eines Gibson Assembly. Hierbei werden die Gene *mNeonGreen* und *turboRFP* in den linearisierten Vektor (hier: großes pBAD-Fragment) eingefügt, sodass pLAMA entsteht. Die Plasmide werden in *E. coli*-Bakterien transformiert und anschließend auf eine Ampicillinplatte aufgestrichen (Vgl. Kapitel 3.4.4). Nach einiger Zeit sind auf der Platte einzelne kleine, punktförmige, rot fluoreszierende Bereiche zu erkennen. Zehn dieser Bereiche werden zur Probenentnahme ausgewählt.

Mit jeder Probe wird eine Kolonie-PCR und eine darauffolgende Gelelektrophorese (Vgl. Kapitel 3.2.2) durchgeführt. So wird festgestellt, welche Plasmide voraussichtlich die meisten Übereinstimmungen mit der gewünschten Sequenz haben. Diese vier Plasmide werden für die anschließende Sanger-Sequenzierung ausgewählt. Dafür wird die Plasmid-DNA über MiniPrep aus den Bakterien isoliert.

3.3.3 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung ist eine Methode zur Entschlüsselung der Nukleotidreihenfolge von bis zu 1000 Basenpaaren. Daher wird die Sequenzierung für den *mNeonGreen* codierenden Bereich durchgeführt. Die Sanger-Sequenzierung ist der einzige Bestandteil dieser Arbeit, der in einem externen Labor durchgeführt wurde. Die von dem externen Labor erhaltenen Nukleotidsequenzen konnten anschließend ausgewertet werden. Dazu verglichen wir, wie nachfolgend beschrieben, die Nukleotidsequenzen der Plasmide mit der in Benchling erstellten Sequenz und untersuchten diese auf Mismatches.

In dieser Arbeit werden für die Sequenzierung ein Forward Primer (ATGCCATAGCATTTTATCC) und ein Reverse Primer (GTGCCACCTGACGTCTAAGA) verwendet, um eine Sequenzierung in beide Richtungen zu ermöglichen. Da bei dem Reverse Primer der komplementäre Strang sequenziert wird, muss die erhaltene Gensequenz zunächst in entgegengesetzter Richtung abgelesen werden und anschließend ein Strang mit den komplementären Basen gebildet werden, damit die Basenabfolge mit dem geplanten Plasmid verglichen werden kann. Anschließend kann der Nukleotidsequenzvergleich der drei Zielsequenzen durch das Programm MultAlign erfolgen. MultAlign ordnet die drei Sequenzen so zueinander an, dass die größtmögliche Übereinstimmung der Basen erzielt wird.

Zur übersichtlicheren Darstellung sind Basen, die in allen drei Sequenzen miteinander übereinstimmen in [Abb. 9](#) rot dargestellt. Gleichen sich zwei der drei Basen, so sind diese blau gekennzeichnet. Gibt es keine Übereinstimmung der drei Basen, werden die Basen schwarz dargestellt.

Bei der Auswertung muss beachtet werden, dass die ersten 20 bis 30 Basen einer Sequenzierung meist nicht genau erfasst werden und somit bei einer Betrachtung vernachlässigt werden können. Fehler, die zwischen den Basenpaaren 1838 und 2135 des geplanten Plasmides auftreten, können ebenfalls vernachlässigt werden, da in diesem Bereich keine für die Funktion des Plasmides relevanten Gensequenzen vorkommen.

Insgesamt werden die Sequenzabschnitte vier verschiedener Plasmide mit dem geplanten Plasmid verglichen. Da alle der vier Plasmide jedoch in den relevanten Gensequenzen Fehler aufweisen, ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen notwendig. Dafür ist die Übersetzung der Nukleotidsequenz in die entsprechende Aminosäuresequenz mithilfe der Website Expsy notwendig. Für den Aminosäuresequenzvergleich wird die Website UniProt verwendet. Hierzu erstellt die Website aus den eingefügten Aminosäuresequenzen einen Vergleich und kennzeichnet die Aminosäuren bei Übereinstimmung in blau ([Abb. 10](#)). Nur bei pLAMA2 stimmt die Aminosäuresequenz mit der geplanten Sequenz überein, daher wird nur das Plasmid pLAMA2 für die nachfolgenden Schritte verwendet.

	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
plasmid	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
13	AAAAAGCGTTTACCGATGTGATGGGTATGGATGAACCTGTATAAATAAATAGTCAAGCCGCCGGTCGGAGGCTTTTGACTTTATCTATGCCCT									
16	AAAAAGCGTTTACCGATGTGATGGGTATGGATGAACCTGTATAAATAAATAGTCAAGCCGCCGGTCGGAGGCTTTTGACTTTATCTATGCCCT									
Consensus	aaaaagcgtttaccgatgtgatgggtatggatgaactgtataaataaatagtcaaagcctccggtcggag.cttttgactttatctatgccct									
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130
plasmid	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
13	CATTTCATGTTGCTCAACATATGTTTCTTTATCCGCTTCTTAAATACGTTCTAATCTATGGTCTACAAATGAACCCCGGCATCTTTAAGTTTT									
16	CATTTCATGTTGCTCAACATATGTTTCTTTATCCGCTTCTTAAATACGTTCTAATCTATGGTCTACAAATGAACCCCGGCATCTTTAAGTTTT									
Consensus	catttcatggttctcaacatgctttctttatccgcttctttaaactcctaatctatggctctacaaaatgaaccccgcatctttaaagTTTT									
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
plasmid	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
13	GAACAATGTAAGTATCCCCCTCTACTAATTTCAATGCCATTTGACTATGTCCCTTAAACCTCCATCAGCTGGATATACATCTCAGTATTCGC									
16	GAACAATGTAAGTATCCCCCTCTACTAATTTCAATGCCATTTGACTATGTCCCTTAAACCTCCATCAGCTGGATATACATCTCAGTATTCGC									
Consensus	GAACAATGTAAGTATCCCCCTCTACTAATTTCAATGCCATTTGACTATGTCCCTTAAACCTCCATCAGCTGGATATACatctcagtatTCGC									
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390
plasmid	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----									
13	CATTAGATGGAAGTAAACCCATTGATTTTAAACATTGTATATGATGCATCCATTTTGAATGACGTATCTTGAGTTGCCGTTAATACTCCCCCA									
16	CATTAGATGGAAGTAAACCCATTGATTTTAAACATTGTATATGATGCATCCATTTTGAATGACGTATCTTGAGTTGCCGTTAATACTCCCCCA									
Consensus	cattagatggaagtaaacccattgattttaaacattgtatgatgatccatTTTgaaatgacgtatcttgagttgccgTTAatactCCCCCA									

Abb. 9: Der Ausschnitt der Nukleotidsequenz von pLAMA2 zeigt ein Mismatch (schwarz) in der ersten Zeile.

plasmid	N I P E K S G E V K N T T T
13	N I P E K S G E V K N T T T
plasmid	S L P A T H E L H I F G S I
13	S L P A T H E L H I F G S I
plasmid	F S P W I L V P H I G Y G F
13	F S P W I L V P H I G Y G F
plasmid	D G A S L T V N Y R Y T Y E
13	D G A S L T V N Y R Y T Y E
plasmid	R S K K T Y P N D K T I I S
13	R S K K T Y P N D K T I I S

Abb. 10: Proteinsequenzvergleich: Ausschnitt von pLAMA2 zeigt im betrachteten Bereich ausschließlich übereinstimmende Aminosäuren.



3.4 Transformation der Bakterien

3.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Die *E. coli*-Bakterien sind ohne spezielle Behandlung nicht in der Lage DNA aufzunehmen. Um das Plasmid pLAMA in Bakterien zu integrieren, müssen die Bakterien kompetent gemacht werden. Dafür werden sie zunächst auf Eis gelagert. So wird bei den Bakterien ein Stresszustand hervorgerufen, durch welchen die Zellmembran durchlässig für externe DNA-Fragmente wird.

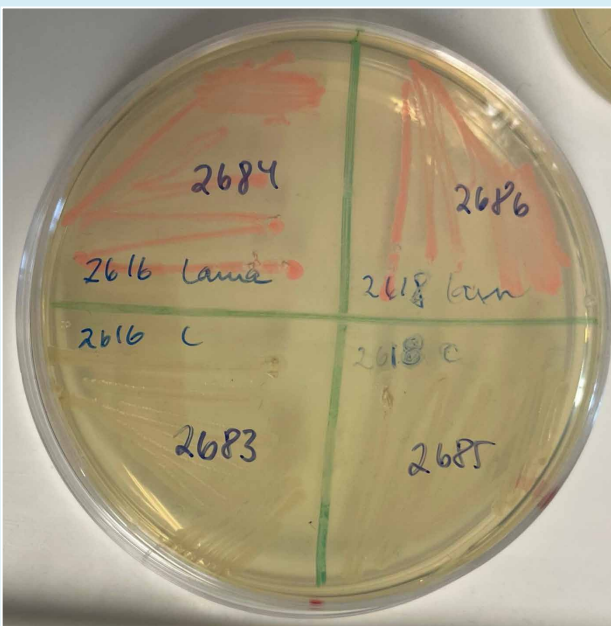


Abb. 11: Transformierte Bakterien auf einer Agarplatte: Sichtbar wird eine rote Fluoreszenz bei den Bakterien, die pLAMA enthalten.



3.4.2 Zentrifugation der Bakterien

Um einen Kurzschluss bei der Elektroporation zu vermeiden, muss das salzhaltige Medium, in dem sich die Bakterien vermehren, ausgetauscht werden. Dazu werden die Bakterien für 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute und 4 °C zentrifugiert, wobei sie sich am Boden des Zentrifugenröhrchens absetzen, und das Medium ausgetauscht werden kann. Die zuvor herbeigeführte Kompetenz der Bakterien wird weiterhin aufrechterhalten. Die Bakterien werden mit 1 ml Wasser resuspendiert und das Zentrifugenröhrchen bis 10 ml mit Wasser aufgefüllt. Es wird erneut in die Zentrifuge gesetzt und dieser Prozess wird anschließend zweimal wiederholt. Im dritten Zyklus wird die Resuspendierung zum Frostschutz mit Glycerol statt Wasser durchgeführt. Das Röhrchen wird nun weitere 15 min zentrifugiert.

3.4.3 Elektroporation der Bakterien

Elektroporation ist ein Verfahren zur zeitweisen Permeabilisierung der Zellmembran von Bakterien, durch welche Bakterien aufnahmefähig für Fremd-DNA werden. Hier soll das isolierte *tetM*-Gen in das Bakterien-Genom aufgenommen werden. Ein Elektroporator erzeugt einen elektrischen Impuls, welcher Poren in der Zellmembran des Bakteriums öffnet. Durch das Anlegen einer Spannung kommt es zur Polarisierung, die zur Erhöhung der Leitfähigkeit führt. Aufgrund von Diffusion können anschließend extrazelluläre Bestandteile aufgenommen werden. Um die Poren nach der DNA-Aufnahme wieder zu schließen, sind Temperatur und Zusammensetzung des Mediums zu beachten. Zur Integration des *tetM*-Gens mithilfe von Elektroporation wird hierbei das Lambda-Red-System genutzt.

Für die Elektroporation werden 50 µl der aufgereinigten *E. coli*-Bakterien mit 2,5 µl des *tetM*-Gens in eine spezielle Elektroporationsküvette gefüllt. Der Abstand zwischen den Platten der Elektroporationsküvette beträgt 1 mm, an welchen eine Spannung von 1800 V anliegt. Nach der Elektroporation erholen sich die Zellen für ca. 1h in einem Nährmedium. Zur Überprüfung der Antibiotikaresistenz wird anschließend eine mit Tetracyclin versetzte Agarplatte mit den transformierten *E. coli*-Bakterien angeimpft.

3.4.4 Transformation des Plasmides in *E. coli*

In dieser Arbeit sollen neben Bakterien, die pLAMA enthalten auch Bakterien entstehen, die das Kontrollplasmid pBAD enthalten, da pBAD als Grundlage von pLAMA für die Auswertung der Fluoreszenzmessung nötig ist. Des Weiteren wird neben den gentechnisch veränderten Bakterien mit *tetM*, zum Vergleich auch ein *E. coli*-Bakterium mit der Mutante *tolC* verwendet. Dieses ist durch das Herausschleusen von Tetracyclin aus dem Zellinneren resistent [17]. Es werden

somit vier Transformationen durchgeführt, sodass folgende Zelltypen entstehen:

- *tolC*-Mutante + pBAD
- *tolC*-Mutante + pLAMA
- *tetM*-Mutante + pBAD
- *tetM*-Mutante + pLAMA

Für die Transformation werden 100 µl eines *E. coli*-Stamms mit je 100 µl Transformations-Lösung gemischt und für fünf Minuten auf Eis gelagert. Anschließend werden je 0,75 µl des jeweiligen Plasmides hinzugegeben. Damit die Aufnahme-fähigkeit erreicht werden kann, ist die Lagerung zu beachten. Die Mischung wird jeweils für zehn Minuten auf Eis, bei Zim- mertemperatur und erneut auf Eis gelagert. Daraufhin wird zu jeder Lösung das Nährmedium LB (engl. lysogeny broth) hin- zugegeben, sodass die Bakterien sich erholen können. Nach ca. 1h werden die Bakterien auf eine Ampicillinplatte aufge- strichen, welche in [Abb. 11](#) zu sehen ist. Es entstehen Bakte- rien, welche das Plasmid pLAMA enthalten und somit theo- retisch Tetracyclin detektieren können. Diese Funktionalität muss durch Fluoreszenzmessungen getestet werden.

3.5 Fluoreszenzmessung

3.5.1 Anpassung der OD-Werte

Um die gemessenen Fluoreszenzwerte vergleichen zu können, müssen vor der Messung Anpassungen getroffen werden. So soll die Menge der hinzugegebenen Bakterien stets gleich sein. Daher wird die Menge der Bakterien in den einzelnen Kultu- ren durch optische Dichtemessung (kurz: OD-Messung) er- mittelt. In die erste Küvette werden 1000 µl des LB-Medium pipettiert und in die anderen Küvetten je 900 µl LB-Medium zu 100 µl Kultur. Die OD-Messung erfolgt bei 600 nm. Der OD-Wert des LB-Mediums wird von allen Werten abgezogen, da dieser OD-Wert den Hintergrund darstellt und lediglich die optische Dichte der vorkommenden Bakterien ermittelt werden soll. Die erhaltenen OD-Werte sind in [Tab. 4](#) darge- stellt. Die *tolC*-Mutante wird mit *tolC* und die *tetM*-Mutante mit *tetM* abgekürzt.

Für die Fluoreszenzmessung darf der OD-Wert 0,5 nicht überschreiten, sonst ist eine Verdünnung notwendig. Mithil- fe der OD-Werte lässt sich das benötigte Volumen der Kultur berechnen, damit der OD-Wert in 2 ml Flüssigkeit 0,1 beträgt. Multipliziert man die gewünschte optische Dichte c_2 der Kul- tur mit dem gewünschten Flüssigkeitsvolumen V_2 , entspricht dies dem Produkt aus der vorliegenden optischen Dichte c_1 und dem benötigten Volumen der Kultur V_1 (siehe Glg. 1). Da- mit kann V_1 berechnet werden (siehe [Tab. 4](#)). Die Verdünnun- gen werden nach den berechneten Angaben hergestellt.

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2 \quad (1)$$

$$V_1 = \frac{0,1 \cdot 2 \text{ ml}}{c_1}$$

Statt des LB-Nährmediums wird das Medium M9 verwendet, da dieses eine geringere Eigenfluoreszenz aufweist [\[18\]](#). Dazu werden die angepassten Verdünnungen für zwei Minuten bei 4000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wird abge- nommen und durch M9 ausgetauscht.

3.5.2 Erstellung der Verdünnungsreihe und Fluoreszenzmessung

Nach der Anpassung der OD-Werte wird eine Verdünnungs- reihe für die Fluoreszenzmessung erstellt. Hierfür wird eine Mikrotiterplatte mit 96 Wells vorbereitet. Von dieser ist in [Abb. 12](#) eine vereinfachte Darstellung zu sehen.

Zunächst werden in die Reihe A 100 µl des Nährmediums M9 pipettiert. In die weiteren Reihen werden mithilfe der Mehr- kanalpipette 100 µl M9 mit 0,2% Arabinose pipettiert. Arabi- nose ist zur Aktivierung des *araBAD*-Promotors notwendig. Des Weiteren werden in die Reihe C 100 µl Tetracyclin und in die Reihe F 100 µl Oxytetracyclin gegeben. Anschließend wird zum Herstellen der Verdünnungsreihe die Substanz der Reihe C mit der Mehrkanalpipette durch zehnmalsiges Auf- nehmen und Abgeben vermischt.

Daraufhin werden 100 µl aus der Reihe C aufgenommen und in Reihe D pipettiert. Das Vermischen und die Weitergabe in die Reihe E erfolgt analog. Nach dem Mischen werden die üb- rigen 100 µl Substanz aus Reihe E ent- sorgt. Dieser Prozess sorgt dafür, dass eine Verdünnung der Tetracyclinkonzen- tration von 5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ zu 2,5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ und schließlich zu 1,25 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ entsteht. Gleiches Vorgehen folgt von Reihe F zu H. Danach werden in die Wells entsprechend der Abbildung jeweils 100 µl der Substanzen der ober- sten Tabellenzeile gegeben. Anschließend wird mit dem Microplate Reader die Flu- oreszenzstärke des Fluoreszenzprote- ins mNeonGreen in einem Zeitraum

Tab. 4: Messwerte der optischen Dichte

Medium	tetM	tetM, pBAD	tetM, pLAMA	tolC, pBAD	tolC, pLAMA
OD-Wert der Kultur	1,75	1,77	2,41	1,51	1,44
benötigtes Kulturvolu- men V_1 in µl	114	113	83	132	139

		M9	tetM	tetM, pBAD	tetM, pLAMA	tolC, pBAD	tolC, pLAMA	M9	tetM	tetM, pBAD	tetM, pLAMA	tolC, pBAD	tolC, pLAMA
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
M9	A												
M9, Ara	B												
M9, Ara, Tet 5	C												
M9, Ara, Tet 2,5	D												
M9, Ara, Tet 1,25	E												
M9, Ara, Oxytet 5	F												
M9, Ara, Oxytet 2,5	G												
M9, Ara, Oxytet 1,25	H												

Abb. 12: Die Mikrotiterplatte wird für die Fluoreszenzmessung mit Tetracyclin in verschiedenen Konzentrationen sowie mit den Bakterienkulturen, die unterschiedliche Resistenzen und Plasmide besitzen, bestückt.



von über 12 h alle 20 min gemessen. Dafür wird mNeonGreen durch den Microplate Reader mit der spezifischen Anregungswellenlänge von 506 nm angeregt. Das emittierte Licht wird vom Microplate Reader detektiert und von der Anregungswellenlänge getrennt [19].

4. Ergebnisse

4.1 Anpassung der Fluoreszenzwerte

Die gemessenen Fluoreszenzwerte werden sowohl durch das in Anwesenheit von Tetracyclin produzierte *mNeonGreen* als auch durch die Eigenfluoreszenz des Mediums bzw. der Bakterien beeinflusst. Demzufolge werden die Fluoreszenzwerte an die entsprechenden Einflüsse angepasst, um anschließend vergleichbar vorzuliegen. Zunächst werden alle Fluoreszenzwerte FL durch die zugehörigen OD-Werte OD geteilt, um den Einfluss der verschiedenen Bakterienmengen zu begleichen. Anschließend subtrahiert man den Hintergrund von den Fluoreszenzwerten. Als Hintergrundfluoreszenz wird hierbei die Fluoreszenz der Probe ohne Zugabe von Tetracyclin verwendet (Reihe B). Zur Anpassung der gemessenen Fluoreszenz der Probe *E. coli* mit integriertem *tetM*, pLAMA, M9, Arabinose und 5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Tetracyclin (Well C4) nutzt man folglich den Hintergrund *E. coli* mit integrierten *tetM*, pLAMA, M9 und Arabinose (B4), siehe Glg. (2).

$$FL_{(C4)} = \frac{FL_{(C4)}}{OD_{(C4)}} - \frac{FL_{(B4)}}{OD_{(B4)}} \quad (2)$$

4.2 Ergebnisdiskussion

Abb. 13 zeigt die angepassten Fluoreszenzwerte für verschiedene Tetracyclinkonzentrationen in Abhängigkeit der Zeit.

Nach der Fluoreszenzanpassung zeigt die Messreihe ohne Zugabe von Tetracyclin keine Fluoreszenz. Obwohl die Probe mit der geringsten Tetracyclinkonzentration (1,25 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) zu der geringsten Fluoreszenzstärke pro Bakterium führt, wurde bei dieser die größte absolute Fluoreszenz gemessen. 33600 Sekunden nach Messbeginn überschreitet die absolute Fluoreszenz in der Probe mit der Tetracyclinkonzentration von 1,25 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ den Detektionsbereich des Microplate Readers. Daher endet die Messreihe ab diesem Zeitpunkt. Die Überschreitung des Detektionsbereich hängt mit der Vermehrung der Bakterien zusammen, welche in der Probe mit geringster Tetracyclinkonzentration am größten ist. Die absolute Fluoreszenz ist klar von den angepassten Fluoreszenzwerten abzugrenzen, welche zur Auswertung und auf allen Abbildungen verwendet werden. Bereits zu Beginn der Messung ist schon viel Fluoreszenz vorhanden, sodass der typische Fluoreszenzverlauf nicht analysiert werden kann. Demnach beschränkt sich die Auswertung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Tetracyclinkonzentration im Folgenden nur auf einen gewählten Zeitpunkt.

In Abb. 14 wird der Zeitpunkt eine Stunde (3600 s) nach Messbeginn betrachtet. Die Bakterien mit *tetM*-Mutante zeigen bei der Konzentration 1,25 und 2,5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ eine leicht höhere Fluoreszenz als die Bakterien mit *tolC*-Mutante. Bei einer Tetracyclinkonzentration von 5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ist die Fluoreszenz der Bakterien mit *tolC*-Mutante höher als die Fluoreszenz der Bakterien mit *tetM*-Mutante. Trotz dieser Unterschiede der Resistenzmechanismen steigen in beiden Fällen die Fluoreszenzwerte mit steigender Tetracyclinkonzentration an. Steigt die Tetracyclinkonzentration, so steigt die Anzahl der Schalter mit gebundenem Tetracyclin und somit die Genexpression des grünen Fluoreszenzgens *mNeonGreen*, sodass die Flu-

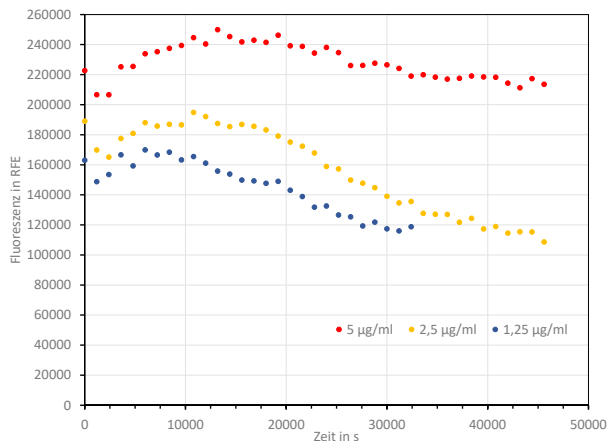


Abb. 13: Die Fluoreszenz für verschiedene Tetracyclinkonzentrationen in Abhängigkeit der Zeit.

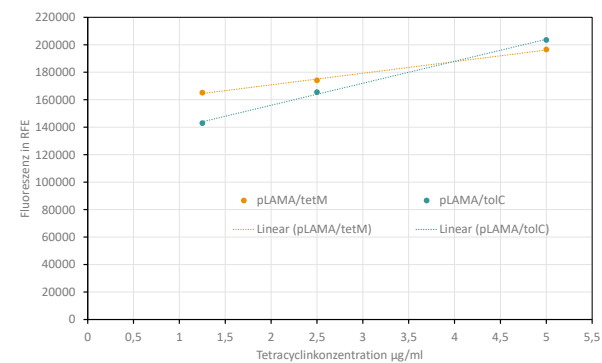


Abb. 14: Die Fluoreszenz nach einer Stunde in Abhängigkeit der Tetracyclinkonzentration für zwei Resistenzmechanismen

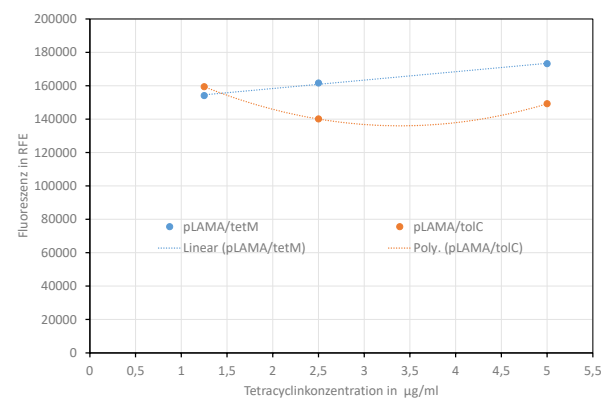


Abb. 15: Die Fluoreszenz nach einer Stunde in Abhängigkeit der Oxytetracyclinkonzentration für zwei Resistenzmechanismen.

oreszenzstärke steigt. Diese theoretischen Überlegungen sind mit den gemessenen Werten vereinbar.

Zusätzlich wurde die Fluoreszenz bei Vorkommen von Oxytetracyclin ausgewertet. Hierbei wurde ebenfalls der Zeitpunkt eine Stunde nach Messbeginn gewählt (siehe [Abb. 15](#)). Bei der *tetM*-Mutante steigt die Fluoreszenz mit zunehmender Oxytetracyclinkonzentration an. Somit lässt sich schlussfolgern, dass auch Oxytetracyclin an den Riboschalter gebunden werden kann und die Genexpression des Fluoreszenzgens bewirkt. Bei der *tolC*-Mutante hingegen sinkt die Fluoreszenz von 1,25 auf 2,5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ und steigt von 2,5 auf 5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ an.

In die Bakterien wurde kein Resistenzgen für Oxytetracyclin integriert. Die steigende Oxytetracyclinkonzentration bewirkt bei unzureichender Resistenz neben der vermehrten Tetracyclinbindung an den Riboschaltern auch das Absterben der Bakterien. Die Messwerte lassen vermuten, dass die *tetM*-Mutation in dem verwendeten Konzentrationsbereich auch zur Herstellung einer Oxytetracyclinresistenz genügt, während die *tolC*-Mutante zur Herstellung einer Oxytetracyclinresistenz schlechter geeignet ist. Bei Vorkommen von Oxytetracyclin ist dennoch bei beiden Resistenzmechanismen eine Fluoreszenz zu erkennen.

4.3 Fehlerbetrachtung

Verschiedene Fehlerquellen können die Messergebnisse beeinflussen. Zu diesen Fehlerquellen zählt neben dem Messgerätefehler, der zu kleinen Messungenauigkeiten führen kann, auch der zeitliche Beginn der Messung. Um den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz für die Auswertung heranziehen zu können, muss die Messung unmittelbar nach der Bestückung der Mikrotiterplatte erfolgen. Da der Schalter zur Tetracyclindetektion entworfen wurde, wurde bisher kein Resistenzgen für Oxytetracyclin integriert. Durch diese fehlende Oxytetracyclinresistenz bei der *tolC*-Mutante, wird die quantitative Oxytetracyclindetektion verhindert. Mit dem Integrieren einer Resistenz sind somit Änderungen in den Messwerten der *tolC*-Mutante zu erwarten, welche dem Messwertverlauf der *tetM*-Mutante stärker ähneln. Besonders zu beachten ist außerdem, dass lediglich im Duplikat gemessen wurde. Um ein repräsentativeres Ergebnis zu erhalten, müssten mehr Messreihen durchgeführt werden.

5. Fazit und Ausblick

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, mithilfe eines RNA-basierten Sensors in einem Bakterium das Vorkommen des Antibiotikums Tetracyclin zu erkennen. Der entwickelte Sensor zeigt nicht nur das Tetracyclinvorkommen, sondern darüber hinaus auch das Vorkommen des Antibiotikums Oxytetracyclin an. Indem der Schalter Rückstände beider Antibiotika in der Umwelt sichtbar macht, bie-

tet dieser das Potential, einen wertvollen Beitrag zur Eindämmung von Antibiotikaresistenzen zu leisten.

Zunächst wurde der Schalter im Konzentrationsbereich von 1,25 bis 5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Tetracyclin getestet, ein Bereich, der auch in der praktischen Anwendung relevant ist. Bereits bei diesen hohen Konzentrationen genügte die Resistenz der Bakterien für eine qualitative Tetracyclindetektion. Zudem lässt der Anstieg der Fluoreszenz mit steigender Tetracyclinkonzentration quantitative Abschätzungen zu. Um den Schalter tatsächlich zur quantitativen Detektion einzusetzen, sind noch weitere Messungen und eventuelle Verbesserungen nötig.

Optimierungen, wie das Einsetzen einer Oxytetracyclinresistenz, können dazu beitragen, eine ausreichende Resistenz der Bakterien zur quantitativen Oxytetracyclindetektion zu schaffen. Zur Verstärkung der Resistenz ist das Einsetzen eines zusätzlichen Plasmides mit Tetracyclinresistenz in die Bakterien möglich. In zukünftigen Messungen können nicht nur andere Konzentrationsbereiche getestet werden, sondern es kann auch begonnen werden, mithilfe des Schalters Proben aus der Umwelt, wie etwa Fleischproben aus dem Supermarkt, auf Tetracyclin zu untersuchen.

Trotz zahlreicher Optimierungsmöglichkeiten ist der Schalter bereits jetzt in der Lage, Antibiotikarückstände zuverlässig anzuzeigen und hohe Tetracyclinvorkommen in der Umwelt frühzeitig zu entdecken. Dadurch wird die Möglichkeit geschaffen, gezielt Maßnahmen zu ergreifen, um der Entstehung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen entgegenzuwirken. So kann langfristig das Risiko für Infektionen mit resistenten Bakterien reduziert werden.

Danksagung

Wir sind Dr. Kathrin Fröhlich und dem Institut für Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena zu großem Dank verpflichtet. Ohne die fachliche Unterstützung im Labor, bei Videokonferenzen und das Einverständnis zur Nutzung der Geräte wäre die Umsetzung dieses Projektes nicht möglich gewesen. Wir bedanken uns außerdem bei unserer Betreuerin Katrin Hoppe und Carmen Wurzbacher für das Probieren der Arbeit und die wertvollen Hinweise. Des Weiteren bedanken wir uns bei unserer Klassenkameradin Alia Hapich, die mit großartigen Ideen unsere Arbeit unterstützt hat.

Literaturverzeichnis

- [1] Clanner-Engelshofen, Benjamin (2021). *Tetracyclin*. url: <https://www.net-doktor.de/medikamente/tetracyclin/>. (abgerufen am 19.12.2023).
- [2] Speer, Brenda S.; et al (1992). "Bacterial Resistance to Tetracycline: Mechanisms, Transfer, and Clinical Significance". In: *Clinical Microbiology Reviews*, S. 387.

- [3] Helmich, Ulrich (2022). RNA. url: <https://www.u-helmich.de/bio/gen/reihe2/23/karte2321.html>. (abgerufen am 26.02.2026).
- [4] Weigand, Julia E.; Suess, Beatrix (2009). "Synthetische Riboswitche". In: *Biospektrum* 15, S. 42–44.
- [5] Domin, Gesine; et al. (2016). "Applicability of a computational design approach for synthetic riboswitches". In: *Nucleic Acids Research*, S. 4108–4119
- [6] Campbell, Neil A. (2010). *Biologie: Gymnasiale Oberstufe*. Pearson Studium, S. 251–252, 309, 530.
- [7] Alberts, Bruce; et al. (2004). *Molekularbiologie der Zelle*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [8] Nordheim, Alfred; et al. (2015). *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag KG., Stuttgart, S. 111, 531–532.
- [9] Lahn, Bruce als Vertreter von VectorBuilder (o. D.). *pBAD bakterieller rekombinanter Proteinvektor*. url: <https://en.vectorbuilder.com/resources/vector-system/pBAD.html>. (abgerufen am 25.04.2024).
- [10] Sauermost, Rolf als Vertreter von Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1999). *tac-Promotor*. url: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/tac-promotor/65227>. (abgerufen am 22.03.2024).
- [11] Karpus, Lauryas (2017). *Rop protein - global copy number inhibitor*. url: https://parts.igem.org/Part:BBa_K2259010. (abgerufen am 11.09.2024).
- [12] Spelsberg, Gerd als Verantwortlicher des Bio- und Gentechnologie e.V. (o. D.). *Lexikon - Ampicillin-Resistenz*. url: <https://www.transgen.de/lexikon/1645.ampicillin-resistenz.html>. (abgerufen am 19.03.2024).
- [13] Jahnson Monika; Rothhämel, Sophie (2018). *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, S. 68–72, 107–115, 135–141, 353–354.
- [14] Matlock, Brian (2015). "Assessment of Nucleic Acid Purity". In: *Thermo Fisher Scientific* 42646, S. 1–2.
- [15] Gibson, Daniel G. (2012). *Methods in Enzymology. Enzymatic Assembly of Overlapping DNA Fragments*. Academic Press, S. 349–361.
- [16] Gibson, Daniel G.; et. al (2015). *Methods for in vitro joining combinatorial assembly of nucleic acid molecules*. url: <https://patents.google.com/patent/US8968999B2/en>. US 2012/0053087, S.12–14.
- [17] Bridge, Alan als Vertreter von UniProt (2021). *P02930TOLC_ECOLI*. url: https://www.uniprot.org/uni_prot/kb/P02930/entry. (abgerufen am 23.09.2024).
- [18] Karp, Dr. Peter als Vertreter von SRI International (o. D.). *Wachstumsmedium: M9-Medium*. url: <https://biocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=Growth-Media&object=MIXO-59>. (abgerufen am 14.09.2024).
- [19] Rübiger, Thomas als Verantwortlicher der BMG Labtech (2024). *Microplate Reader*. url: <https://www.bmg-labtech.com/de/microplate-reader/>. (abgerufen am 10.09.2024).
- [20] Harbaugh, Svetlana; et. al (2022). "Riboswitches as Sensor Entities". In: *Handbook of Cell Biosensors*, S. 3

Verwendete Websites

- OligoCalc url: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>
- MultAlign url: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
- Expasy url: <https://web.expasy.org/translate/>
- UniProt url: <https://www.uniprot.org/align>

Als Schüler*in wissenschaftlich publizieren

Wie auch aus deiner Wettbewerbsarbeit eine zitierfähige Veröffentlichung wird

Was ist eine wissenschaftliche Veröffentlichung?

Wissenschaftliche Publikationen, sogenannte Papers, sind ein zentrales Element wissenschaftlichen Arbeitens. In Papers werden nicht nur Zeitpunkt und Stand einer Erkenntnis öffentlich dokumentiert, sondern auch mit der Wissenschafts-Community geteilt. So lässt man Kolleg*innen derselben Fachrichtung an Ergebnissen teilhaben oder zeigt progressive Forschungsansätze auf.

Was kostet die Veröffentlichung?

Für die Autor*innen fallen keinerlei Veröffentlichungsgebühren (*page charges*) an. Alle Kosten z. B. für Redaktion, Lektorat, Layout, Website und App tragen Verlag und Sponsoren. Verlag ist die Physikalisch-Technische Bundesanstalt PTB, die das Projekt seit Gründung begleitet.

Was ist besonders an einer wissenschaftlichen Veröffentlichung?

Die Besonderheit eines echten, wissenschaftlichen Papers ist, dass es *peer reviewed* ist. Der Begriff setzt sich zusammen aus den englischen Wörtern *peer* für „Kolleg*in“ und *reviewed* für „überprüft“ (*review* = die Überprüfung). Die Arbeit wird also von einem / einer meist anonymen Fachkolleg*in, der oder dem *referee*, auf Schlüssigkeit überprüft. Die Arbeit ist somit gecheckt und kann als Basis für weitere Forschungsvorhaben genutzt werden.

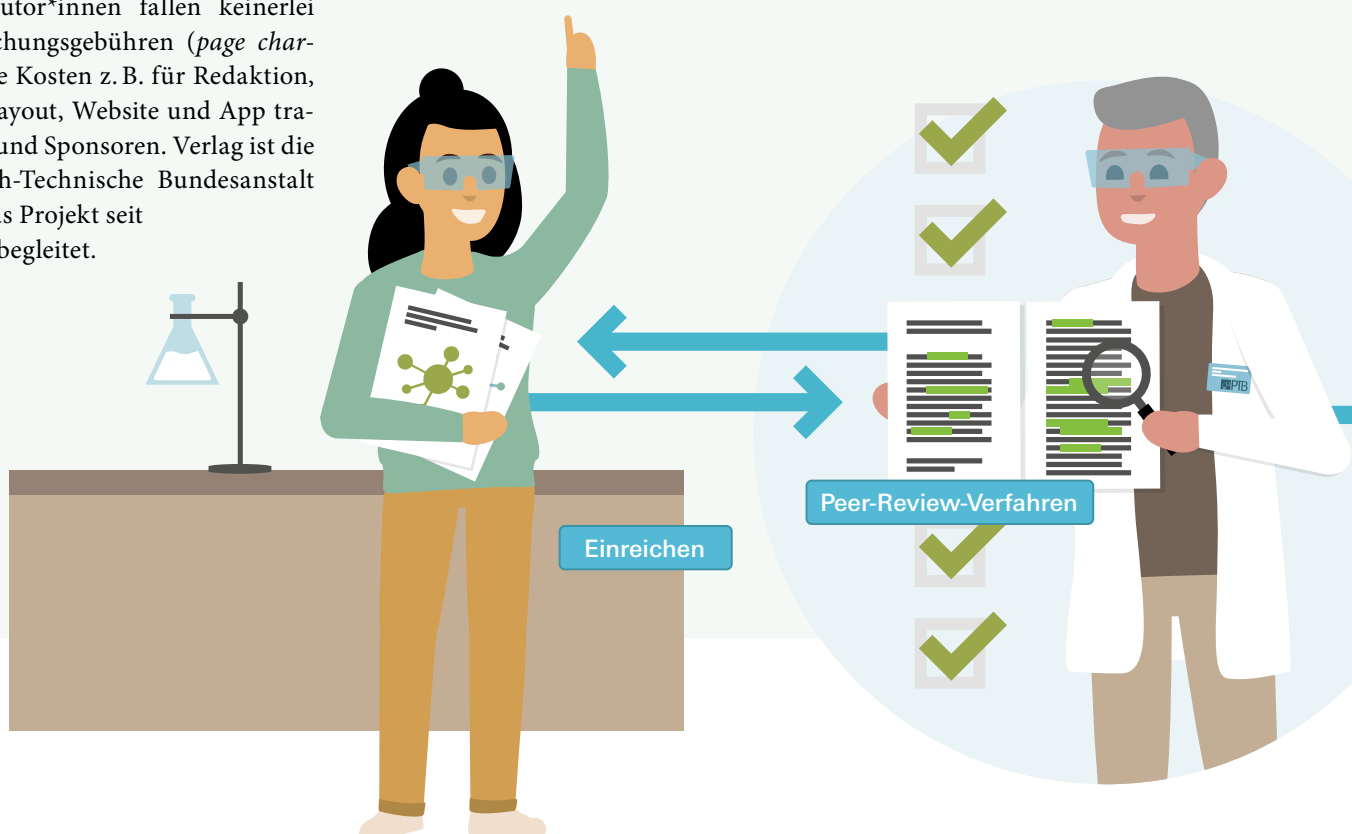


Hast du Fragen? In den FAQs auf der Seite „Für Autor*innen“ findest du Antworten.

www.junge-wissenschaft.ptb.de/fuer-autorinnen

Wieso wissenschaftlich publizieren?

Diese Papers dienen nicht nur dem fachlichen Austausch, sondern auch als Nachweis der erbrachten Leistungen im jeweiligen Spezialgebiet. Wie ein Lebenslauf informiert die Veröffentlichungsliste über den beruflichen Werdegang und wissenschaftlichen Erfolg.



Wie geht das und wie viel Arbeit muss ich investieren?

Die Junge Wissenschaft (JuWi) ist die einzige Plattform, auf der bereits Schüler*innen ein erstes Paper, *peer reviewed*, veröffentlichen können. Das von der JuWi-Chefredaktion eingeleitete und begleitete Peer-Review-Verfahren macht aus deinem Wettbewerbsbeitrag eine zitierfähige Veröffentlichung. Ein JuWi-Paper ist der Startschuss für deine persönliche Veröffentlichungsliste. Und als erfolgreiche Teilnehmer*in eines Forschungswettbewerbs hast du den Löwenanteil der Arbeit bereits erledigt.

Sende deine Arbeit und die Erstveröffentlichungserklärung an:

Chefredaktion
Junge Wissenschaft

Dr.-Ing. Sabine Walter
Paul-Ducros-Straße 7
30952 Ronnenberg

Tel: 05109 / 561508
Mail: sabine.walter@verlag-jungewissenschaft.de



Wie geht es nach dem Einreichen weiter?

Die Chefredakteurin sucht einen geeigneten Fachgutachter*in, der bzw. die, die inhaltliche Richtigkeit der eingereichten Arbeit überprüft und eine Empfehlung ausspricht, ob sie veröffentlicht werden kann (Peer-Review-Verfahren). Das Gutachten wird dir zugeschickt und du erhältst die Möglichkeit, Hinweise des oder der Fachgutachter*in oder eigene Änderungen einzuarbeiten. Die Erfahrung zeigt, dass Arbeiten, die z. B. im Rahmen eines Wettbewerbs wie Jugend forscht die Endrunde erreicht haben, die besten Chancen haben, dieses Peer-Review-Verfahren zu bestehen. Bis hierhin hast du keinerlei Arbeit investiert.

Schließlich kommt die Arbeit in die Redaktion, wird für das Layout vorbereitet und nach der Freigabe als Open-Access-Beitrag, also für jedermann zugänglich, veröffentlicht.

Was bringt es mir?

JuWi-Autor*innen erwerben in der engen Zusammenarbeit mit der Redaktion Kenntnis über den Aufbau einer wissenschaftlichen Arbeit, über wissenschaftlichen Schreibstil, worauf zu achten ist und welche Schritte wann notwendig sind. Autor*innen eines JuWi-Papers haben so sehr früh einen bedeutenden Teil wissenschaftlichen Publizierens erlernt, noch bevor sie an die Hochschule gehen.

Impressum

Junge Wissenschaft

c/o Physikalisch-Technische
Bundesanstalt (PTB)
www.junge-wissenschaft.ptb.de

Redaktion

Dr.-Ing. Sabine Walter,
Chefredaktion Junge Wissenschaft
Paul-Ducros-Str. 7
30952 Ronnenberg
E-Mail: sabine.walter@verlag-jungewissenschaft.de
Tel.: 05109 / 561 508



Sabine Siems, Verlag
E-Mail: sabine.siems@ptb.de
Tel.: 0531 / 592 8202



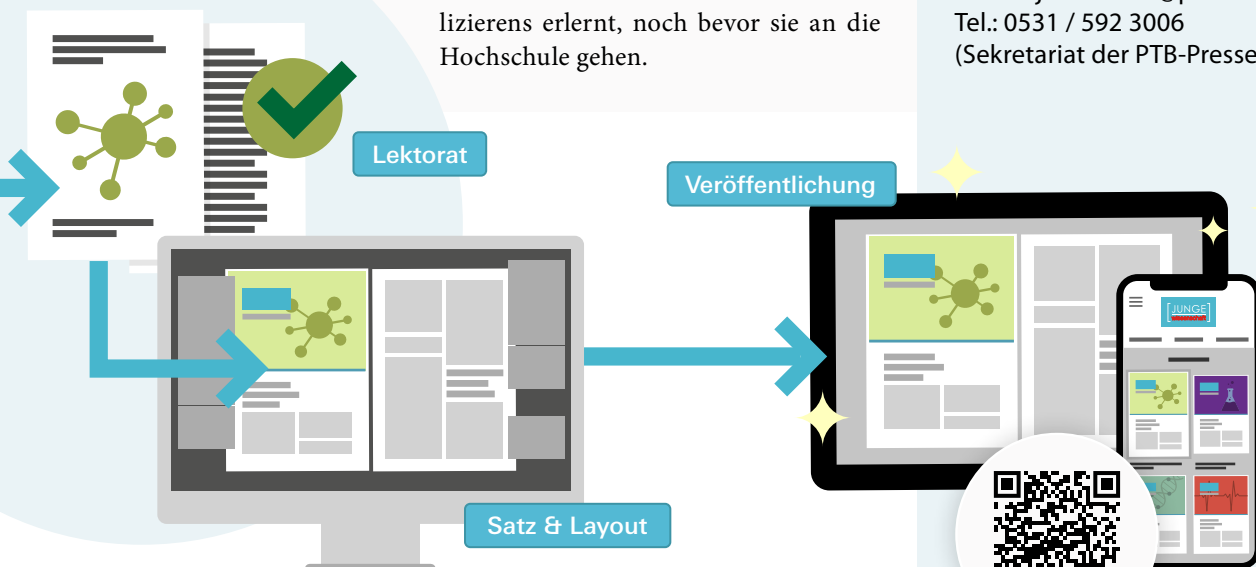
Design & Satz

Sebastian Baumeister
Art Director / stilsicher.design
E-Mail: baumeister@stilsicher.design
Tel.: 05142 / 302 99 04



Verlag

Dr. Dr. Jens Simon,
Pressesprecher der PTB
Bundesallee 100
38116 Braunschweig
E-Mail: jens.simon@ptb.de
Tel.: 0531 / 592 3006
(Sekretariat der PTB-Pressestelle)



Dein Ticket zur Wissenschaft

Jungforscher*innen publizieren online | *peer reviewed* | original



Die PTB ist jetzt auch bei Instagram. Auf dem Kanal @ptb.bund findest du auch unsere JuWi-Beiträge.

