



**Generierung fluoreszenzmarkierter  
*Enterococcus sp.* für  
Übertragungsexperimente in Lepidoptera  
Larven, *Spodoptera littoralis***



**Bachelorarbeit**

Im Studiengang Biotechnologie, EAH Jena  
angefertigt am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie  
Abteilung Bioorganische Chemie

vorgelegt von  
Pauline Gehb  
Mat. Nr. 633954

Jena, im August 2013

# Inhaltsverzeichnis

## I. Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. Inhaltsverzeichnis</b>   | <b>1</b>  |
| <b>II. Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>5</b>  |
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>7</b>  |
| <b>2. Materialien und Methoden</b>   | <b>11</b> |
| <b>2.1 Materialien</b>   | <b>11</b> |
| <b>2.2 Methoden</b>  | <b>16</b> |
| 2.2.1 Selektion von <i>Enterococcus mundtii</i> mittels Antibiotika  | 16        |
| 2.2.2 Reduzierung der natürlichen <i>Enterococcus sp.</i> aus der Darmflora von <i>Spodoptera littoralis</i>                                 | 17        |
| 2.2.3 Sezierung von <i>Spodoptera littoralis</i> Larven  | 17        |
| 2.2.4 Nachweis von <i>Enterococcus mundtii</i> im Darm von <i>Spodoptera littoralis</i> mittels DNS-Extraktion aus Darmgewebe und -Bakterien | 18        |
| 2.2.5 Transformation von <i>Enterococcus mundtii</i>   | 18        |
| 2.2.6 Nachweis transformierter Plasmide im Bakterium   | 20        |
| 2.2.7 Transformantentest mit und ohne antibiotikahaltigem Medium   | 21        |
| 2.2.8 Einbringen der <i>Enterococcus mundtii</i> Transformanten in den Darm von <i>Spodoptera littoralis</i>                                 | 23        |
| 2.2.9 Nachweis der Transformanten im Darm der <i>Spodoptera littoralis</i>   | 23        |
| <b>3. Ergebnisse</b>   | <b>25</b> |
| <b>3.1 Selektion von <i>Enterococcus mundtii</i> mittels Antibiotika</b>   | <b>25</b> |
| <b>3.2. Wachstumsverlauf von <i>Spodoptera littoralis</i></b>  | <b>27</b> |
| <b>3.3 Nachweis von <i>Enterococcus mundtii</i> im Darm von <i>Spodoptera littoralis</i></b>   | <b>28</b> |
| <b>3.4 Transformation von <i>Enterococcus mundtii</i></b>  | <b>29</b> |
| <b>3.5 Nachweis einklonierter Plasmide bzw. in das Bakteriengenom integrierter Plasmid-DNS</b>   | <b>30</b> |

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| 3.5.1 Nachweis mit DNS-Extraktion und PCR  | 30        |
| 3.5.2 Testung auf das Plasmid bzw. in das Bakterienchromosom integrierte Plasmid-DNS bei Kultivierung mit und ohne Antibiotika | 32        |
| 3.5.3 Fluoreszenzmessungen der Transformanten  | 35        |
| <b>3.6 Nachweis der Transformanten im Generationskreislauf der <i>Spodoptera littoralis</i></b>                                | <b>38</b> |
| 3.6.1 DNS-Extraktion mit anschließender PCR und Gelelektrophorese  | 38        |
| 3.6.2 Ausplattierung   | 39        |
| <b>4. Diskussion</b>   | <b>44</b> |
| 4.1 Selektion von <i>Enterococcus mundtii</i> mittels Antibiotika  | 44        |
| 4.2 Wachstumsverlauf der <i>Spodoptera littoralis</i> Larven   | 45        |
| 4.3 Nachweis von <i>Enterococcus mundtii</i> im Darm von <i>Spodoptera littoralis</i>  | 46        |
| 4.4 Transformation von <i>Enterococcus mundtii</i>   | 47        |
| 4.5 Nachweis von Plasmiden in den Transformanten   | 48        |
| 4.5.1 DNS-Extraktion mit anschließender PCR und Gelelektrophorese  | 48        |
| 4.5.2 Testung auf Plasmid bzw. in das Bakterienchromosom integrierte Plasmid-DNS bei Kultivierung mit und ohne Antibiotika     | 49        |
| 4.5.3 Fluoreszenzmessung der Transformanten  | 51        |
| 4.6 Nachweis der Transformanten in <i>Spodoptera littoralis</i>  | 53        |
| 4.6.1 <i>Spodoptera littoralis</i> Larven  | 53        |
| 4.6.2 <i>Spodoptera littoralis</i> Puppen  | 54        |
| 4.6.3 <i>Spodoptera littoralis</i> Falter  | 56        |
| <b>5. Zusammenfassung</b>  | <b>58</b> |
| <b>6. Literaturverzeichnis</b>   | <b>59</b> |
| <b>7. Abbildungsverzeichnis</b>  | <b>61</b> |
| <b>8. Tabellenverzeichnis</b>  | <b>65</b> |

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>9. Anhang</b>                       | <b>66</b> |
| <b>10. Danksagung</b>                  | <b>74</b> |
| <b>11. Selbstständigkeitserklärung</b> | <b>76</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

### II. Abkürzungsverzeichnis

|                         |  |
|-------------------------|--|
| PBS                     | Phosphate buffered saline  |
| TAE                     | Tris-Acetat-EDTA   |
| LB                      | Lysogenic-Broth  |
| THB                     | Todd Hewitt Broth  |
| Aqua dest.              | Aqua destillata  |
| OD <sub>600</sub>       | Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm   |
| GFP                     | Grün-Fluoreszentes-Protein   |
| EGFP                    | Enhanced (verstärktes) Grün-Fluoreszents-Protein   |
| CFU                     | Colony-forming units   |
| <i>E. mundtii</i>       | <i>Enterococcus mundtii</i>  |
| <i>E. coli</i>          | <i>Escherichia coli</i>  |
| <i>E. casseliflavus</i> | <i>Enterococcus casseliflavus</i>  |
| <i>S. littoralis</i>    | <i>Spodoptera littoralis</i>   |
| B                       | <i>S. littoralis</i> Larven, 5 Tage mit Antibiotikamischung, danach mit pALSM02 transformierten <i>E. mundtii</i> ohne Antibiotika gefüttert                           |
| BE                      | <i>S. littoralis</i> Larven, 5 Tage mit Antibiotikamischung, danach mit pALSM02 transformierten <i>E. mundtii</i> und Antibiotika gefüttert                            |
| KB                      | <i>S. littoralis</i> Larven, 5 Tage ohne Antibiotikamischung, danach mit pALSM02 transformierten <i>E. mundtii</i> ohne Antibiotika gefüttert                          |
| KBE                     | <i>S. littoralis</i> Larven, 5 Tage ohne Antibiotikamischung, danach mit pALSM02 transformierten <i>E. mundtii</i> und Antibiotika gefüttert                           |
| Bp                      | <i>S. littoralis</i> Puppen der Larven, die 5 Tage mit Antibiotikamischung, danach mit pALSM02 transformierten <i>E. mundtii</i> und ohne Antibiotika gefüttert wurden |

## Abkürzungsverzeichnis

|       |   |
|-------|---|
| BEp   | <i>S. littoralis</i> Puppen der Larven, die 5 Tage mit Antibiotikamischung, danach mit pALSM02 transformierten <i>E. mundtii</i> und mit Antibiotika gefüttert wurden   |
| KBp   | <i>S. littoralis</i> Puppen der Larven, die 5 Tage ohne Antibiotikamischung, danach mit pALSM02 transformierten <i>E. mundtii</i> und ohne Antibiotika gefüttert wurden |
| KEBp  | <i>S. littoralis</i> Puppen der Larven, die 5 Tage ohne Antibiotikamischung, danach mit pALSM02 transformierten <i>E. mundtii</i> und mit Antibiotika gefüttert wurden  |
| P02   | Mit pALSM02 transformierte <i>E. coli</i> , kultiviert in antibiotikafreiem LB-Medium   |
| P02-E | Mit pALSM02 transformierte <i>E. coli</i> , kultiviert in erythromycinhaltigem (4 µl/ml) LB-Medium  |
| T1    | Erste Transformante – mit pALSM02 transformierte <i>E. mundtii</i> , kultiviert in antibiotikafreier THB  |
| T1-E  | Erste Transformante – mit pALSM02 transformierte <i>E. mundtii</i> , kultiviert in erythromycinhaltiger (4 µl/ml) THB   |
| T2    | Zweite Transformante – mit pALSM02 transformierte <i>E. mundtii</i> , kultiviert in antibiotikafreier THB   |
| T2-E  | Zweite Transformante – mit pALSM02 transformierte <i>E. mundtii</i> , kultiviert in erythromycinhaltiger (4 µl/ml) THB  |

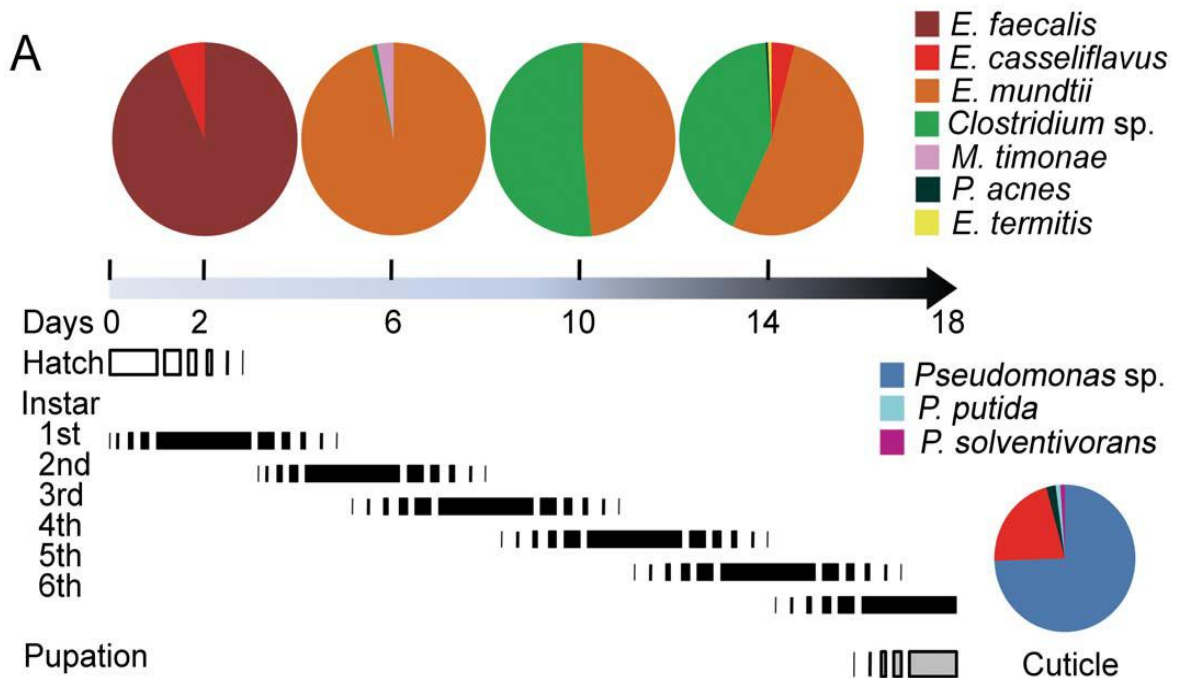
## Einleitung

### 1. Einleitung

Stellen sie sich vor, es gibt eine Möglichkeit, Pflanzenschädlinge umweltfreundlich zu bekämpfen, eine Bekämpfung ohne Nebenwirkungen für Mensch und Tier. Ernteerträge können gesteigert werden und so der Hunger vieler Menschen in zahlreichen Gebieten der Erde gelindert werden. Feld- und Plantagenarbeiter wären keinen schädlichen Chemikalien und keinen gravierenden Gesundheitsrisiken mehr ausgesetzt.

Der Organismus *Spodoptera littoralis* stellt als Agrarschädling ein sehr interessantes Forschungsobjekt dar. Diese Insekten sind Generalisten und haben kaum Einschränkungen in ihrem Futterspektrum. Sie können toxische Nahrung detoxifizieren ohne dabei Schaden zu nehmen. Um die Frage zu klären warum *Spodoptera littoralis* ein so weites Nahrungsspektrum aufweist, entstand die Vermutung, dass dies möglicherweise in Verbindung mit deren Darmbakterien steht. Tang et al. fand heraus, dass nach Fütterung der Larven mit der toxischen Limabohne die Darmmikrobiota einen dramatischen Unterschied in ihrer Zusammensetzung im Vergleich zu normalen, mit künstlichem Futter gefütterten, Larven aufwies (Tang et al., 2012). Weiterhin untersuchte Dr. Xiaoshu Tang den Organismus der *S. littoralis* Larven auf die Zusammensetzung der Darmflora und deren Interaktion mit dem Wirtsorganismus (Tang et al., 2012). Bei Betrachtung der Darmmikrobiota der *S. littoralis* wurde bei frisch geschlüpften Larven bereits *E. faecalis* und *E. casseliflavus* festgestellt. Erst bei älteren Larven begann *E. mundtii* zu dominieren, wohingegen die Zahl der *E. casseliflavus* nach sechs Tagen abnahm. In zehn Tage alten Larven wurde *Clostridium sp.* neben *E. mundtii* dominant. Nach vierzehn Tagen überstieg die Anzahl der *E. mundtii* die der *Clostridium sp.* (Abb. 1) (Tang et al., 2012).

## Einleitung



**Abbildung 1:** Verschiedene Zusammensetzungen der Darmmikrobiota in *S. littoralis* Larven in verschiedenen Larvenstadien bei künstlicher Ernährung. Bakterielle Zusammensetzung, detektiert durch Klonierungen und Sequenzierungen von Insekten die 2 Tage (n = 33), 6 Tage (n = 104), 10 Tage (n = 232), und 14 Tage (n = 490) alt sind, der Pfeil repräsentiert die Lebensdauer der *S. littoralis* Larven. Die Entwicklungsstadien, das Schlüpfen, Verpuppung und Larvenstadien sind durch Balken dargestellt. Der Einschub zeigt die relative Häufigkeit von Bakterien auf dem Epithel von 10 Tage alten Larven (n = 94). (Tang et al., 2012)

Die Zusammensetzung der Darmmikrobiota von *S. littoralis* war nun bekannt, jedoch nicht, ob die dominierenden Bakterienarten während des Entwicklungszyklus der *S. littoralis* im Darm weitergegeben werden oder bei der Verpuppung verlorengehen und durch die Nahrungsaufnahme der Falter neu im Darm angesiedelt werden. Sicher ist nur, dass durch die Nahrung aufgenommene, nicht im Darm vorhandene, Bakterien durch pH-Wert und Verdauungsenzyme abgetötet werden können. Bakterien, die mit der Nahrung aufgenommen werden und bereits in der Darmmikrobiota vorhanden sind, können sich ansiedeln und integriert werden. (Tang et al., 2012).

Um zu klären, wie die Insekten mit den Bakterien interagieren und die Metamorphose überleben, entstand die Idee eine Kernbakterienart des *S. littoralis*-Larvendarms, *E. mundtii*, mit einem Grünfluoreszenz-Protein(GFP)-Gen zu transformieren und diese den Larven zu zufüttern, mit dem Ziel, sich in der Darmflora anzusiedeln. Durch das von den Transformanten produzierte GFP wäre nun eine Beobachtung der Darmbakterien, bei einer Wellenlänge von 483 nm und 512 nm, über den gesamten Entwicklungszyklus von



## Einleitung

*S. littoralis* hinaus möglich. Durch die GFP-markierten *E. mundtii* kann nun optisch nachgewiesen werden wo diese sich im Darm bevorzugt ansiedeln und wie sie die Stadien der Metamorphose überleben. Mit Hilfe anderer Nachweisverfahren, wie DNS-Extraktion mit anschließender PCR und Gelelektrophorese, kann allgemein festgestellt werden, ob die zugefütterten Transformanten sich in der Darmflora angesiedelt haben und bei den verschiedenen Entwicklungsstadien weitergegeben wurden. Um die Aufnahme der Transformanten in die Darmflora zu erleichtern, sollen die frisch geschlüpften Larven mit Antibiotika gefüttert werden, um so die natürlich im Darm vorkommenden *E. mundtii* zu dezimieren. Die Transformanten sollen so bei der Ansiedlung keinem Konkurrenzdruck unterliegen.

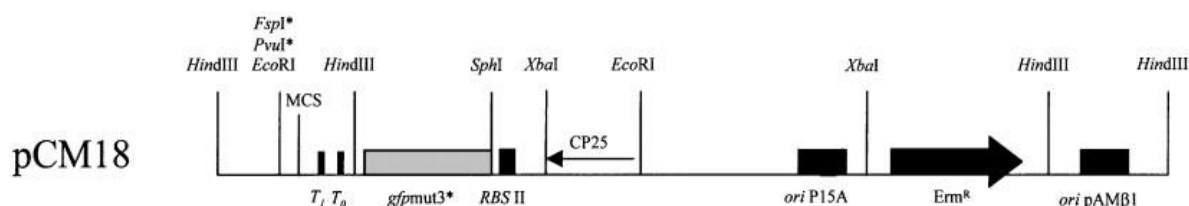
Dafür ist zunächst eine Selektion verschiedener *E. mundtii* Stämme mittels Antibiotika nötig. Es muss herausgefunden werden, gegen welche Antibiotika Resistenzen vorhanden sind. Dies ist notwendig, um zu wissen welche GFP- und Antibiotikaresistenzgen-codierenden Plasmide sich für eine Transformation eignen. Zudem werden verschiedenen GFP-codierende Plasmide und Transformationsmöglichkeiten getestet, mit dem Ziel, das für die Transformation von *E. mundtii* am besten geeigneten Plasmid und die am besten geeignete Transformationsmethode zu finden.

Bis jetzt ist über die Transformationsmöglichkeiten der gram-positiven *E. mundtii* noch nicht viel bekannt. Es wurde im Vorfeld des Versuchs nach GFP-codierenden Plasmiden gesucht, welche sich zur Transformation gram-positiver Bakterien eignen und somit auch in *E. mundtii* transformiert werden könnten. Plasmide, die die gewünschten Eigenschaften codieren und in *E. mundtii* transformiert werden sollen, sind pALSM01, pALSM02, pBSU100, pBSU101 und pCM18 (Lemme et al., 2011) (Aymanny et al., 2011) (Hansen et al., 2001).

Ein weiteres Ziel war es, eine geeignete Transformationsmethode und ein sich für die *E. mundtii*-Transformation eignendes, GFP-codierendes, Plasmid zu finden. pALSM01 codiert den *recA* Promoter aus *Streptococcus pyogenes* und ist ein Derivat des Plasmids pAT18. pALSM02 ist ein Derivat des pALSM01. Lemme et al. konnte bereits beide Plasmide, welche ein Erythromycin-resistenzgen codieren, erfolgreich in gram-positive *Streptococcus mutans* transformieren (Lemme et al., 2011). Der Vektor pAT18 konnte zudem von Trieu-Cuot et al. in *E. faecalis* transformiert werden (Trieu-Cuot et al., 1991).

## Einleitung

Die Plasmide pBSU100 und pBSU101 sind Derivate von pAT28. Um pBSU101 zu erhalten, wurde die Promotorregion von *Streptococcus agalactiae cfb* in pBSU100 kloniert. Beide Plasmide codieren eine Spectinomycinresistenz von 125 mg/l und konnten bereits erfolgreich mittels Elektroporation in *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* transformiert werden (Aymanny et al., 2011). Der lineare Aufbau von pCM18 wird in Abb. 2 dargestellt. Mit Hilfe von hitzeinaktiviertem Pferdeserum konnte dieses Plasmid bereits erfolgreich in gram-positive *Streptococcus gordonii* transformiert werden. Da sich alle Plasmide bereits in gram-positive Bakterien und zum Teil auch Enterokokken transformieren ließen, besteht die Hoffnung, dass dies auch bei der Transformation von *E. mundtii* funktioniert.



**Abbildung 2:** Genetische und physikalische Karte des Plasmidvektors pCM18. Nur relevante Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Abkürzungen: MCS) multiple cloning site; T<sub>1</sub>) Transkriptionsterminator aus dem *rrnB* Operon von *E. coli*; T<sub>0</sub>) Transkriptionsterminator von Phage lambda; *gfpmut3\**) Gen codierendes Gfpmut3\* (S2R, S65G, S72A); RBSII) synthetische Ribosomenbindungsstelle; CP25) synthetischer konstitutiver Lactococcus-Promoter; *ori*) Replikationsursprung (Origin); Erm<sup>R</sup>) Erythromycinresistenzgen (Hansen et al., 2001)

Nach erfolgreicher Transformation sollen die Transformanten in die Darmflora von *S. littoralis* Larven integriert werden, um sie während des Entwicklungszyklus im Organismus beobachten zu können.

Sind die Experimente erfolgreich, wird es möglich sein die Beteiligung der Darmbakterien an den Verdauungsvorgänge der Larven besser zu analysieren sowie die Darmmikrobiota bei der Metamorphose während der Entwicklungsstadien zu verfolgen. Wenn die Verdauungsvorgänge in den Insektendärmen komplett erforscht sind und die Interaktionen zwischen Insekten und Darmbakterien verstanden werden, wird es möglich sein, neue Strategien der Schädlingsbekämpfung zu entwickeln (Tang et al., 2012).

# Materialien und Methoden

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### Bakterienstämme

**Tabelle 1:** Für Transformationsexperimente verwendete Bakterienstämme

| <b>Bakterium</b>            | <b>Stamm</b>                   | <b>Herkunft</b>                                |
|-----------------------------|--------------------------------|--|
| <i>Enterococcus mundtii</i> | Stamm 1, Stamm 2, KD212, KD251 | Isoliert aus <i>Spodoptera littoralis</i> Darm |
| <i>Escherichia coli</i>     | DH5 $\alpha$                   | Invitrogen                                     |

#### Medien

**Tabelle 2:** Zusammensetzung und Hersteller der verwendeten Medien

| <b>Medium</b>                      | <b>Inhaltsstoffe</b>  | <b>Konzentrationen</b> | <b>Hersteller</b> |
|------------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------|
| Lysogenic-Broth (LB)               | Tryptone/Peptone      | aus 10 g/l             | Roth              |
|                                    | Casein                |                        |                   |
|                                    | Hefeextrakt           | 5 g/l                  | Roth              |
|                                    | Natriumchlorid >99,8% | 10 g/l                 | Roth              |
| -als festes Medium                 | Agar-Agar, Kobe I     | 30 g/l                 | Roth              |
| Todd Hewitt Broth                  |                       | 37 g/l                 | Fluka Analytical  |
| -als festes Medium                 | Agar-Agar, Kobe I     | 30 g/l                 | Roth              |
| Enterokokkenagar                   |                       | 33 g/l                 | Merck             |
| Donor Horse Serum Heat Inactivated |                       |                        | GE Healthcare     |

## Materialien und Methoden

### Plasmide

**Tabelle 3:** Für Transformation verwendete Plasmide. Erm: Erythromycinresistenzgen (Lemme, et al., 2011); RBSII: synthetic ribosome-binding site; T<sub>0</sub>-T<sub>1</sub>: transcriptional terminators from phage lambda and from the *rrnB* operon of *E. coli*. (Hansen et al., 2001); EGFP: enhanced GFP (Aymann et al., 2011)

| Plasmide | wichtige Charakteristika   | Ausgangsplasmid |
|----------|--|-----------------|
| pALSM01  | Erm  | pAT18           |
| pALSM02  | EGFP, Erm  | pALSM01         |
| pCM18    | Erm, pTRKL2- P <sub>CP25</sub> -RBSII- <i>gfp</i> mut3*-T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub> | pTRKL2          |
| pBSU100  | EGFP   | pAT28           |
| pBSU101  | EGFP unter der Kontrolle des <i>cfb</i> Promoters                                      | pAT28           |

### Enzyme

**Tabelle 4:** Enzym für die PCR

| Enzyme             | Konzentration | Lot.-Nr. | Hersteller |
|--------------------|---------------|----------|------------|
| Taq DNA Polymerase | 5 U/μl        | 1232338  | invitrogen |

### Primer

**Tabelle 5:** Bezeichnung der verwendeten Primer mit Nukleotidsequenz, Annealingtemperaturen und Hersteller

| Primer            | forward | reverse | Länge [bp] | Sequenz   | Annealingtemperatur [°C] | Hersteller                |
|-------------------|---------|---------|------------|---|--------------------------|---------------------------|
| PBSU 100 for 1    | x       |         | 21         | GTTGTGTG<br>GAATTGT<br>GAGCGG                       | 67.7                     | Sigma                     |
| pBSU 100 rev 1    |         | x       | 20         | CCTTGA<br>AGAAGAT<br>GGTGCGC                        | 67.0                     | Sigma                     |
| EECT down HindIII |         | x       | 31         | CTCTCA<br>AGCTTA<br>CTTGTA<br>CAGCT<br>CGTCC<br>ATG | 72.4                     | Eurofins<br>MWG<br>Operon |
| EECT up SphI      | x       |         | 25         | ATATAG<br>CATGCTG<br>AGCAAG<br>GGCGAG               | 71.7                     | Eurofins<br>MWG<br>Operon |
| EGFP f            | x       |         | 20         | GCTCGG<br>ATCCACT                                   | 61.7                     | Eurofins                  |

## Materialien und Methoden

|        |   |    |         |      |          |
|--------|---|----|---------|------|----------|
|        |   |    | AGTAACG |      | MWG      |
| EGFP   | x | 29 | ATACTCG | 71.9 | Operon   |
| XhoI r |   |    | AGGATC  |      | Eurofins |
|        |   |    | AGCGAG  |      | MWG      |
|        |   |    | CTCTAG  |      | Operon   |
|        |   |    | CATT    |      |          |
| GFPf/r |   | 49 | AAAAAA  | 74.1 | Sigma    |
|        |   |    | TCTAGAA |      |          |
|        |   |    | AGATATC |      |          |
|        |   |    | ATGAGTA |      |          |
|        |   |    | AAGGAGA |      |          |
|        |   |    | AGAACTT |      |          |
|        |   |    | TTCACTG |      |          |
| GFPf/r |   | 39 | AAAAAA  | 74.2 | Sigma    |
|        |   |    | GCTAGC  |      |          |
|        |   |    | CTATTTG |      |          |
|        |   |    | TATAGTT |      |          |
|        |   |    | CATCCA  |      |          |
|        |   |    | TGCCATG |      |          |

### Antibiotika

**Tabelle 6:** Antibiotika mit verwendeten Konzentrationen und Herstellern

| <b>Antibiotika</b>                        | <b>Konzentration<br/>[mg/ml]</b> | <b>Hersteller</b>           |
|---|----------------------------------|-----------------------------|
| Kanamycinsulfat $\geq 750$ I.U./mg        | 50                               | Roth                        |
| Ampicillin Natriumsalz, 99%               | 100                              | Roth                        |
| Tetracyclin-Hydrochlorid $\geq 95\%$      | 15                               | Roth                        |
| Rifampicin $\geq 97\%$                    | 100                              | Sigma-Aldrich               |
| Chloramphenicol, $\geq 98\%$              | 30                               | Roth                        |
| Gentamycinsulfat $> 500$ I.E./mg          | 50                               | Roth                        |
| Streptomycin sulfate                      | 50                               | Fluka                       |
| Erythromycin hydrate, 96%                 | 50                               | Aldrich                     |
| Spectinomycin dihydrochlorid pentahydrate | 125                              | Santa Cruz<br>Biotechnology |

### Kit

**Tabelle 7:** Verwendete Kits mit Herstellern

| <b>Kit</b>                                      | <b>Lot.-Nr.</b> | <b>Hersteller</b> |
|---|-----------------|-------------------|
| Master Pure Complete DNA & RNA Purification Kit | MC-20743        | epicentre         |
| Gene Jet Plasmid Miniprep Kit                   | 128503          | Thermo Scientific |

## Materialien und Methoden

Das “Master Pure Complete DNA & RNA Purification Kit” wurde verwendet um DNS aus Bakterienstämmen. *S. littoralis* Puppen, Falter- und Larvendärmen zu extrahieren. „Gene Jet Plasmid Miniprep Kit“ wurde eingesetzt um Minipräparationen vorzunehmen und Plasmide aus Bakterien zu isolieren.

### Lösungen

**Tabelle 8:** Verwendete Lösungen mit ihren Inhaltsstoffen, Konzentrationen und der Hersteller

| Lösungen   | Inhaltsstoffe                        | Konzentrationen | Hersteller    |
|------------|--------------------------------------|-----------------|---------------|
| PBS        | Natriumchlorid $\geq 99,8\%$         | 8 g/l           | Roth          |
|            | Kaliumchlorid                        | 0,2 g/l         | Sigma-Aldrich |
|            | Di-Natriumhydrogensphosphat          | 1,44 g/l        | Roth          |
| TAE-Puffer | Kaliumdihydrogenphosphat $\geq 99\%$ | 0,24 g/l        | Roth          |
|            | 50 x TAE                             | 0,02 v/v        |               |
|            | Aqua dest.                           | 0,98 v/v        |               |

### Chemikalien

**Tabelle 9:** Zusammenstellung aller verwendeten Chemikalien, ihre Konzentrationen und Hersteller

| Chemikalien                         | Konzentration             | Hersteller        |
|-------------------------------------|---------------------------|-------------------|
| Ethidiumbromidlösung                | 1% (10 mg/ml) Stammlösung | Roth              |
| Glycerin Rohpuran, p.a., wasserfrei | 99.50%                    | Roth              |
| 50 mM MgCl <sub>2</sub>             | 50 nM                     | Invitrogen        |
| 10 x PCR R x n Buffer               |                           | Invitrogen        |
| Agarose NEEO Ultra Qualität         |                           | Roth              |
| Gene Ruler 1kb DNA Ladder           | 1kb                       | Thermo Scientific |
| 6 x Mass Ruler DNA Loading Dye      |                           | Fermentas         |
| Natriumacetat $\geq 99\%$           | 3 M                       | Roth              |
| Ethanol                             |                           | Merck Emsure®     |
| 2-Propanol                          |                           | Merck Emsure®     |
| Rotiphorese® 50 x TAE Puffer        |                           | Roth              |

## Materialien und Methoden

### Geräte

**Tabelle 10:** verwendete Geräte

| <b>Gerät</b>  | <b>Gerätetyp</b>       | <b>Hersteller</b>              |
|---|------------------------|--------------------------------|
| Mikroskop   | Axio Imager.Z 1        | Zeiss                          |
| Lumineszenz-Messgerät   | infinite M200          | TECAN                          |
| Concentrator plus   |                        | Eppendorf                      |
| Elektrophoresenetztteil                                       |                        | Amersham pharmacia biotech     |
| Darkroom  | BDR-5<br>BioDocAnalyse | Biometra                       |
| Zentrifuge  | Centrifuge 5415R       | Eppendorf                      |
| Mastercycler-Komplettsystem mit Controll Panel (PCR-Maschine) | vapo.protect           | Eppendorf                      |
| Biophotometer   | 6131                   | Eppendorf                      |
| Spectrophotometer   | SpectraMax 250         | TM Molecular Devices           |
| Spectrophotometer   | NanoVue                | GE                             |
| Mikroskopkörper   | Stemi DV4              | Zeiss                          |
| Elektronische Analysenwaage                                   | XS205DU                | Mettler Toledo                 |
| Elektronische Präzisionswaage                                 | BP2100S                | Sartorius                      |
| pH-Messgerät  | inoLAB                 | WTW                            |
| pH-Elektrode  | SenTix 20              | WTW                            |
| Vortex-Genie 2  |                        | Scientific Industries          |
| Thermomixer comfort   | 5355R                  | Eppendorf                      |
| Brutschrank   |                        | Heraeus                        |
| Inkubationsschüttelschrank                                    | CERTOMAT BS-1          | B. Braun Biotech International |
| Elektroporator  | 2510                   | Eppendorf                      |
| Sterilwerkbank  | HERAsafe               | Heraeus                        |
| Ultratiefkühlschrank -86°C                                    | MDF-U76V               | SANYO                          |

## Materialien und Methoden

### 2.2 Methoden

#### **2.2.1 Selektion von *Enterococcus mundtii* mittels Antibiotika**

Im Rahmen des Versuches wurden die *E. mundtii* Stämme Stamm 1, Stamm 2, KD212 und KD251 auf ihre Antibiotikaresistenzen getestet. Diese wurden zuvor aus *S. littoralis* isoliert, die mit künstlichem Futter gefüttert wurden. Natürliche Antibiotikaresistenzen der Bakterien sollten bestimmt werden, um geeignete antibiotika-sensitive für die Transformation Antibiotikaresistenzgen-codierender Plasmide zu ermitteln. Weiterhin sollte herausgefunden werden, mit welchen Antibiotika die natürlich im Darm vorkommenden *E. mundtii* reduziert werden können. Für die geplanten Experimente sollte ein geeigneter Stamm gefunden werden.

Zur Bestimmung bestehender Resistenzen, wurde eine Übernachtskultur von jedem *E. mundtii*-Stamm angesetzt. Am darauffolgenden Tag wurden Reagenzgläser mit 3 ml Todd Hewitt Broth (THB) befüllt und je mit der folgenden Antibiotika versetzt: 50 mg/l Kanamycin, 50 mg/l Ampicillin, 22,5 mg/l Tetracyclin, 50 mg/l Rifampicin, 49,8 mg/l Chloramphenicol, 50 mg/l Gentamycin, 50 mg/l Streptomycin, 50 mg/l Erythromycin, 125 mg/l Spectinomycin. Anschließend wurden je 10 µl der Übernachtskultur in die verschiedenen THB-Antibiotika-Ansätze gegeben und bei 37°C und 220 rpm für 48 h inkubiert. Nach 24 und 48 h wurde optisch ausgewertet, ob Ansätze trüb oder klar waren. Bei Trübung konnte Bakterienwachstum nachgewiesen werden. Nach der Auswertung des ersten Antibiotikatests erfolgte eine weitere ähnliche Testung über mehrere Tage. Verwendet wurden nur Antibiotika, die im ersten Test zu keinem eindeutigen Ergebnis führten.

Erneut wurde eine Übernachtskultur der *Enterococcus* Stämme in THB angesetzt und THB mit verschiedenen Antibiotikakonzentrationen hergestellt, sodass je ein Ansatz 50 mg/l Gentamycin, 50 mg/l Rifampicin, 125 mg/l Spectinomycin und 50 mg/l Ampicillin enthielt. Davon wurden je 1 ml pro Well in eine 96Well Platte pipettiert. Die Übernachtskultur der Bakterien wurde zunächst 1:4 verdünnt und anschließend mit einem Photometer die OD<sub>600</sub> bestimmt. Nach Ermittlung der OD<sub>600</sub> erfolgte eine weitere Verdünnung auf einen Wert von 0,2. Danach wurde nochmals 100fach verdünnt, um anschließend 100 µl in jedes Well der 96Well Platte einzupipettieren. Zusätzlich wurden Kontrollen ohne Antibiotika mitgeführt. Die



## Materialien und Methoden

beimpften Platten inkubierten bei 37°C für 24 h im Schüttelinkubator. Danach erfolgte eine erneute Messung der OD<sub>600</sub>, um das Wachstum der Zellen zu kontrollieren. Für die Messung am darauffolgenden Tag wurde wieder THB mit den entsprechenden Antibiotikakonzentrationen versetzt und in eine neue 96Well Platte pipettiert. Mit einer Achtkanal-Pipette wurden aus jedem Well der bereits bebrüteten 96Well Platte 10 µl entnommen und in das gleiche Well der neuen Platte überführt. Es erfolgte erneut eine Inkubation für 24 h im Schüttelinkubator mit anschließender Messung der OD<sub>600</sub>. Diese Schritte wiederholten sich täglich sieben Tage lang.

### 2.2.2 Reduzierung der natürlichen *Enterococcus sp.* aus der Darmflora von *Spodoptera littoralis*

Es wurde untersucht, ob es möglich ist, die natürlich im Larvendarm vorkommenden Enterokokken stark zu reduzieren, ohne dabei die Insekten in ihrem Wachstumsverlauf zu beeinträchtigen. Die Bakterien sollten dezimiert werden, um später mit GFP-transformierte *E. mundtii* den Larven zu füttern, sodass ihre Ansiedlung im Darm ohne Konkurrenzdruck erfolgen konnte. Um die im Darm der Larve *S. littoralis* vorkommenden *Enterococcus sp.* zu reduzieren, wurden die Raupen mit verschiedenen Antibiotikamischungen gefüttert. Zuvor wurden die Antibiotikaresistenzen der verschiedenen *E. mundtii*-Stämme ermittelt (2.2.1). Die Antibiotikamischungen wurden mit Aqua dest. angesetzt und bestanden aus 5,75 µg/ml Ampicillin und 9,6 µg/ml Erythromycin, 5,75 µg/ml Ampicillin und 5,75 µg/ml Chloramphenicol sowie 5,75 µg/ml Ampicillin und 38 µg/ml Tetracyclin. Hinzu kam eine Kontrolle ohne Antibiotika. Je Antibiotikamischung wurden zehn Larven einzeln gewogen und in extra Aufzuchtgefäße verteilt. Jede Larve wurde täglich mit 1 g künstlichem Futter gefüttert, zu dem je 100 µl des entsprechenden Antibiotikagemisches hinzugefügt wurde. Um ihre Entwicklung zu beobachten wurden sie jeden Tag gewogen. Nach zehn Tagen war das Experiment beendet. Die Larven wurden anschließend auf die noch vorhandene Zahl der Enterokokken im Darm untersucht.

### 2.2.3 Sezierung von *Spodoptera littoralis* Larven

Um den Darm der Larven freizulegen und für spätere Experimente zu isolieren wurden sie sezirt. Betäubt und getötet wurden sie innerhalb 10 min bei -20°C im Gefrierschrank.

## Materialien und Methoden

Danach wurden sie in Aqua dest. gewaschen und anschließend mit 70%igen Ethanol äußerlich desinfiziert.

Die Sezierung wurde mit geeigneter Schere, Pinzette und in PBS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 unter dem Mikroskop durchgeführt. Ziel war es, die Haut des Insekts zu entfernen und den Darm freizulegen. Der erhaltene Darm wurde zur weiteren Verarbeitung in ein Reaktionsgefäß überführt und für folgende Experimente gekühlt aufbewahrt.

### **2.2.4 Nachweis von *Enterococcus mundtii* im Darm von *Spodoptera littoralis* mittels DNS-Extraktion aus Darmgewebe und -Bakterien**

Es sollte die DNS aller im Larvendarm vorkommenden Bakterienarten gewonnen werden. Mit der PCR sollte herausgefunden werden, ob sich Enterokokken-DNS im Darm befand. Der Darm wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mittels einer Vakuum Zentrifuge bei 45°C getrocknet. Die Trocknungsdauer variierte je nach Insektengröße und Darmdicke. Mit einem Stößel wurde der Darm zu Pulver zermahlen. Zur DNS-Extraktion diente das „Master Pure Complete DNA & RNA Purification Kit“ von „epicentre“. Es wurde laut Anleitung für „Tissue Samples“ verfahren (epicenter). Für die DNS-Ausfällung wurde die Methode „Precipitation of Total Nucleic Acids“ verwendet (epicenter). Nach jedem Hinzufügen von Ethanol wurde für 3 min zentrifugiert. Um sicher zu gehen, dass nach dem letzten Entfernen kein Ethanol mehr im DNS-Sediment enthalten war, wurde erneut 1 min zentrifugiert und nochmals Überstand abpipettiert. Resuspendiert wurde mit 35 µl Aqua dest. Die DNS-Konzentration wurde mit Hilfe des NanoVue Spectrophotometers ermittelt. Mit der gewonnenen DNS wurde eine PCR (siehe 2.6.2) mit anschließender Gelelektrophorese (siehe 2.6.3) durchgeführt.

### **2.2.5 Transformation von *Enterococcus mundtii***

Ziel war es, ein GFP-codierendes Plasmid in *E. mundtii* zu transformieren. Getestet wurden verschiedene Methoden. Die Transformanten sollten in weiteren Experimenten den *S. littoralis* Larven zugefüttert werden, um sie während des Entwicklungszyklus der Insekten mit der durch das GFP produzierten Fluoreszenz, im Darm beobachten zu können. Für die Transformation mit Pferdeserum wurde eine Übernachtskultur des *E. mundtii*-Stammes KD251 in THB mit 5 % (v/v) hitzeinaktiviertem Pferdeserum angesetzt und bei

## Materialien und Methoden

37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach ausreichendem Wachstum wurde eine einhundertfache Verdünnung hergestellt und für 3,5 h bei 34°C inkubiert. 64 µl der Bakteriensuspension wurden dann mit 32 µl der Plasmidsuspension von pCM18 versetzt, für weitere 1,5 h bebrütet und auf Todd-Hewitt Agar Platten, welche 5 µg Erythromycin pro ml enthielten, ausplattiert. Inkubiert wurde für zwei Tage bei 37°C (Hansen et al., 2001).

Die Herstellung kompetenter *E. mundtii* für die Transformation per Hitzeschock erfolgte nach Friesenenegger et al. Stamm KD251 wurde in 1 l THB bis zu einer stationären Wachstumsphase über Nacht kultiviert. Geerntet wurden die Zellen während 15 minütiger Zentrifugation bei 5000\*g. Aufeinanderfolgend wurden die Zellen dann mit 1 l, 500 ml, 200 ml und 20 ml in 10 % Glycerin gewaschen. Alle Zellen der 1 l Suspension, mit einer finalen Konzentration von 10<sup>10</sup> CFU, wurden daraufhin in 2 ml 10 %igem Glycerin gelöst, in 200 µl Aliquote aufgeteilt und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert (Friesenegger et al., 1991).

Alle Schritte der Transformation wurden auf Eis durchgeführt. Von dem einzutransformierenden Plasmid wurden 1,5 µl in ein Reaktionsgefäß überführt und 12,5 µl kompetente Zellen addiert. Inkubiert wurde für 30 min auf Eis. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 45°C. Danach wurde der Ansatz sofort wieder auf Eis gelegt, schnellstmöglich 100 µl des raumtemperaturwarmen S.O.C. Mediums hinzugefügt und bei 37°C und 220 rpm für 1 h inkubiert. Je nach eintransformierter DNS wurde die Bakteriensuspension auf Selektivmedium ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Für die Elektroporation wurden zuerst 50 µl kompetente Zellen des Stammes KD251 in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Die nun zugeführte Menge an Plasmid-DNS variierte so, dass im Reaktionsansatz eine DNS-Konzentration von ca. 60 ng/µl vorlag. Es folgten 30 min Inkubation auf Eis und die Elektroporation mit den „Elektroporator 2510“ von „Eppendorf“ mit einer Spannung von 1800 V. Dafür wurden spezielle Küvetten verwendet, welche nach Beendigung der Elektroporation mit ca. 37°C warmer THB ausgespült wurde. Die Lösung wurde zurück in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bei 37°C und 220 rpm erfolgte eine einstündige Inkubation, bevor je 100 µl der Suspension auf einem selektiven Medium ausplattiert wurden.

Für die Co-Inkubation wurde die Bakterienkultur bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,2 inkubiert, anschließend 20-fach mit Medium verdünnt und bei 30°C für 20 min inkubiert.

## Materialien und Methoden

Danach wurde Plasmid-DNS mit einer Konzentration von 200 ng/ml hinzugefügt und nochmals bei 30°C für 40 min bebrütet. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation für 2 h bei 37°C. Der Ansatz wurde dann bei 4000 rpm 4 min zentrifugiert, das entstandene Pellet in 100 µl THB resuspendiert und dieses Volumen auf selektivem Medium ausplattiert (Balganesh et al., 1984).

### 2.2.6 Nachweis transformierter Plasmide im Bakterium

Der Nachweis erfolgte mittels DNS-Extraktion, Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Gelelektrophorese und Minipräparation. Die auf Selektivmedium gewachsenen Bakterien wurden auf transformierte Plasmide untersucht. Es wurde eine Übernachtskultur potentiellen Transformanten in THB-Medium angesetzt. Zur DNS-Extraktion diente das „Master Pure Complete DNA & RNA Purification Kit“ mit der Methode „Cell Samples“ von „epicentre“ (epicenter). Die DNS-Ausfällung erfolgte wie in Punkt 2.2.4 beschrieben.

Mittels PCR wurde die zuvor extrahierte DNS untersucht. Die in 2.2.4 gewonnene DNS wurde auf das Vorhandensein von 16S ribosomaler Enterokokken-DNS und die in 2.2.6 erhaltenen DNS auf die eintransformierte Plasmid-DNS getestet. Mit der in 2.2.4 extrahierten DNS sollte die Reduktion der Enterokokken im Larvendarm durch Antibiotikafütterung nachgewiesen werden. Für die PCR wurde pro Probe 50 µl Mastermix angesetzt (Tab. 11).

**Tabelle 11:** Zusammensetzung des Mastermix der PCR

| <b>PCR Berechnung</b> |              |
|-----------------------|--------------|
| Komponenten           | Volumen [µl] |
| Gesamtvolumen         | 50 µl        |
| Wasser                | 40,5         |
| Puffer                | 5            |
| dNTP                  | 1            |
| Magnesium             | 1,5          |
| Primer f              | 0,25         |
| Primer r              | 0,25         |
| Taq-Polymerase        | 0,5          |
| Templat               | 1            |

## Materialien und Methoden

Eingesetzt wurden Primer GFPf/r. Als Proben-DNS diente die zuvor extrahierte DNS aus den transformierten *E. mundtii*. Weiterhin wurden eine Positivkontrolle, bestehend aus Plasmid pALSM02, sowie eine Negativkontrolle ohne DNS mitgeführt.

Die PCR wurde mit folgendem Programm durchlaufen:

**Tabelle 12:** PCR-Programm für die Primer GFPf/r

| PCR Programm           |               |      |                  |                  |        |      |
|------------------------|---------------|------|------------------|------------------|--------|------|
|                        | Denaturierung |      | Primer Annealing | Primer Extension |        | Ende |
| <b>Temperatur [°C]</b> | 94            | 94   | 70               | 72               | 72     | 8    |
| <b>Zeit</b>            | 3 min         | 45 s | 30 s             | 2 min            | 10 min |      |
|                        |               | ↓    | ↓                | ↓                |        |      |
| 35 x Wiederholung      |               |      |                  |                  |        |      |

Die Gelelektrophorese diente dazu, die Ergebnisse der PCR aufzuschlüsseln, sichtbar zu machen und auswerten zu können. Hergestellt wurde zuerst ein 0,8%iges Agarosegel. Die Agarose wurde in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) unter Hitzeeinwirkung gelöst und ca. 0,5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Nach Ausgießen und Aushärten wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt. Anschließend erfolgte die Probenaufgabe, indem 3 µl Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (DNS-Massenstandart) in eine extra Tasche gegeben und in die anderen jeweils 5 µl PCR-Produkt, gemischt mit je 1 µl 6 x Mass Ruler DNA Loading Dye (Ladepuffer), pipettiert wurden. Die Elektrophorese lief mit 115 V, 300 A innerhalb von 20 min. Danach wurden das Gel unter UV-Licht ausgewertet.

Mit der Minipräparation wurden die im Bakterium enthaltenen Plasmide isoliert, welche laut Anleitung des „GeneJet Plasmid Miniprep Kit“ von „Thermo Scientific“ erfolgte (ThermoScientific). Dafür wurde zuvor eine Übernachtkultur von ca. 5-10 ml angesetzt und bei 37°C inkubiert.

### 2.2.7 Transformantentest mit und ohne antibiotikahaltigem Medium

Untersucht wurde, ob das transformierte Plasmid bei einer Kultivierung ohne Antibiotika vom Bakterium abgestoßen wird und verloren geht oder ob die Gensequenz in das Bakterienchromosom integriert wird. Eine Integration wäre wichtig, um nach Einbringen

## Materialien und Methoden

der Transformanten in den Insektendarm sicher zu stellen, dass diese in Abwesenheit von Antibiotika die Gensequenz nicht verlieren. Die Nachweise erfolgten mittels Minipräparation, DNS-Extraktion, PCR und Gelelektrophorese. Zudem wurden die Transformanten auf Fluoreszenz untersucht, um sie von ihrem Wildtyp unterscheiden und sie über den Entwicklungszyklus der Insekten hinweg beobachten zu können.

Die Kultivierung erfolgte mit Erythromycin. Getestet wurden die *E. mundtii*-Transformanten eins und zwei und als Kontrolle, mit pALSM02 transformierte *E. coli*. Die Ansätze bestanden für *E. mundtii* aus 4 ng/ml erythromycinhaltigem THB-Medium und reinem THB-Medium und für *E. coli* aus 4 ng/ml erythromycinhaltigem LB-Medium und reinem LB-Medium. Jeder Stamm wurde in einer Doppelbestimmung in 8 ml erythromycinhaltigem und 8 ml normalen THB kultiviert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 220 rpm wurde von jeder Bakteriensuspension ein Glycerol-Stock angefertigt und in -80°C Gefrierschrank aufbewahrt. 10 µl der Bakteriensuspension wurden in neues Medium überführt und erneut 24 h inkubiert. Die Inkubation mit der darauffolgenden Anfertigung des Glycerol-Stocks wurde sieben Tage lang wiederholt. Danach wurden alle erstellten Glycerol-Stocks gleichzeitig über Nacht bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Für jede Bakteriensuspension fand das Medium Verwendung, in welchem sie vor dem Erstellen des Glycerol-Stocks kultiviert wurden. Nach der Inkubation erfolgte die Fluoreszenzmessung mittels Lumineszenz-Messgerät und Mikroskop.

Nach dem ersten, fünften und siebten Tag des Tests wurden Minipräparationen sowie DNS-Extraktionen mit anschließender PCR und Gelelektrophorese durchgeführt. Deren Ausführung erfolgte, wie zuvor unter Punkt 2.2.6. beschrieben.

Für die Fluoreszenzmessung mit dem Lumineszenz-Messgerät wurden die Glycerol-Stocks, wie beschrieben, kultiviert. Von jeder Probe wurde dann eine 1:5 und eine 1:10 Verdünnung, je nach Bakterienart, mit THB bzw. LB-Medium hergestellt. Davon wurden je 200 µl in fünf aufeinanderfolgende Wells einer 96Well Platte pipettiert, welche speziell für Fluoreszenzmessungen geeignet ist. Die Fluoreszenzmessung, sowie die Messung der OD<sub>600</sub> erfolgte mit dem Tecan i-control infinite 200. Die Eigenschaften des Programms sind im Anhang zu finden (Tab. 9k, Tab. 9l).

Mittels Mikroskop sollte festgestellt werden, ob die Transformanten optisch von den ihren Wildtypen zu unterscheiden sind und wie stark die Fluoreszenz der Transformanten zu

## Materialien und Methoden

sehen ist, um zu wissen, ob sie im Darmgewebe der *S. littoralis* beobachtet werden können. Alle Glycerol-Stocks wurden, wie in 2.2.7 beschrieben, über Nacht kultiviert. Cirka 100 µl unverdünnte Bakteriensuspension wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei geeigneter Wellenlänge untersucht. Es wurden die in 4 ng/ml erythromycinhaltigem Medium kultivierten Transformanten mit denen in antibiotikafreiem Medium kultivierten verglichen. Des Weiteren erfolgte der Vergleich von Transformanten mit ihren Wildtypen.

### 2.2.8 Einbringen der *Enterococcus mundtii* Transformanten in den Darm von *Spodoptera littoralis*

Ziel war es die *E. mundtii*-Transformanten im Darm der Larven anzusiedeln, indem sie Teil der natürlichen Darmflora werden, sodass sie während des Entwicklungszyklus der *S. littoralis* mittels Fluoreszenz beobachtet werden können. Es sollte so die Interaktion zwischen Insekt und Darmmikrobiota besser verstanden und beobachtet werden, ob die Bakterien über die Verpuppung bis zum Falterstadium weitergegeben werden. Die Larven wurden ca. fünf Tage, wie in 2.2.2 beschrieben, mit dem Ampicillin-Tetracyclin-Gemisch gefüttert. Durch Übergießen des Futters mit einer Übernachtskultur, wurden die Larven anschließend mit *E. mundtii*-Transformanten gefüttert. Die eine Hälfte der zuvor mit Antibiotika gefütterten Larven erhielten Transformanten, welche in erythromycinhaltigem Medium kultiviert wurden. Die andere Hälfte erhielt welche, die in antibiotikafreiem Medium kultiviert wurden. Die Larven, die als Kontrolle dienten und nicht mit antibiotikahaltigem Futter gefüttert wurden, bekamen je zur Hälfte in erythromycinhaltigem bzw. antibiotikafreiem Medium kultivierte Transformanten. Die Fütterung erfolgte bis zum Puppenstadium.

### 2.2.9 Nachweis der Transformanten im Darm der *Spodoptera littoralis*

Getestet wurde mittels DNS-Extraktionen, PCR, Gelelektrophorese und Ausplattierungen, ob die zugefütterten Transformanten sich in die Darmflora integrieren konnten und bis zum Falterstadium lebendig oder tot im Darm enthalten blieben.

Für den Nachweis in den Larven wurden sie wie in Punkt 2.2.8 mit Transformanten gefüttert und anschließend seziiert (siehe 2.2.3). Aus jeder Larvengruppe wurden je zwei Insekten präpariert. Nicht seziierte Larven bekamen weiterhin, bis zum Erreichen des

## Materialien und Methoden

Puppenstadiums, mit Transformanten versetztes Futter. Aus den erhaltenen Larvendärmen wurde DNS extrahiert (siehe 2.2.4), um damit eine PCR und Gelelektrophorese durchzuführen (siehe 2.2.6). Mit der Gelelektrophorese wurde das amplifizierte GFP-Gen der zugefütterten *E. mundtii*-Transformanten in der Larven- bzw. Puppen-DNS sichtbar gemacht.

Zum Nachweis lebender Transformanten erfolgte das Ausplattieren des Darminhaltes. Der frisch seziierte und in kleine Stücken geschnittene Darm der Larve wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 750 µl PBS und 750 µl 30%igem Glycerin versetzt. Um den Darminhalt mit den darin enthaltenen Bakterien vom Darmgewebe zu lösen, wurde per Vortexer gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden dann für 10 min in ein Ultraschallbad getaucht, um die Bakterien zu vereinzeln und mögliche Bakterienketten zu zerstören. Ausplattiert wurden 1:1000 und 1:1000000 Verdünnungen. Von jeder Verdünnung wurden je 100 µl dreimal auf Enterokokken-Agar, Enterokokken-Agar mit 4 ng/ml Erythromycin, LB-Agar und LB-Agar mit 4 ng/ml Erythromycin ausgestrichen und bei 37°C für 24 h inkubiert. Die Auszählung der gewachsenen Bakterienkolonien erfolgte manuell.

Für den Nachweis in den Puppen wurde aus jedem Ansatz eine Puppe für 15 min im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt, anschließend mit einem Skalpell der Länge nach in der Mitte durchgeschnitten, die entstandenen Hälften in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und sofort mit der Vakuumentrifuge getrocknet (siehe 2.2.4) bzw. zur Lagerung, mit 750 µl PBS und 750 µl 30%igem Glycerin aufgefüllt und im -80°C Gefrierschrank aufbewahrt. Aus den getrockneten Puppen erfolgte die DNS-Extraktion mit darauffolgender PCR und Gelelektrophorese (siehe 2.2.6). Ausplattiert wurde wie bei den Larven. Nachdem Falter aus den Puppen schlüpften, wurden diese sofort getötet und seziiert (siehe 2.2.3). Anschließend erfolgte, wie auch bei Larven und Puppen, die DNS-Extraktion, PCR und Gelelektrophorese.

Ausplattierungen wurden nicht vorgenommen.



## Ergebnisse

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Selektion von *Enterococcus mundtii* mittels Antibiotika

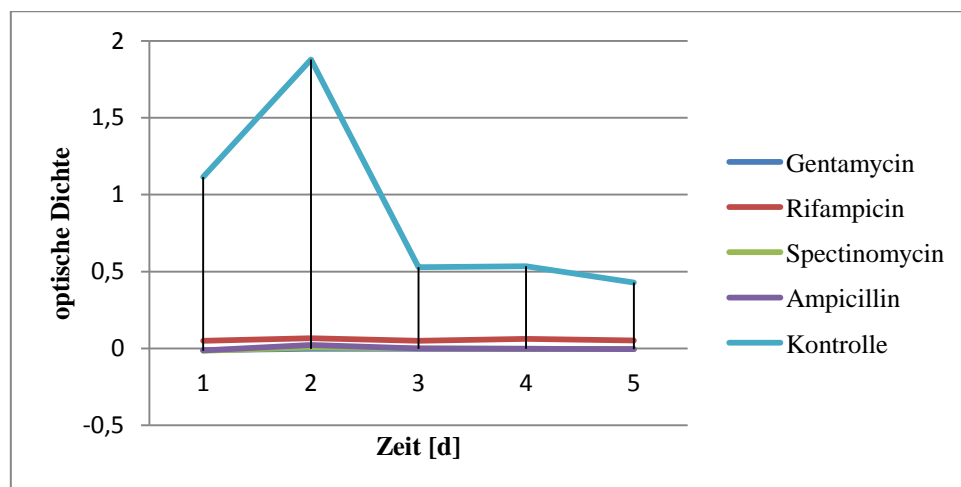
Getestet wurde auf die Antibiotikaresistenzen verschiedener *E. mundtii* Stämme. Dies war wichtig, um geeignete Antibiotika-Sensitive für die Transformation Antibiotikaresistenzgen-codierender Plasmide zu ermitteln. Außerdem wurde ermittelt, welche Antibiotika verwendet werden können, um die Zahl der *E. mundtii* im Darm der *S. littoralis* zu reduzieren.

Die Ergebnisse befinden sich im Anhang (Tab. 9a).

Eindeutig keine Resistenzen bestanden gegen Tetracyclin, Chloramphenicol, Erythromycin und Ampicillin. Aufgrund dessen wurden diese Antibiotika für die Reduzierung der natürlich im Darm vorkommenden *E. mundtii* verwendet (2.2.2).

Keine eindeutigen Resistenzen konnten in den Proben mit Gentamycin, Rifampicin, Spectinomycin und Ampicillin festgestellt werden. Um eine gesicherte Resistenz nachzuweisen, wurde eine ähnliche Testung, nur mit diesen Antibiotika, vorgenommen (siehe 2.2.2). Beobachtet und detektiert wurde der Wachstumsverlauf der Bakterienkulturen in den antibiotikahaltigen Medien innerhalb von fünf Tagen.

Die Werte der Messungen der OD<sub>600</sub> sind im Anhang zu finden (Abb. 9b bis Abb. 9e).

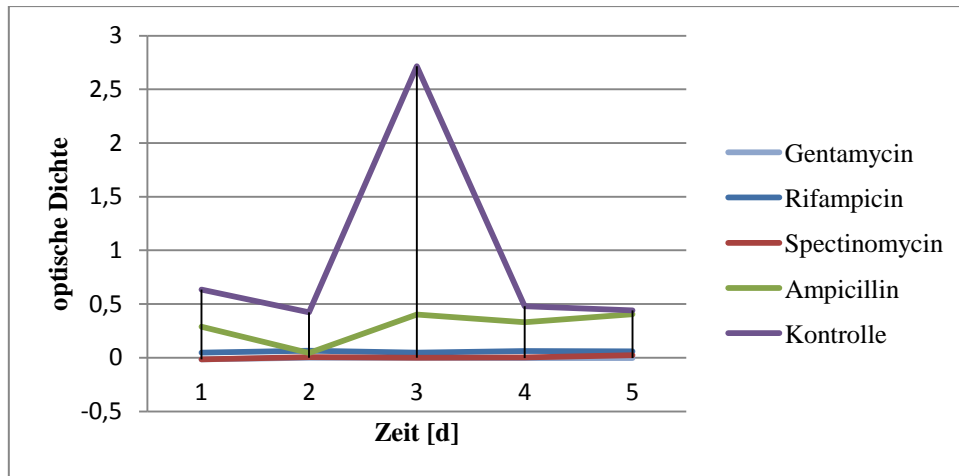


**Abbildung 3:** Wachstumskurve *Enterococcus mundtii* Stamm 1 bei Kultivierung mit verschiedenen Antibiotika

Der *E. mundtii* Stamm 1 zeigte keine Resistenz gegen die eingesetzten Antibiotika (Abb. 3). Im Vergleich zu den in Antibiotika kultivierten Ansätzen wies der Kontrollansatz

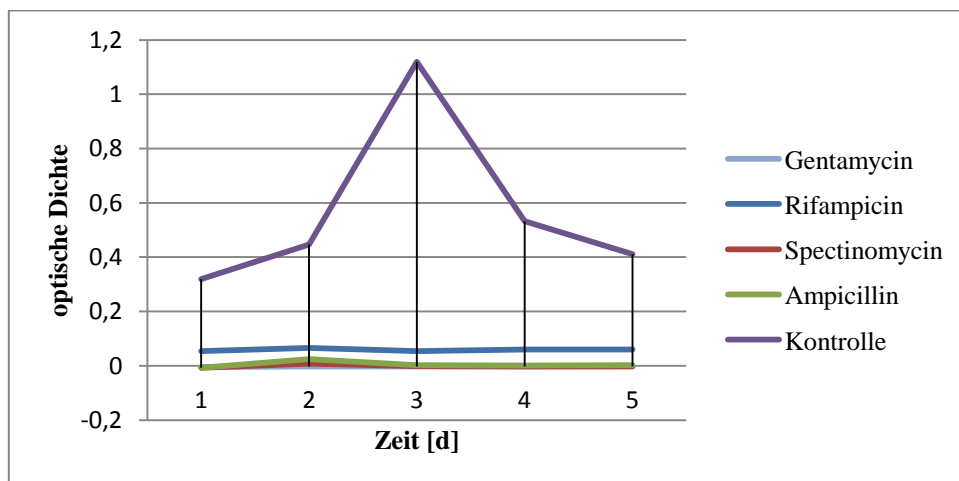
## Ergebnisse

in den ersten zwei Tagen ein deutlich steigendes Wachstum auf und erreichte am zweiten Tag ein Maximum. Ab dem dritten Tag bewegten sich die Werte der OD<sub>600</sub> um 0,5.



**Abbildung 4:** Wachstumskurve *Enterococcus mundtii* Stamm 2 bei Kultivierung mit verschiedenen Antibiotika

Die Kontrolle des Stammes 2 wies ein deutliches Maximum am dritten Tag auf. An den anderen Tagen erreichte die optische Dichte Werte um 0,5 (Abb. 4). Ansätze mit Gentamycin, Spectinomycin und Rifampicin wiesen kaum Wachstum auf. Lediglich der Ansatz mit Ampicillin zeigte ein leichtes Wachstum. Die Werte der optischen Dichte waren deutlich größer als Null, erreichten jedoch nicht die des Kontrollansatzes.

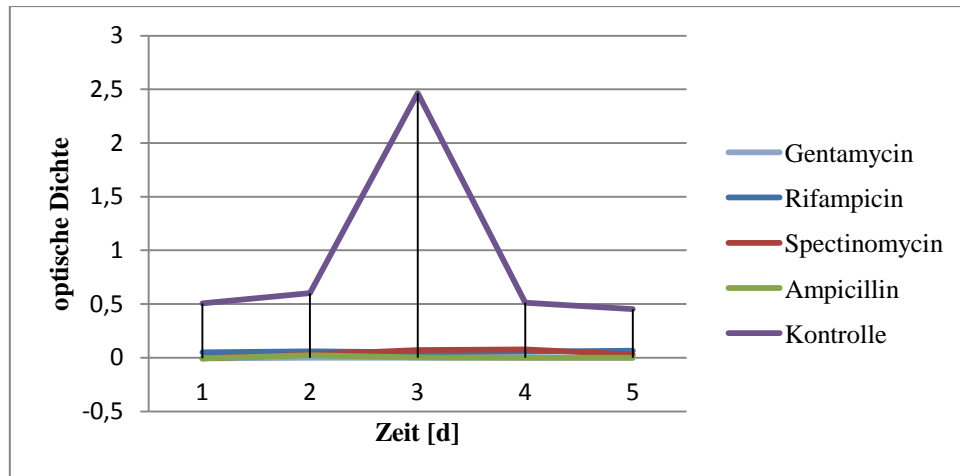


**Abbildung 5:** Wachstumskurve *Enterococcus mundtii* Stamm KD212 bei Kultivierung mit verschiedenen Antibiotika

Stamm KD212 wies einen ähnlichen Verlauf der Kontrolle wie Stamm 2 auf (Abb. 5). Jedoch konnte hier kein Wachstum in den Ansätzen mit Gentamycin, Spectinomycin und

## Ergebnisse

Ampicillin festgestellt werden. Die optische Dichte des in Rifampicin kultivierten Ansatzes schwankte ungefähr um den Wert von 0,05.



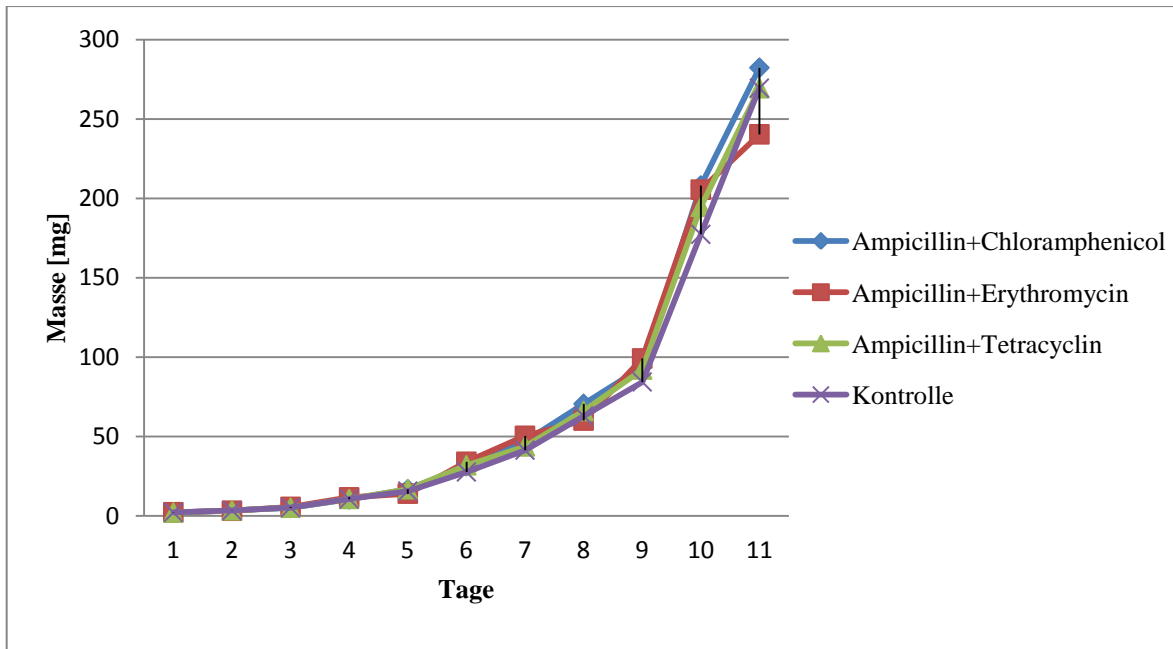
**Abbildung 6:** Wachstumskurve *Enterococcus mundtii* Stamm KD251 bei Kultivierung mit verschiedenen Antibiotika

Der Kontrollansatz des Stammes KD251 wies am dritten Tag der Kultivierung ein Maximum auf. In den ersten und letzten zwei Tagen nehmen die Werte der optischen Dichte einen Wert um 0,5 an (Abb. 6). In allen antibiotikahaltigen Ansätzen war kein Wachstum zu vermerken.

### 3.2. Wachstumsverlauf von *Spodoptera littoralis*

Untersucht wurde der Wachstumsverlauf der Larven bei Fütterung mit Antibiotika (siehe 2.2.2). Die verwendeten Antibiotikagemische wurden mit der Antibiotikaselektion ermittelt (siehe 3.1). Die Ergebnisse waren wichtig, um zu wissen, wie die Larven auf Antibiotika reagieren und ob dies eine Möglichkeit ist, die natürlichen *Enterococcus sp.* in der Darmflora zu dezimieren ohne dabei die Insekten zu schädigen. Die dafür registrierten Larvengewichte sind im Anhang zu finden (Tab. 9f). Aus ihnen wurde eine Kurve erstellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 7:** Wachstumskurve der *Spodoptera littoralis* Larven bei Zufütterung verschiedener Antibiotikagemische

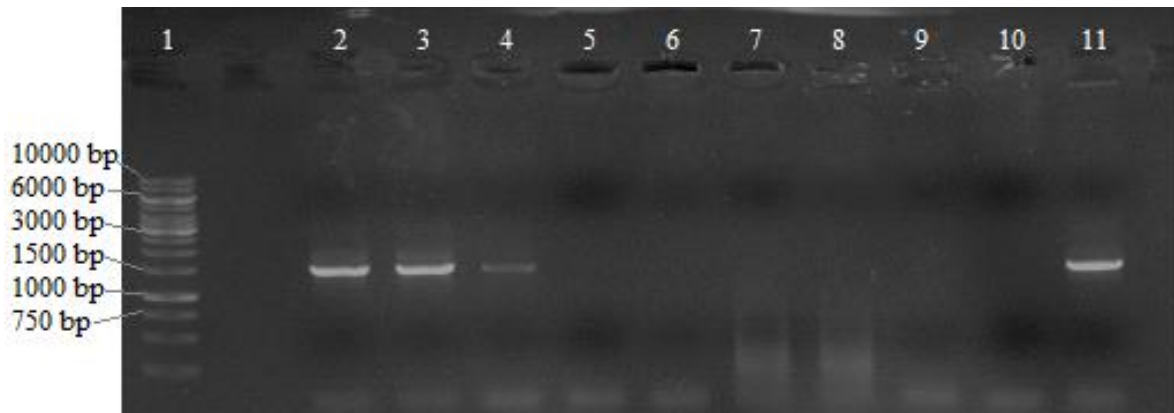
Die Darstellung (Abb. 7) zeigt keine wesentlichen Abweichungen in den Wachstumsverläufen.

### **3.3 Nachweis von *Enterococcus mundtii* im Darm von *Spodoptera littoralis***

Ziel war es, die in der natürlichen Darmflora der *S. littoralis* Larven vorkommenden *Enterococcus sp.* mit Hilfe von verschiedenen Antibiotikamischungen zu reduzieren, um in späteren Experimenten die *E. mundtii*-Transformanten durch Zufüttern in den Darm einzuschleusen, sodass diese sich dort ohne Konkurrenzdruck ansiedeln können. Zu diesem Zweck wurde wie in Punkt 2.2.2, 2.2.3 und 2.2.4 beschrieben vorgegangen.

Um zu sehen, ob die *Enterococcus sp.* im Larvendarm reduziert werden konnten, wurde zunächst eine DNS-Extraktion der Larven durchgeführt. Mit Hilfe der PCR und der Gelelektrophorese wurde die 16S ribosomale DNS der *Enterococcus sp.* nachgewiesen.

## Ergebnisse



**Abbildung 8:** Gelbild der PCR der *Spodoptera littoralis* Larven-DNS. 1) DNS-Massenstandard; 2,3) DNS der ohne Antibiotika gefütterte Larven; 4,5) DNS der mit Ampicillin und Erythromycin gefütterten Larven; 6,7) DNS der mit Ampicillin und Chloramphenicol gefütterten Larven; 8,9) DNS der mit Ampicillin und Tetracyclin gefütterten Larven; 10) Negativkontrolle mit Aqua dest.; 11) Positivkontrolle mit 16S ribosomaler DNS

In den Spalten Zwei bis Vier des Gelbildes (Abb. 8) waren Banden mit einer Größe von ca. 1500 bp zu sehen. Die darauffolgenden Spalten wiesen keine Banden auf. Erst in Spalte Elf wurde erneut eine Bande der Größe 1500 bp sichtbar.

### 3.4 Transformation von *Enterococcus mundtii*

Verschiedene Transformationsmethoden wurden getestet, um herauszufinden, welche sich am besten für gram-positive *E. mundtii* eignet. Ziel war es, ein GFP- und sich für die Selektion eignendes Antibiotikaresistenzgen-codierendes Plasmid in die Bakterien zu transformieren.

Die Methode der Transformation mit Pferdeserum brachte keine transformierten Bakterien hervor.

Durch die Transformation mit Hitzeschock konnten ebenfalls keine Transformanten hergestellt werden.

Die Variante der Co-Inkubation brachte für die Plasmide pALSM01, pALSM02 und pCM18 keine transformierten *E. mundtii* hervor. Auch die nichttransformierte Kontrolle wuchs nicht auf den Selektivmedien der zuvor genannten Plasmide. Auf dem Selektivmedium für mit pBSU100-transformierte Bakterien waren ca. 223 Bakterienkolonien und für mit pBSU101-transformierte Bakterien ca. 322 Kolonien zu erkennen. Unerwarteterweise wuchsen 48 Bakterienkolonien der nichttransformierten Kontrolle auf demselben Selektivmedium.

## Ergebnisse

Bei der Elektroporation waren nach zweitägiger Inkubation auf dem Selektivmedien mit pALSM01-transformierten Bakterien zwei Bakterienkolonie zu sehen. Auf den Platten mit des Selektivmediums für pALSM02 waren bei einem doppelten Reaktionsansatz vier Bakterienkolonien zu sehen. Die Transformation mit pCM18 war nicht erfolgreich. Auf den Kontrollplatten mit antibiotikareichem Medium wuchsen keine Bakterienkolonien.

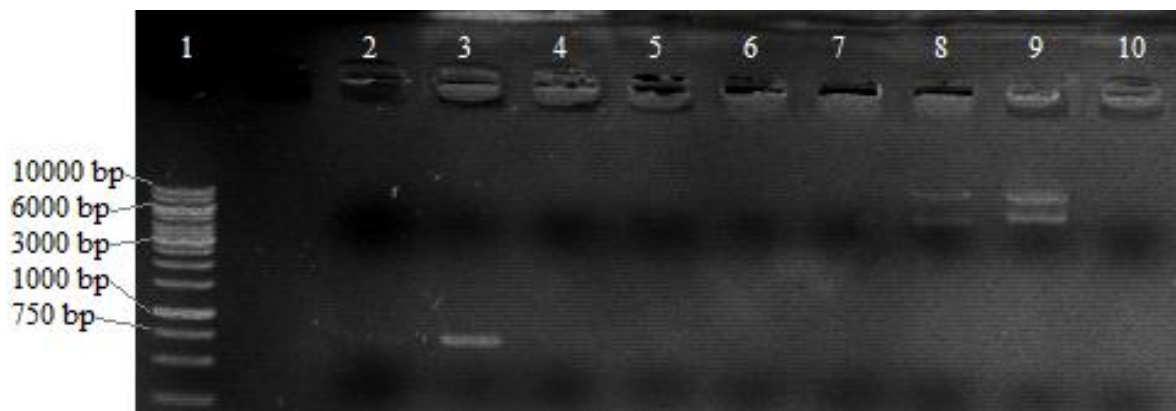
### 3.5 Nachweis einklonierter Plasmide bzw. in das Bakteriengenom integrierter Plasmid-DNS

Nachgewiesen wurde, ob sich die zuvor eintransformierten Plasmide in den potentiellen *E. mundtii*-Transformanten befanden. Es sollte sichergestellt werden, dass es sich bei den auf dem Selektivmedium gewachsenen Bakterienkolonien um Transformanten handelte und nicht um Bakterien mit einer natürlichen Antibiotikaresistenz.

#### 3.5.1 Nachweis mit DNS-Extraktion und PCR

Es sollte die potentiell vorhandene Plasmid-DNS nachgewiesen werden. Getestet wurden die in Punkt 3.3.4 erhalten Transformanten.

Nach der DNS-Extraktion wurde die PCR mit den Primern EECT down HindIII und EECT up SphI durchgeführt.

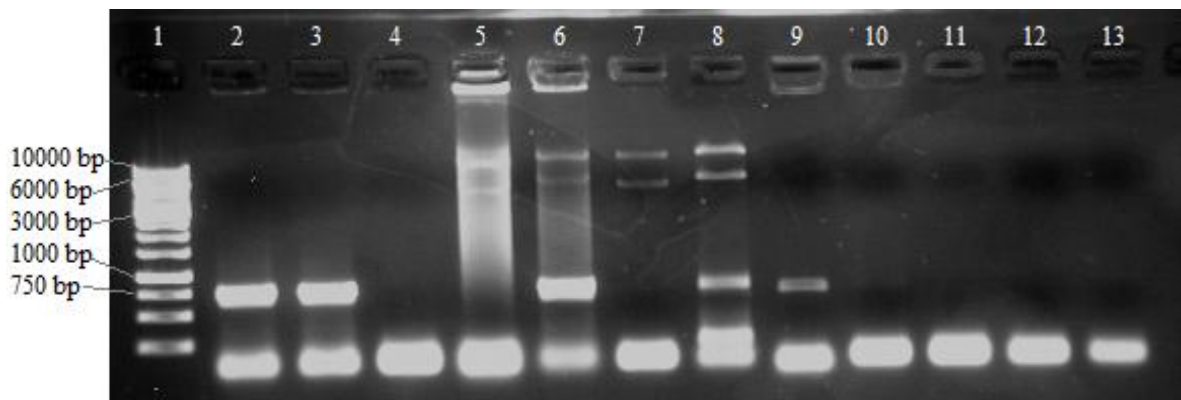


**Abbildung 9:** Transformantentest mit Primern EECT down HindIII und EECT up SphI. 1) DNS-Massenstandard; 2) erste Transformante mit pALSM02; 3) zweite Transformante mit pALSM02; 4) dritte Transformante mit pALSM02; 5) vierte Transformante mit pALSM02; 6) erste Transformante mit pALSM01; 7) zweite Transformante mit pALSM01; 8) reiner Plasmid pALSM01 als Positivkontrolle; 9) reiner Plasmid pALSM02 als Positivkontrolle; 10) Negativkontrolle mit Aqua dest.

## Ergebnisse

Im Gelbild (Abb. 9) waren eine sehr schwache Bande in Spalte Zwei und eine weitere stärkere in Spalte Drei zu erkennen. Anhand des DNS-Massenstandards in Spalte Eins ließ sich eine Größe der Banden von 750 bp feststellen. In den darauffolgenden Spalten Fünf bis Acht waren keine Banden zu erkennen. Je zwei Banden der Plasmide pALSM01 und pALSM02 waren in den Spalten Neun und Zehn zu sehen. Die schwerere und höher gelegene der beiden wies eine Größe von ca. 10000 bp und die kleinere eine Größe von ungefähr 6000 bp auf. Sie wiesen jedoch keine Amplifikation auf der Höhe von 750 bp auf. Grund dafür ist, dass sich die verwendeten Primer nicht optimal zur EGFP-Gen-Amplifikation eigneten. Die Negativkontrolle in Spalte Elf enthielt wie erwartet keine Bande.

Zur weiteren Kontrolle wurden für die darauffolgende PCR nur noch die Transformanten eins und zwei mit pALSM02 verwendet. Zur Amplifikation dienten die Primer GFPf/r, welche speziell das EGFP-Gen amplifizieren.



**Abbildung 10:** Transformantentest mit Primer GFPf/r. 1) DNS-Massenstandard; 2) erste Transformante mit pALSM02; 3) zweite Transformante mit pALSM02; 4) *E. mundtii*-DNS; 5) mit pALSM01 transformierte *E. coli*; 6) mit pALSM02 transformierte *E. coli*; 7) reiner Plasmid pALSM01 als Positivkontrolle; 8) reiner Plasmid pALSM02 als Positivkontrolle; 9) kontaminierte Spalte; 10) Negativkontrolle mit DNS die nicht von GFPf/r amplifiziert wird; 11-13) Negativkontrolle mit Aqua dest.

In diesem Gelbild (Abb. 10) wurden in Spalten Zwei und Drei erneut je eine Bande mit der Größe von ca. 750 bp sichtbar. Spalte Vier wies keine Bande auf. In Spalten Fünf und Sechs waren jeweils auf gleicher Höhe zwei schwache Banden zu erkennen. Die schwerere und am höchsten gelegene der beiden Banden hatte eine Größe von ungefähr 10000 bp und die kleinere, darunterliegende eine Größe von 6000 bp. Zudem war in Spalte Sechs noch eine sehr stark ausgeprägte Bande vorhanden. Sie hatte eine Größe von ca. 750 bp. Die

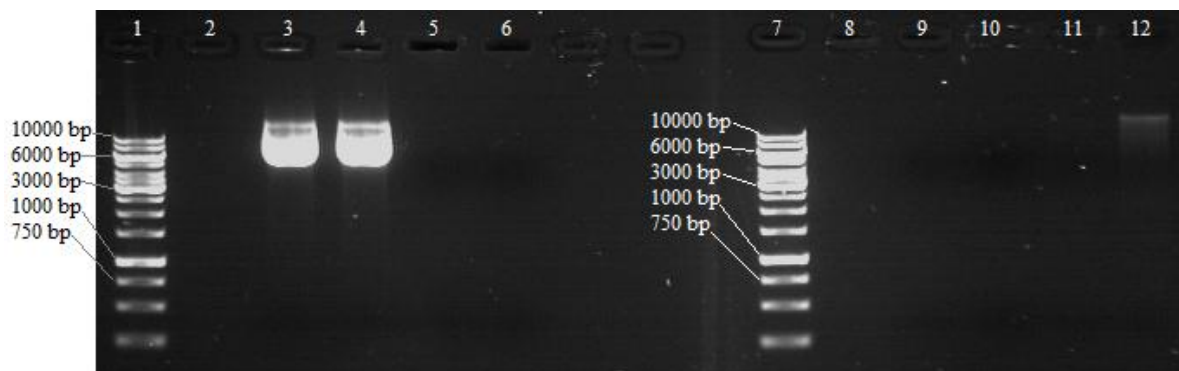
## Ergebnisse

gleiche Bandenverteilung wie die Spalten Fünf und Sechs wiesen die Spalten Sieben und Acht auf. In der neunten Spalte war eine Bande mit einer Größe von ca. 750 bp sichtbar, jedoch war diese auf eine Kontamination zurück zu führen. Es wurde die selbe Negativkontrolle in Spalte Neun gegeben wie auch in Spalte Zehn. Vermutlich ist aus Spalte Acht etwas in die benachbarte Spalte übergeflossen und ergab so die Bande in Spalte Neun. In allen darauffolgenden Spalten waren keine weiteren Banden zu sehen.

### 3.5.2 Testung auf das Plasmid bzw. in das Bakterienchromosom integrierte Plasmid-DNS bei Kultivierung mit und ohne Antibiotika

Nachdem sicher gestellt wurde, dass es sich um Transformanten mit dem Plasmid pALSM02 handelte, wurde getestet, ob dieser als Plasmid im Bakterium vorlag und innerhalb von sieben Tage abgestoßen wird oder die Gensequenz ins Bakterienchromosom integriert wird. Getestet wurde dies bei der Kultivierung in antibiotikafreiem Medium. Gleichzeitig sollte nachgewiesen werden, dass die Plasmid-DNS im Bakterium bleibt, solange dieses in antibiotikahaltigem Medium kultiviert wird.

Mit der Minipräparation (siehe 2.2.6) wurde nachgewiesen, ob nach mehreren Tagen Kultivierung, das Plasmid pALSM02 noch in den Transformanten vorhanden war. Das folgende Bild zeigt das Ergebnis des ersten Tages.



**Abbildung 11:** Gelbild der Minipräparation am ersten Tag der Kultivierung der Transformanten mit und ohne Antibiotika. 1,7) DNS-Massenstandard; 3) P02-E; 4) P02; 5) T1-E; 6) T1; 9) T2-E; 10) T2; 11) KD251 kultiviert in antibiotikafreiem Medium; 12) *E. coli* kultiviert in antibiotikafreiem Medium. P = *E. coli* transformiert mit pALSM02; E = mit Erythromycin kultiviert; T = Transformante (*E. mundtii* transformiert mit pALSM02)

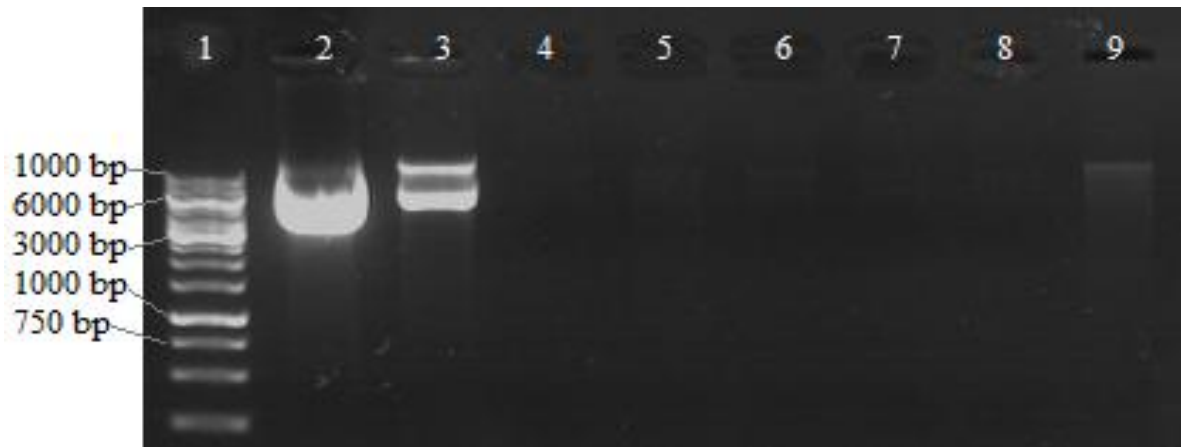
In den Spalten Drei und Vier des Gelbildes (Abb. 11) sind je Zwei Banden zu sehen. Im Vergleich zum DNS-Massenstandard wies die obere der Banden eine Größe von mehr als



## Ergebnisse

10000 bp auf, die untere, dickere Bande eine Größe von ca. 6000 bp. In Spalte Zwölf war eine sehr schwache Bande mit der Größe von ungefähr 10000 bp zu sehen. Alle darauffolgenden Spalten verfügten über keine weiteren sichtbaren Banden.

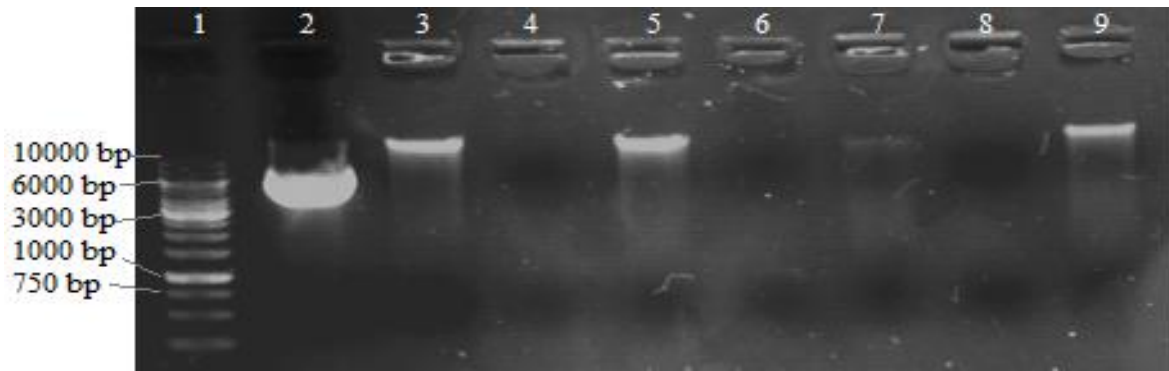
Die am fünften Tag des Experimentes durchgeführte Minipräparation lieferte ein ähnliches Gelbild.



**Abbildung 12:** Gelbild der Minipräparation am fünften Tag der Kultivierung. 1) DNS-Massenstandard; 2) P02-E; 3) P02; 4) T1-E; 5) T1; 6) T2-E; 7) T2; 8) KD251 kultiviert in antibiotikafreiem Medium; 9) *E. coli* kultiviert in antibiotikafreiem Medium. P = *E. coli* transformiert mit pALSM02; E = mit Erythromycin kultiviert; T = Transformante (*E. mundtii* transformiert mit pALSM02)

Auch hier (Abb. 12) waren in den Spalten Zwei und Drei Banden zu erkennen. In der zweiten Spalte waren diese verschwommen. Zu sehen war eine schwache Bande mit der Größe von ca. 10000 bp und eine stark ausgebildete Bande, deren Größe nicht genau ermittelbar war. In der dritten Spalte befanden sich zwei weitere, nicht verschwommene Banden mit den selben Größen. Demzufolge ließ sich hier, für die untere der Banden, eine Größe von ca. 6000 bp feststellen. Bis zur Spalte Acht folgten keine weiteren Banden. Erst in Spalte Neun war erneut eine schwach ausgeprägte Bande mit der Größe von ca. 10000 bp zu erfassen. Auch nach dem fünften Tag Kultivierung mit und ohne Antibiotika konnte kein Plasmid in den *E. mundtii*-Transformanten nachgewiesen werden. Vermutlich wurden sie in das Bakterienchromosom integriert oder die Konzentration der Plasmid-DNS war zu gering, um sie mittels Gelelektrophorese nachzuweisen.

## Ergebnisse



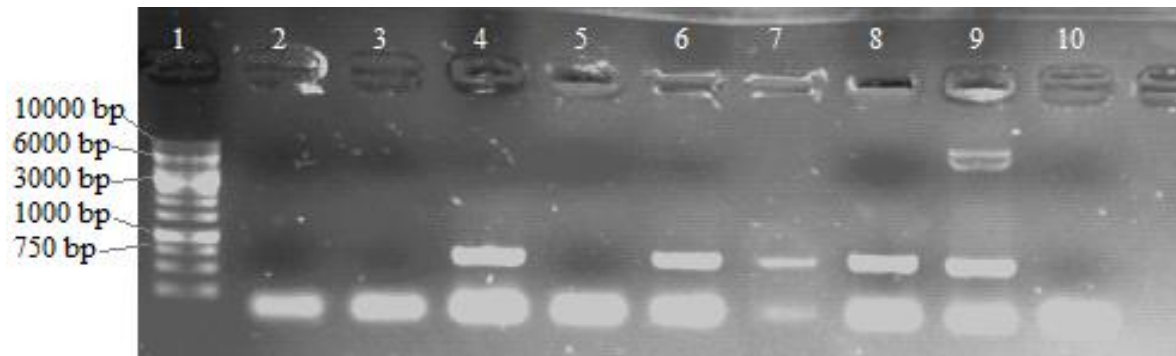
**Abbildung 13:** Gelbild der Minipräparation am siebten Tag der Kultivierung. 1) DNS-Massenstandard; 2) P02-E; 3) P02; 4) T1-E; 5) T1; 6) T2-E; 7) T2; 8) KD251 kultiviert in antibiotikafreiem Medium; 9) *E. coli* kultiviert in antibiotikafreiem Medium. P = *E. coli* transformiert mit pALSM02; E = mit Erythromycin kultiviert; T = Transformante (*E. mundtii* transformiert mit pALSM02)

In der zweiten Spalte des Gelbildes (Abb. 13) war eine breite, verschwommene Bande zu sehen. Mit Hilfe des DNS-Massenstandards war eine Bandengröße von schätzungsweise 6000 bp zu bestimmen. Die zweite Spalte wies eine deutliche Bande in der Höhe von 10000 bp auf. Drei weitere Banden dieser Größe, aber mit unterschiedlicher Intensität, waren in den Spalten Fünf, Sieben und Neun zu erkennen. In den übrigen Spalten Vier, Sechs und Acht waren keine Banden vorhanden. Das Ergebnis dieser Minipräparation weist auf eine Kontamination der antibiotikafreien Ansätze hin.

Mit Hilfe der DNS-Extraktion mit anschließender PCR und Gelelektrophorese (siehe 2.2.6) wurde festgestellt, ob die Plasmid-DNS aus den Transformanten im Laufe der Kultivierung verlorengeht oder erhalten bleibt. Außerdem konnte so, in Kombination mit der Minipräparation, eine mögliche Integration der Plasmid-DNS in das Bakterienchromosom nachgewiesen werden. Laut Lemme et al. ist jedoch eine Integration des Plasmids in das Bakterienchromosom bei *Streptococcus mutans* nicht bekannt (Lemme et al., 2011).

Nach den DNS-Extraktionen an den entsprechenden Kultivierungstagen wurde ein PCR-Ansatz mit allen Proben erstellt. Mitgeführt wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Beide Kontrollen wurden in dem Gelbild, der am siebten Tag extrahierten DNS, per Gelelektrophorese aufgeschlüsselt (Abb. 14). In den Proben des ersten und fünften Kultivierungstages konnten überall Amplifizierungen festgestellt werden. In allen Transformantenproben wurde eine Bande der Größe 750 bp festgestellt. Jedoch ist das Ergebnis der ersten Tage nicht relevant. Wichtig sind nur die Ergebnisse des letzten Tages, welche im folgenden Gelbild dargestellt werden (Abb. 14).

## Ergebnisse



**Abbildung 14:** Extrahierte DNS nach der PCR mit den Primern GFPf/r am siebten Tag. 1) DNS-Massenstandard; 2) P02-E; 3) P02; 4) T1-E; 5) T1; 6) T2-E; 7) Pipettierfehler; 8) T2; 9) pALSM02 als Positivkontrolle; 10) Negativkontrolle mit Aqua dest. P = *E.coli* transformiert mit pALSM02; E = mit Erythromycin kultiviert; T = Transformante (*E. mundtii* transformiert mit pALSM02)

In den Spalten Zwei, Drei und Fünf waren keine Banden zu erfassen (Abb. 14). Spalten Vier, Sechs und Acht wiesen jeweils eine Bande der Größe 750 bp auf. Eine weitere Bande dieser Größe befand sich in der Spalte der Positivkontrolle. Zudem waren hier noch zwei zusätzliche Banden mit den Größen von ca. 10000 bp und 6000 bp zu erkennen. Die Negativkontrolle wies keine Bande auf. Aufgrund eines Pipettierfehlers wurde Spalte Sieben nicht weiter betrachtet. Es ist zu vermuten, dass das Plasmid in den *E. coli* und den ersten *E. mundtii* Transformanten nur instabil vorlag und deswegen verloren ging.

### 3.5.3 Fluoreszenzmessungen der Transformanten

Mit dem Lumineszenz-Messgerät wurde die Fluoreszenzintensität der pALSM02 enthaltenden Transformanten und der natürlichen *E. coli* und *E. mundtii* gemessen. Es wurde untersucht, ob die Transformanten anhand ihrer Fluoreszenz vom Wildtyp zu unterscheiden sind.

Gemessen wurde die Fluoreszenz der zwei *E. mundtii*-Transformanten und der *E. coli*-Transformanten im Vergleich zu der Fluoreszenzintensität ihrer natürlichen, nicht transformierten Formen. Die Fluoreszenzintensität des *E. coli* Wildtyps lag bei 96969 FU und wurde durch die Intensität der *E. coli*-Transformanten dividiert. Der *E. mundtii* Wildtyp hatte eine Fluoreszenzintensität von 197397 FU und wurde ebenfalls durch die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der *E. mundtii*-Transformanten dividiert. Das Ergebnis der Fluoreszenzintensität wird somit an der Differenz von Fluoreszenzintensität transformierter Bakterienstämme zu der Fluoreszenzintensität ihrer natürlichen Form

## Ergebnisse

deutlich. Die Werte der Differenzen befinden sich im Anhang (Tab. 9g). Alle Differenzen nahmen einen Wert um Eins an. Demnach bestand kein wesentlicher Unterschied zwischen der Fluoreszenzintensität der Transformanten und der Wildtyp Bakterien.

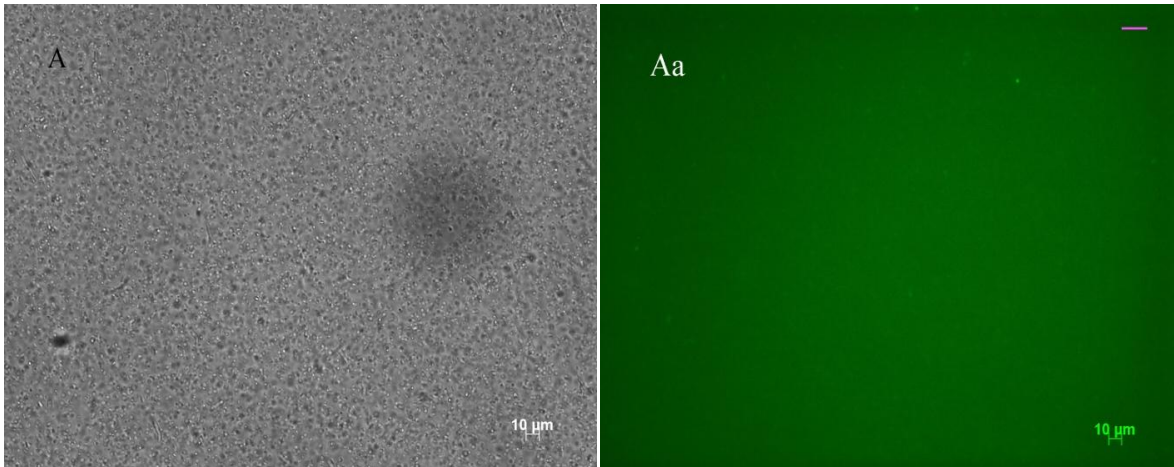
Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops wurde versucht die Fluoreszenz der transformierten *E. mundtii* zu visualisieren. Es sollte herausgefunden werden, ob sich die Fluoreszenzintensitäten optisch unterscheiden lassen und die Transformanten später im Insektendarm optisch nachgewiesen werden können.

Die Abbildung der Mikroskopbilder der mit pALSM02 transformierten *E. coli* befindet sich im Anhang (Abb. 9h). Auf Bild A sind zahlreiche stäbchenförmige Bakterien zu sehen. Im Bild Aa sind viele helle Bakterien auf dunklem Hintergrund zu erkennen. Ein ähnlicher Sachverhalt ist auf den darunter dargestellten Mikroskopbildern zu sehen. Im Bild B befinden sich erneut viele stäbchenförmige Bakterien, welche in Bild Ba durch Anregung der Fluoreszenz als helle Punkte bzw. Striche auf dem dunklen Hintergrund wahrzunehmen sind.

Auch die Mikroskopbilder der ersten *E. mundtii*-Transformante befinden sich im Anhang (Abb. 9i). Bild A ließ zahlreiche kokkenförmige Bakterien erkennen. Unter Anregung der Fluoreszenz konnten in Bild Aa jedoch kaum noch Bakterien sichtbar werden. Darstellung B lieferte ein ähnliches Bild wie in A. Mit Einwirkung von Fluoreszenzstrahlung konnten auf Bild Ba einzelne Bakterien, wie z.B. in der 5 µm Skala, sichtbar werden.

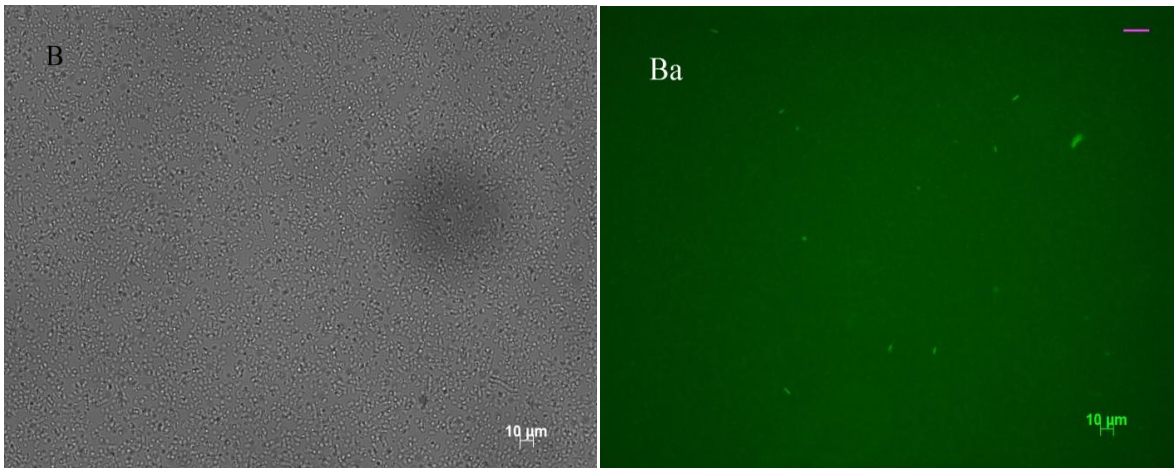
Die Mikroskopbilder der zweiten *E. mundtii*-Transformante sind im Anhang zu finden (Abb. 9j). Bild A zeigte viele kokkenförmige Bakterien. Bei Betrachtung von Bild Aa wurden vier fluoreszierende Bakterien sichtbar. In Bild B sind erneut kokkenförmige Bakterien zu erkennen, von denen unter Einwirkung von Fluoreszenzstrahlung ca. 12 Bakterien visuell aufleuchteten.

## Ergebnisse



**Abbildung 15:** Mikroskopaufnahme von *E. coli*; A) 20000fache Vergrößerung; Aa) 20000fache Vergrößerung unter Einwirkung von Fluoreszenzstrahlung

Auf Bild A (Abb. 15) sind kokkenförmige als auch stäbchenförmige Bakterien zu erkennen. Dargestellt werden nichttransformierte *E. coli*. Da jedoch zwei unterschiedlich geformte Bakterienarten zu beobachten waren, ist zu vermuten, dass eine Kontamination vorlag. Bei Betrachtung unter Fluoreszenzanregung wurden keine Bakterien sichtbar.



**Abbildung 16:** Mikroskopaufnahme von *E. mundtii*; B) 20000fache Vergrößerung; Ba) 20000fache Vergrößerung unter Einwirkung von Fluoreszenzstrahlung

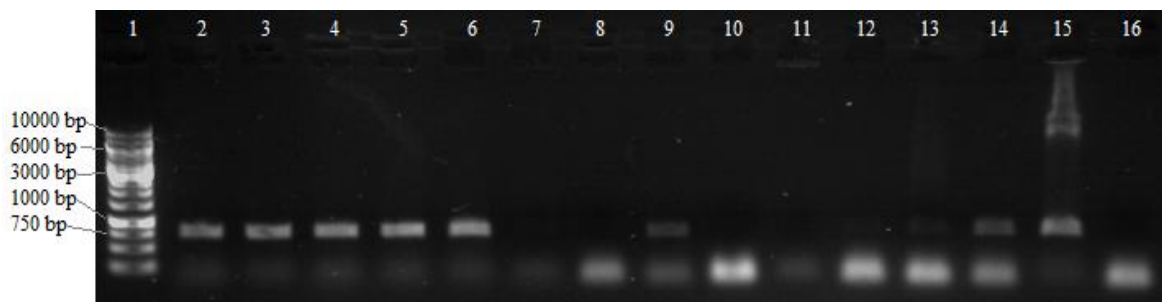
Auf dem Bild B (Abb. 16) sind zahlreiche kokkenförmige und teilweise in Ketten angeordnete Bakterien zu erkennen. Nach Anregung der Fluoreszenz konnten ca. elf fluoreszierende Bakterien visualisiert werden.

## Ergebnisse

### 3.6 Nachweis der Transformanten im Generationskreislauf der *Spodoptera littoralis*

#### 3.6.1 DNS-Extraktion mit anschließender PCR und Gelelektrophorese

Nachgewiesen wurde, ob sich *E. mundtii*-Transformanten nach mehrtägiger Zufütterung im Insekten Darm ansiedelten. Getestet wurde dabei auf das GFP-Gen, welches durch die Transformation mit pALSM02 in *E. mundtii* eingebracht wurde. Es wurden alle Stadien von *S. littoralis* untersucht, um zu sehen, ob die eingebrachten Darmbakterien im Entwicklungszyklus weitergegeben werden. Die DNS wurde aus den Larvendärmen extrahiert.

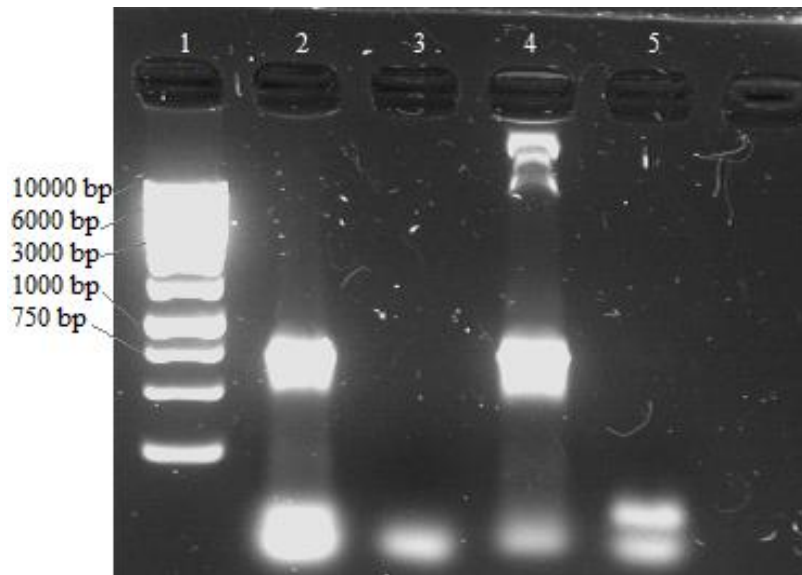


**Abbildung 17:** Gelbild der PCR nach der DNS-Extraktion aus *Spodoptera littoralis* Larven und Puppen. 1) DNS-Massenstandard; 2, 3) B; 4) BE; 5, 6) KB; 7) KBE; 8) Bp; 9) BEp; 10) KBp; 11) KBEp; 12) *E. mundtii* KD251; 13) *E. coli*, 14) *Lactobacillus lactis*, 15) pALSM02 als Positivkontrolle, 16) Negativkontrolle mit Aqua dest. B = Larven zuerst gefüttert mit Antibiotika, dann mit Transformanten; BE = Larven zuerst gefüttert mit Antibiotika, dann mit Transformanten+Erythromycin; KB = Larven zuerst gefüttert ohne Antibiotika, dann mit Transformanten; KBE = Larven zuerst gefüttert ohne Antibiotika, dann mit Transformanten+Erythromycin; p = Puppen aus zuvor genannten Ansätzen

In den Spalten Zwei bis Sechs sowie Neun, Zwölf, Dreizehn und Vierzehn waren Banden mit einer Größe von ca. 750 bp zu erkennen (Abb. 17). In der Spalte Fünfzehn wurden Banden der Größe 750 bp, 6000 bp und 10000 bp sichtbar. In allen weiteren Spalten konnten keine Banden erkannt werden.

Nach dem Sezieren der Falter wurde auch aus ihrem Darm die DNS extrahiert.

## Ergebnisse



**Abbildung 18:** Gelbild der PCR der *Spodoptera littoralis*-Falter-DNS. 1) DNS-Massenstandard; 2) DNS aus Falterdarm, zuerst gefüttert mit Antibiotika, anschließend mit transformierten *E. mundtii* und 4 µl/ml Erythromycin; 3) Kontroll-DNS aus Larvendarm, nur mit künstlichem Futter gefüttert; 4) pALSM02 als Positivkontrolle; 5) Negativkontrolle mit Aqua dest.

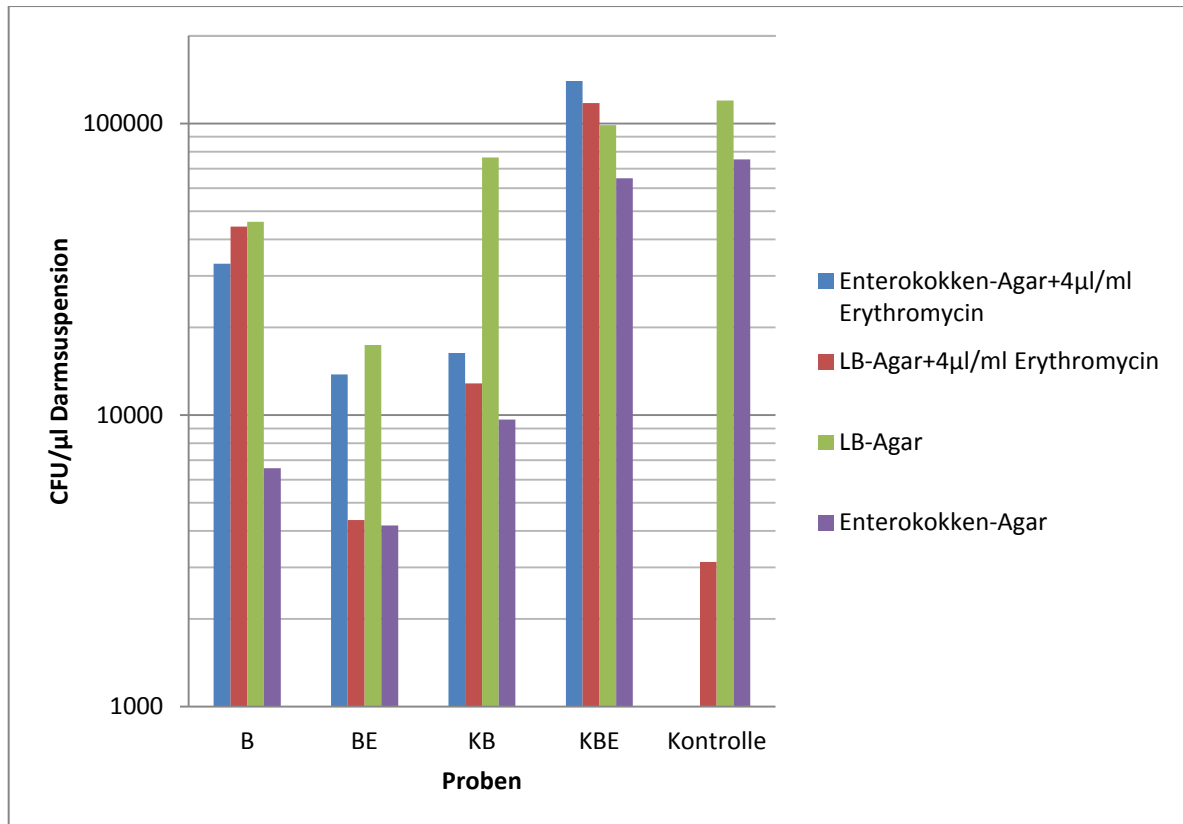
In der zweiten Spalte (Abb. 18) war eine sehr dicke Bande mit einer ungefähren Größe von 750 bp zu erkennen. Spalten Drei und Fünf wiesen keine Banden auf. Die Positivkontrolle in der vierten Spalte zeigte eine sehr dicke Bande der Größe von ca. 750 bp und zwei schwächere, verschmierte Banden auf der Höhe von ungefähr 10000 bp und wenig größer.

### 3.6.2 Ausplattierung

Das Ausplattieren sollte zeigen, wie viele lebende *E. mundtii*-Transformanten und andere erythromycinresistente Bakterien sich im Vergleich zur Gesamtzahl der Darmbakterien im Darm der Insekten befanden. In den folgenden Abbildungen werden die berechneten Mittelwerte der Bakterienzahl/µl angegeben. Das folgende Bild zeigt die Ausplattierung der Larvendärme.



## Ergebnisse



**Abbildung 19:** Darstellung der Anzahl der Bakterien pro  $\mu\text{l}$  Larvendarmsuspension bei Kultivierung auf Enterokokken-Agar mit  $4 \mu\text{l/ml}$  Erythromycin, LB-Agar mit  $4 \mu\text{l/ml}$  Erythromycin, LB-Agar und Enterokokken-Agar. B = gefüttert 5 d + Antibiotika, dann mit Transformante – Antibiotika; BE = gefüttert 5 d + Antibiotika, dann mit Transformante + Antibiotika; KB = gefüttert 5 d – Antibiotika, dann mit Transformante – Antibiotika; KBE = gefüttert 5 d ohne Antibiotika, dann mit Transformante + Antibiotika

Der größte Teil im Ansatz B bestand aus erythromycinresistenten Bakterien, welche auf erythromycinhaltigem LB-Agar wuchsen (Abb. 19). Ungefähr drei Viertel der Gesamtzahl konnten als erythromycinresistente Enterokokken identifiziert werden. Jedoch ist die Gesamtzahl der resistenten Enterokokken fünfmal größer als die der Enterokokken, welche auf Enterokokken-Agar kultiviert wurden. Bei der Probe BE ist zu erkennen, dass die Zahl der auf erythromycinhaltigen Enterokokken-Agar wachsenden Bakterien nur wenig kleiner war als die Gesamtzahl aller CFU/ $\mu\text{l}$  Larvendarmsuspension. Die CFU/ $\mu\text{l}$ , welche auf Enterokokken-Agar und erythromycinhaltigem LB-Medium wuchsen, waren nur ein Viertel mal so groß wie die Gesamtzahl aller CFU/ $\mu\text{l}$ .

Probe KB wies eine große Gesamtmenge an CFU/ $\mu\text{l}$  Larvendarmsuspension auf. Die Zahl der erythromycinresistenten Enterokokken pro  $\mu\text{l}$  Larvendarmsuspension war nur knapp ein Viertel mal so groß wie die Gesamtzahl und die der auf erythromycinhaltigem LB-Agar



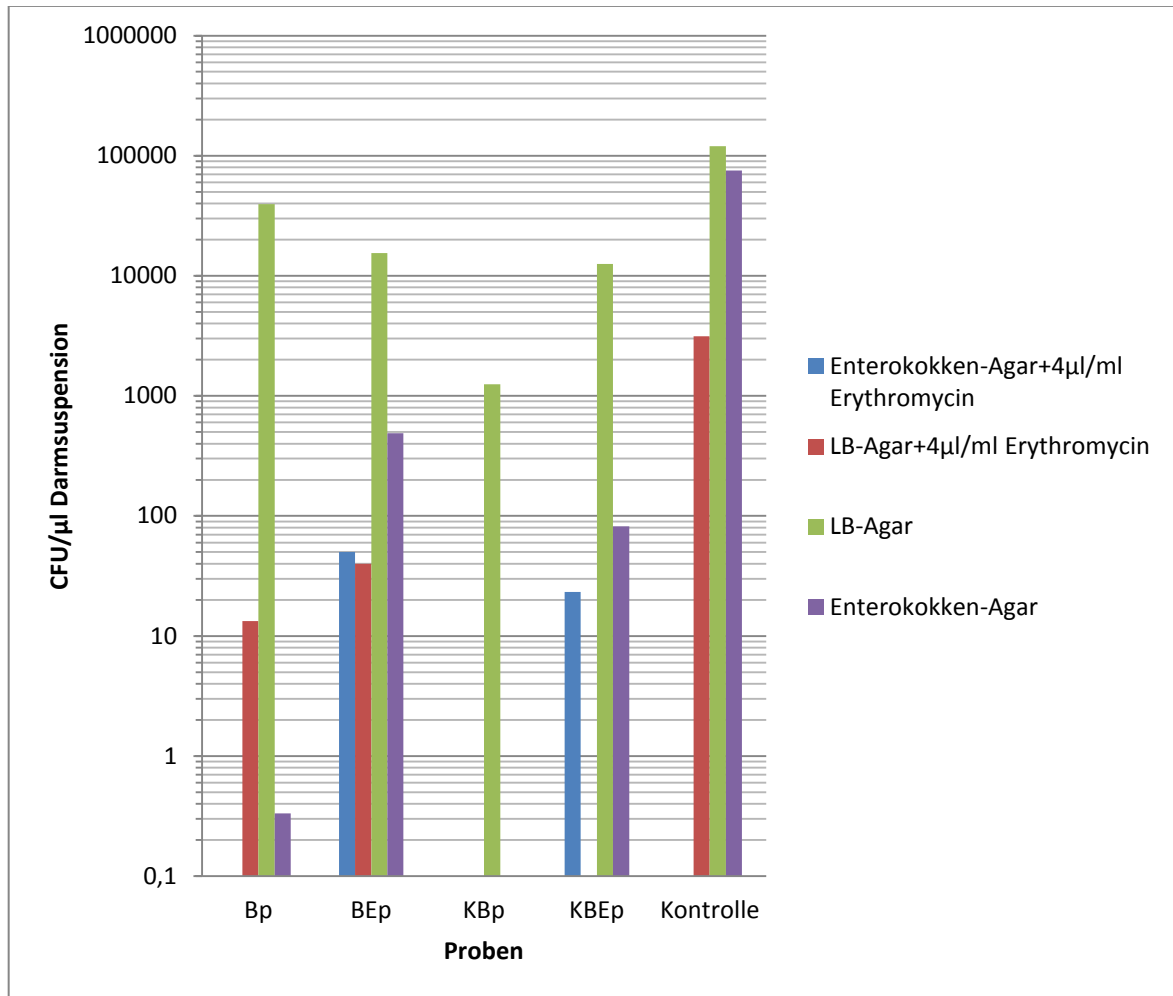
## Ergebnisse

wachsenden Bakterien nur ein Sechstel der Gesamtzahl. Einen noch kleineren Anteil nahmen die nicht erythromycinresistenten Enterokokken mit 9655 CFU/ $\mu$ l Larvendarmsuspension ein. Im Ansatz KBE wuchs eine nicht zählbare Anzahl an Bakterien auf dem erythromycinhaltigen Enterokokken-Agar. Um zu verdeutlichen, dass dies die größte Menge an Bakterien in diesem Ansatz war, wurde der Wert auf 140000 CFU/ $\mu$ l gesetzt. Die auf LB-Agar wachsende Gesamtzahl der Bakterien pro  $\mu$ l Darmsuspension hatte einen wesentlich kleineren Wert von 98680 CFU/ $\mu$ l. Auf dem erythromycinhaltigen LB-Agar wuchsen ein Fünftel mehr Bakterien im Vergleich zu reinen LB-Agar. Die Anzahl der Bakterien auf dem Enterokokken-Agar betrug zwei Drittel der Gesamtzahl der Bakterien pro  $\mu$ l Larvendarmsuspension. In der Kontrolle konnte eine Gesamtzahl von ca. 120033 CFU/ $\mu$ l festgestellt werden. Zirka zwei Drittel diesen Wertes nahm die Zahl der auf Enterokokken-Agar gewachsenen Enterokokken ein. Ein sehr kleiner Teil von ca. 3134 CFU/ $\mu$ l wies eine Erythromycinresistenz auf. Auf dem erythromycinhaltigen Enterokokken-Agar wuchsen dagegen keine Bakterien.

Es ist zu erkennen, dass in allen Proben der mit transformierten *E. mundtii* gefütterten Larven mehr Enterokokken auf den erythromycinhaltigen Medium gewachsen sind, als auf dem antibiotikafreien Enterokokken-Agar. Im Vergleich zum reinen Enterokokken-Agar waren auf dem erythromycinhaltigem Agar in den Proben B und BE ungefähr viermal so viele Bakterien gewachsen. Im Ansatz KB waren es nur noch doppelt so viele erythromycinresistente Enterokokken im Vergleich zu denen auf dem Enterokokken-Agar. Die Zahl der erythromycinresistenten Enterokokken der Probe KBE wurde schätzungsweise auf 140000 CFU/ $\mu$ l gesetzt, da die Menge der Kolonien auf der erythromycinhaltigen Agarplatte nicht zählbar war. Im Vergleich dazu ist die Menge der auf antibiotikafreiem Enterokokken-Agar gewachsenen Bakterien nur halb so groß. In der Kontrolle befanden sich keine erythromycinresistenten Enterokokken. Hier wuchsen nur Bakterien auf antibiotikafreiem Medium.

## Ergebnisse

Die erhaltenen Werte der Ausplattierung der Puppen sind in folgendem Bild dargestellt.



**Abbildung 200:** Darstellung der Anzahl der Bakterien pro  $\mu\text{l}$  Puppensuspension bei Kultivierung auf Enterokokken-Agar mit  $4\ \mu\text{l/ml}$  Erythromycin, LB-Agar mit  $4\ \mu\text{l/ml}$  Erythromycin, LB-Agar und Enterokokken-Agar. B = gefüttert 5 d + Antibiotika, dann mit Transformante – Antibiotika; BE = gefüttert 5 d + Antibiotika, dann mit Transformante + Antibiotika; KB = gefüttert 5 d – Antibiotika, dann mit Transformante – Antibiotika; KBE = gefüttert 5 d ohne Antibiotika, dann mit Transformante + Antibiotika; p = Puppen aus zuvor genannten Ansätzen

Die auf den LB-Agar gewachsenen Bakterien stellen die Gesamtzahl der in den Puppen enthaltenen Darmbakterien dar. Im Vergleich dazu wuchsen auf den Selektivmedien nur sehr wenige Bakterienkolonien (Abb. 20).

Im Ansatz Bp konnten ca. 13 erythromycinresistente CFU/ $\mu\text{l}$ , welche auf erythromycinhaltigem LB-Agar wuchsen, sowie sehr wenige Enterokokken auf Enterokokken-Agar nachgewiesen werden. Jedoch war kein Bakterienwachstum auf erythromycinhaltigem Enterokokken-Agar zu vermerken.

## Ergebnisse

Der Ansatz BEp wies 489 Enterokokken/ $\mu\text{l}$  auf. Davon wuchs ein kleiner Teil, 50 Enterokokken/ $\mu\text{l}$ , auf dem antibiotikahaltigem Enterokokken-Agar. Auf dem erythromycinhaltigem LB-Agar wurden ca. 40 resistente CFU/ $\mu\text{l}$  gezählt werden.

KBp zeigten nur eine kleine Gesamtzahl von ca. 1246 CFU/ $\mu\text{l}$  Puppensuspension. Es konnten keine erythromycinresistenten Bakterien und Enterokokken nachgewiesen werden.

Ansatz KBEp wies 82 Enterokokken/ $\mu\text{l}$  Puppensuspension auf. Davon wuchsen ca. 23 Enterokokken/ $\mu\text{l}$  auch auf dem erythromycinhaltigen Enterokokken-Agar. Auf dem antibiotikahaltigem LB-Medium wurden keine Kolonien festgestellt.

Die Kontrolle zeigt dasselbe Ergebnis, wie zuvor beschrieben. Sie stellt jedoch nicht die Bakterienkonzentration der Puppensuspension dar, sondern die der Larvensuspension. Im Vergleich der Gesamtzahl aller Enterokokken zu den erythromycinresistenten Enterokokken konnte festgestellt werden, dass im Ansatz Bp eine sehr geringe Anzahl an Enterokokken vorhanden war. Zudem wurden keine erythromycinresistenten Enterokokken nachgewiesen. BEp enthielt die größte Menge an Enterokokken und erythromycinresistenten Enterokokken. Knapp ein Zehntel der Gesamtzahl der Enterokokken war erythromycinresistent. In dem Ansatz KBp konnten weder Enterokokken noch deren erythromycinresistente Formen nachgewiesen werden. In KBEp wurden 82 Enterokokken/ $\mu\text{l}$  Puppensuspension festgestellt. Davon waren ca. 23 Enterokokken/ $\mu\text{l}$ , knapp ein Viertel, erythromycinresistent.

### 4. Diskussion

#### 4.1 Selektion von *Enterococcus mundtii* mittels Antibiotika

Um zu wissen, welche Plasmide sich für die Transformation und spätere Selektion der Transformanten eignen, wurden die Antibiotikaresistenzen der verschiedenen *E. mundtii* Stämme überprüft.

Bekannte Resistenzen bei Enterokokken bestehen gegen Penicillin G, Clindamycin, Vancomycin und Cephalosporine. Häufig bestehen auch Resistenzen gegen Erythromycin, Chloramphenicol und Tetracyclin, die allgemein bakteriostatisch auf Enterokokken wirken. Jedoch stellte sich im Antibiotikaselektionsexperiment heraus, dass KD251 gegen keines dieser Antibiotika resistent ist (siehe 3.1). Weiterhin liegt, anders als bei *E. faecalis* und *E. faecium*, keine Resistenz gegen Streptomycin vor, weshalb auch dieses Antibiotikum nicht weiter getestet wurde. Bei dem Antibiotikum Gentamycin besteht in den meisten Fällen eine Resistenz. Es kann jedoch sein, dass sie nicht hochgradig ausgeprägt ist. Auch wird Rifampicin nur in Kombination zur Bekämpfung von Enterokokken angewendet (Rüden et al., 1998). Um die Wirkung dieser beiden und anderer Antibiotika auf KD251 zu definieren, wurden Selektionsexperimente durchgeführt (siehe 2.2.1). Nach zwei Tagen Inkubation in antibiotikahaltigen Medien konnten bei vielen Antibiotika eindeutige Resistenzen bzw. eindeutige, nicht vorhandene Resistenzen festgestellt werden (Tab. 9a). In den Ansätzen mit Gentamycin, Rifampicin und Spectinomycin wurden keine eindeutigen Resistenzen registriert. Deswegen wurde ein weiteres mehrtägiges Selektionsexperiment mit diesen Antibiotika sowie Ampicillin durchgeführt. Mit Hilfe der  $OD_{600}$  wurde festgestellt, ob Bakterienwachstum vorhanden war oder nicht.

Anhand der Wachstumskurve von *E. mundtii* Stamm 1 (Abb. 3) ist zu erkennen, dass dieser Stamm keine Resistenzen gegen die eingesetzten Antibiotika aufweist. Lediglich der Ansatz mit Rifampicin wies eine etwas größere optische Dichte auf. Da die optische Dichte der Kontrolle wesentlich höher lag und der Rifampicinansatz keinen ähnlichen Verlauf zeigte, lässt sich sagen, dass bei Stamm 1 keine oder nur eine sehr geringe Rifampicinresistenz vorhanden ist.

Der Kurve (Abb. 4) nach zu urteilen, besitzt *E. mundtii* Stamm 2 keine Resistenz gegen Gentamycin, Spectinomycin und Ampicillin. Im Ansatz mit Rifampicin war eine Steigung

## Diskussion

der optischen Dichte zu vermerken. Demnach besitzt Stamm 2 eine Rifampicinresistenz, die jedoch nicht ausreicht, um einen normalen Wachstumsverlauf zu erreichen.

Stamm KD212 (Abb. 5) besitzt, wie Stamm 1, keine Resistenzen gegen Gentamycin, Spectinomycin und Ampicillin. Im rifampicinhaltigen Medium wies er jedoch auch eine leicht erhöhte optische Dichte auf. Folglich verfügt auch er über eine geringe Rifampicinresistenz, die ihm ein geringes Wachstum ermöglichte.

Stamm KD251 besitzt keine Resistenzen gegen die getesteten Antibiotika. Alle Werte der optischen Dichte der Ansätze mit Antibiotika waren annähernd Null und folgten in keinem Punkt dem Wachstumsverlauf der Kontrolle (Abb. 6).

Da Stamm KD251 als einziger eindeutig keine Resistenz gegen Rifampicin und die anderen Antibiotika aufwies, eignete er sich am besten für die geplanten Transformationsexperimente. In allen weiteren Versuchen wurde mit dem *E. mundtii* Stamm KD251 gearbeitet.

### **4.2 Wachstumsverlauf der *Spodoptera littoralis* Larven**

In diesem Experiment wurde das Wachstumsverhalten der Larven bei Fütterung mit Antibiotika beobachtet. Anhand der Wachstumskurve (Abb. 7) sind keine Unterschiede im Wachstumsverlauf der mit verschiedenen Antibiotikamischungen gefütterten Larven zu erkennen. Die Antibiotika beeinträchtigen also nicht das Wachstum und die Entwicklung der Larven. Auch T.L. Wilkinson beobachtete, dass bei der Fütterung der Blattläuse *Acyrtosiphon pisum* mit Antibiotika, keine negativen Auswirkungen auf deren Insektenbiologie auftraten. Auch in diesem Experiment war es das Ziel, mit der Antibiotikafütterung symbiotische Bakterien der Blattläuse zu eliminieren. Der Verlust der Symbionten und das Zufüttern der Antibiotika hatte keine Auswirkungen auf das Wachstum (Wilkinson, 1998). Eine natürliche Entwicklung ist sehr wichtig, um spätere Ergebnisse des Experiments verallgemeinern zu können und diese nicht nur auf einen unnatürlichen Zustand der Larven zurückzuführen. Zudem können so, durch Einbringen fluoreszierender *E. mundtii*, die normalen im Insekt ablaufenden Entwicklungsvorgänge beobachtet werden.

## Diskussion

### 4.3 Nachweis von *Enterococcus mundtii* im Darm von *Spodoptera littoralis*

Ziel war es, die in der natürlichen Darmflora der *S. littoralis* Larven vorkommenden Enterokokkenarten mit Hilfe von verschiedenen Antibiotikamischungen zu reduzieren. Dies war notwendig, um den späteren *E. mundtii*-Transformanten nach dem Zufüttern die Ansiedlung im Larvendarm zu erleichtern. Für den Erfolg des Experimentes ist eine Integration der Transformanten in der Darmflora notwendig, um die Bakterien während des Entwicklungszyklus der *S. littoralis* beobachten zu können.

Im Vorfeld des Versuches wurden Recherchen über die natürliche Antibiotikaresistenz der am häufigsten im Darm vorkommenden Bakterienarten durchgeführt. Nach Tang, X. sind neben verschiedenen Enterokokkenarten wie *E. faecalis*, *E. casseliflavus* und *E. mundtii*, *Chlostridium sp.*, *Massilia timonae* und *Propionibacterium acnes* die am häufigsten im Larvenstadium der *S. littoralis* auftretenden Bakterien (Abb. 1) (Tang et al., 2012). Zur Fütterung der Larven wurden letztendlich Gemische aus Erythromycin und Ampicillin, Chloramphenicol und Ampicillin sowie Tetracyclin und Ampicillin eingesetzt, da diese vor allem gegen die Kernbakterienart der Enterokokken wirksam sind.

Durch die PCR wurde die 16S ribosomale DNS der *Enterococcus sp.* amplifiziert und anschließend durch die Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Die Banden der Kontrolle im Gelbild (Abb. 8) visualisieren die noch im Darm vorhandenen natürlichen *Enterococcus sp.* Dadurch, dass die Raupen nicht mit Antibiotikagemischen gefüttert wurden, konnte ihre natürliche Darmflora nicht angegriffen und die darin vorkommenden *Enterococcus sp.* nicht dezimiert werden. Die Antibiotikamischung aus Ampicillin und Erythromycin konnte nicht die im Darm vorhandenen *Enterococcus sp.* ausreichend reduzieren, da im Gelbild in der Spalte Vier eindeutig eine Bande zu sehen ist. Aus diesem Grund war für die Fortführung des Experimentes die weitere Verwendung dieser Antibiotikamischung nicht sinnvoll. In den Spalten der mit Chloramphenicol bzw. Tetracyclin und Ampicillin gefütterten Raupen waren keine Banden sichtbar. Somit waren nach der Fütterung keine oder nur noch sehr wenige *Enterococcus sp.* in ihrer natürlichen Darmflora vorhanden. Wie im Deutschen Ärzteblatt beschrieben, wirken Chloramphenicol und Tetracyclin nur in Kombination mit anderen Antibiotika erfolgreich gegen Enterokokken (Rüden et al., 1998). Demnach eigneten sich diese Antibiotika in Mischung mit Ampicillin am besten für die Weiterführung der Experimente.

## Diskussion

### 4.4 Transformation von *Enterococcus mundtii*

Es sollte ein GFP-Gen in *E. mundtii* transformiert werden, sodass dieses ausreichend exprimiert wird und die Bakterien fluoreszieren. Aus verschiedenen Transformationsmethoden sollte die bestmögliche Variante zur Transformation von *E. mundtii* herausgefunden werden.

Die Methoden der Transformation mit hitzeinaktiviertem Pferdeserum und Hitzeschock eigneten sich nicht.

Auch die Co-Inkubation bei verschiedenen Temperaturen brachte kein positives Ergebnis. Da die nicht transformierte Kontrolle auf dem Selektivmedium mit Spectinomycin gewachsen war (siehe 3.4), waren die Kolonien der mit pBSU100- und pBSU101-transformierten Bakterien wahrscheinlich keine Transformanten. Vermutlich lag eine natürliche Spectinomycinresistenz von *E. mundtii* vor, die während des Selektions-experiments nicht nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zu flüssigem Medium stellt festes THB-Agar-Medium eine bessere Wachstumsgrundlage für *E. mundtii* dar. Aufgrund der geeigneteren Wachstumsbedingungen konnten trotz enthaltenen Spectinomycins Bakterien wegen ihrer geringen Spectinomycinresistenz auf der Agarplatte wachsen. Bei schlechteren Bedingungen im Flüssigmedium reichte die Spectinomycinresistenz für ein normales Wachstum nicht aus. Somit konnte auf den Agarplatten nicht zwischen Transformanten und Wildtyp unterschieden werden. pCM18 konnte bis jetzt nur erfolgreich in *Streptococcus gordonii* DL1 transformiert werden (Hansen et al., 2001). Die Transformation von *E. mundtii* mit pCM18 funktionierte nicht. Ein Grund dafür kann der Replikationsursprung *oriP15A* sein, welcher aus dem gram-negativen Bakterien *E. coli* isoliert wurde und eine geringe Kopienzahl des Gens von 20-30 aufweist (Lutz et al., 1997). *E. mundtii* ist ein gram-positives Bakterium. Möglicherweise eignet sich der Replikationsursprung *oriP15A* deshalb nicht für dieses Bakterium.

Allein durch die Elektroporationsmethode, nach B.D. Shepard, konnten Transformanten gewonnen werden (Shepard et al., 1995). Für die Plasmide pALSM01 und pALSM02 eignete sich diese Methode am besten. Um sicher zu gehen, dass die auf dem Selektivmedium gewachsenen Bakterienkolonien das jeweils eintransformierte Plasmid enthielten, wurde zur Kontrolle eine PCR durchgeführt.

## Diskussion

### 4.5 Nachweis von Plasmiden in den Transformanten

#### 4.5.1 DNS-Extraktion mit anschließender PCR und Gelelektrophorese

Getestet wurden alle potentiellen Transformanten, welche auf den Selektivmedien wuchsen.

Das durch die Gelelektrophorese entstandene Gelbild (Abb. 9) zeigt zwei Banden in den Spalten Zwei und Drei. Das GFP-Gen hat eine Größe von 772 bp (addgene). Durch die in der PCR eingesetzten Primer EECT und EGFP konnte das GFP-Gen amplifiziert und mit Hilfe der Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Die im Gelbild sichtbaren Banden mit der ungefähren Größe von 750 bp können somit als GFP-Gen identifiziert werden. Es wurde deutlich, dass nur in die erste und zweite getestete Transformante die Plasmid-DNS von pALSM02 erfolgreich transformiert werden konnte. Die Banden der Positivkontrolle mit pALSM02 in der Spalte Zehn hatten eine für das Plasmid typische Größe von ca. 10000 bp und 6000 bp. Weiterhin ist zu erkennen, dass in Spalten Acht und Neun keine Banden der Größe von ca. 750 bp vorhanden waren. Plasmid pALSM01 in Spalte Neun konnte diese Bande nicht aufweisen, da es kein GFP-Gen codiert. pALSM02 codiert jedoch das GFP-Gen und somit hätte in Spalte Zehn eine Bande dieser Größe vorhanden sein müssen (Lemme et al., 2011). Es ist anzunehmen, dass sich die verwendeten Primer nicht optimal für diesen Nachweis eignen, da auch die Banden in Spalten Drei und Vier nur sehr schwach zu sehen sind. Um sicher zu gehen, dass pALSM02 in den transformierten *E. mundtii* enthalten war, wurde die PCR mit den spezifischeren GFPf/r-Primern wiederholt (Abb. 10). Es ist eindeutig zu erkennen, dass in den Positivkontrollen mit pALSM02 eine Amplifizierung stattfand und in denen mit pALSM01 keine. In den Spalten der Transformanten-DNS konnte das GFP-Gen anhand der spezifischen Banden nachgewiesen werden. Es konnte also eindeutig das Vorhandensein des GFP-Gens in pALSM02 und den mit pALSM02 transformierten *E. mundtii* bewiesen werden. Die in Spalte Neun vorhandene Bande ist auf eine Kontamination zurückzuführen. Grund dafür ist, dass sich in diesem Ansatz keine Proben-DNS befand und in Spalte Zehn, mit derselben Proben-DNS, keine Bande sichtbar war.

Die Elektroporation ist somit die geeignetste Methode, um *E. mundtii* zu transformieren. Des Weiteren konnten nur die Plasmide pALSM01 und pALSM02 von den Bakterien



## Diskussion

aufgenommen werden. Alle weiteren getesteten Plasmide führten nicht zu Transformanten und eignen sich somit nicht für die Transformation von *E. mundtii*.

### 4.5.2 Testung auf Plasmid bzw. in das Bakterienchromosom integrierte Plasmid-DNS bei Kultivierung mit und ohne Antibiotika

Es wurde getestet, ob die Plasmid-DNS von pALSM02 in das Bakterienchromosom integriert wurde oder weiterhin als Plasmid vorlag. Zudem sollte herausgefunden werden, ob die in antibiotikafreiem Medium kultivierten Transformanten das pALSM02-Plasmid behalten oder verlieren. Überprüft wurde dies mittels Minipräparation und DNS-Extraktion. Neben den transformierten *E. mundtii* wurden mit pALSM02 transformierte *E. coli* getestet.

Im Gelbild der Minipräparation (Abb. 11) wiesen allein die mit und ohne Antibiotika kultivierten *E. coli*-Transformanten die für das Plasmid spezifischen Banden auf. Die *E. mundtii*-Transformanten beinhalteten keine Plasmide. Die Bande in der Spalte Zwölf ist auf die natürlicher Weise in *E. coli* vorhandenen Plasmid-DNS zurückzuführen. Das Gelbild der Minipräparation nach dem fünften Kultivierungstag lieferte das gleiche Ergebnis (Abb. 12). Es lässt sich also sagen, dass in diesem Zeitraum das Plasmid, auch ohne Anwesenheit von Antibiotika, in *E. coli* nicht verlorenging. In *E. mundtii* hingegen war seit dem ersten Tag kein Plasmid nachzuweisen. Nach sieben Tagen Kultivierung wiesen alle Bakterienstämme, welche ohne Antibiotika kultiviert wurden, eine Bande auf der gleichen Höhe auf (Abb. 13). Diese ist jedoch nicht die spezifische Bande für pALSM02. Da eine solche Bande zuvor jeweils immer in der Spalte der nichttransformierten *E. coli* zu sehen war, ist anzunehmen, dass eine Kontamination der antibiotikafreien Ansätze mit *E. coli* vorlag. Die in antibiotikahaltigem Medium kultivierten, mit pALSM02 transformierten *E. coli* wiesen erneut eine Bande auf. Diese ist jedoch verschwommen und konnte nicht sicher als pALSM02-typische Bande identifiziert werden. Die Proben der mit Antibiotika kultivierten *E. mundtii* zeigten erneut keine Banden. Mit Hilfe dieser Ergebnisse kann allerdings noch nicht gesagt werden, ob die in den *E. mundtii*-Transformanten enthaltenen Plasmid-DNS verloren ging oder in das Bakterienchromosom integriert wurde. Fest steht, dass *E. coli*-Transformanten innerhalb der ersten fünf Tage Kultivierung das Plasmid pALSM02 nicht verlieren, egal ob mit oder ohne Antibiotika. Durch die Kontamination und die

## Diskussion

verschwommene Bande am siebten Tag ließ sich nicht sagen, ob das Plasmid auch nach diesem Zeitraum noch in den Transformanten enthalten war.

Für genauere Aussagen wurden DNS-Extraktion, PCR und Gelelektrophorese durchgeführt. Im Gelbild der DNS-Proben des ersten und fünften Tages der Kultivierung war bei allen Proben eine, dem GFP-Gen entsprechende Bande, zu sehen. Demnach war in allen Transformanten das Plasmid pALSM02, welches das GFP-Gen enthält, erfolgreich transformiert und wurde bis zum fünften Tag der Kultivierung nicht abgestoßen. Jedoch sind diese Ergebnisse nicht relevant. Interessant ist nur das Ergebnis des letzten Versuchstags. Das Gelbild mit den DNS-Proben am siebten Tag der Kultivierung (Abb. 14) zeigt, dass bei der DNS der transformierten *E. coli* keine Amplifizierung stattfand, wohingegen die Proben-DNS der in antibiotikahaltigem Medium kultivierten *E. mundtii*-Transformanten eine für das GFP-Gen spezifische Bande aufwies. Die DNS der ersten Transformante, die in antibiotikafreiem Medium kultiviert wurde, wies im Gegensatz zur zweiten Transformante kein amplifiziertes GFP-Gen auf.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Minipräparation und der PCR-Analyse der DNS wurde deutlich, dass in mit pALSM02 transformierte *E. coli* das Plasmid bis zum fünften Kultivierungstag im Bakterium vorlag. Am siebten Tag konnten sie, bei antibiotikahaltiger und -freier Kultivierung, nicht mehr sicher nachgewiesen werden. In *E. coli* fand demnach eine Abstoßung des Plasmids nach dem fünften Tag statt. Weil in den transformierten *E. mundtii* durch die Minipräparation kein Plasmid nachgewiesen wurde, jedoch mit Hilfe der DNS-Extraktion und PCR eine Amplifizierung des GFP-Gens erfolgte, ist es möglich, dass das Plasmid pALSM02 in das Bakterienchromosom integriert wurde. Gegenüber Lemme et al. ist dies jedoch ein unerwartetes Ergebnis. Dort wurde nicht beschrieben, dass pALSM02 in das Bakterienchromosom von *Streptococcus mutans* integriert werden konnte (Lemme et al., 2011). Auch der Vektor pAT18, aus dem pALSM02 generiert wurde, wird nicht als integrativ beschrieben (Trieu-Cuot et al., 1991). Eine weitere Möglichkeit ist, dass pALSM02 mit Minipräparation und Gelelektrophorese nicht nachgewiesen werden konnte, weil es ein low-copy Plasmid ist (Lemme et al., 2011). Wenn nicht genügend Plasmid-DNS während der Minipräparation isoliert wurde, konnte diese auch nicht mit der Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Demnach kann nicht sicher gesagt werden, ob die

## Diskussion

Plasmid-DNS ins Bakterienchromosom integriert wird oder das Plasmid trotz antibiotikafreier Kultivierung nicht verloren geht.

Lediglich in dem antibiotikafreien Ansatz der ersten Transformante konnte das GFP-Gen nicht mehr nachgewiesen werden. Vermutlich ging in diesem Ansatz das GFP-Gen aus dem Bakterienchromosom verloren. Da es jedoch im Ansatz der ohne Antibiotika kultivierten zweiten Transformante nachgewiesen werden konnte und nicht verloren ging, wurde diese für weitere Experimente verwendet.

### 4.5.3 Fluoreszenzmessung der Transformanten

Das in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckte GFP führte zu einer Revolution der Analysemöglichkeiten für die molekulare und physikalische Organisation in Lebewesen. Es wurde möglich, Fluoreszenzmarker in nahezu jede biologische Struktur zu integrieren. Der Beobachtung und Visualisierung von Genen, Proteinen, Membranen und andern Organellen in lebenden Zellen stand nun mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung nichts mehr im Wege. Weiterhin bestand die Möglichkeit mit fluoreszenzmarkierten Zellen den Aufbau und die Organisation von Geweben zu analysieren (Sullivan et al., 1999). Diese Erkenntnisse wurde genutzt, um *E. mundtii* markieren, innerhalb des Insektendarms beobachten und die Vorgänge im Darm sehen und verstehen zu können.

Zunächst wurden die mit pALSM02 transformierten Bakterienstämme, mit dem Lumineszenz-Messgerät, auf ihre Fluoreszenz untersucht. Anhand der Differenzen der Fluoreszenzintensitäten der Transformanten zu den nicht transformierten Bakterien (Tab. 9g) war zu erkennen, dass die meisten Werte kleiner als Eins waren und nur wenige einen Wert von Eins annahmen oder minimal überschritten. Um einen detektierbaren bzw. sichtbaren Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zu bekommen, hätten die Differenzen größere Werte als Eins annehmen müssen. Da dies jedoch nicht der Fall war wird deutlich, dass die mit dem GFP-Gen transformierten Bakterien nicht im stärkerem Maße fluoreszierten, als ihre nicht transformierten Formen. Anhand ihrer Fluoreszenz waren sie demnach nicht zu unterscheiden. Eine mögliche Ursache dafür war, dass pALSM02 ein „low-copy“-Plasmid ist und zudem, wie beschrieben, nur ca. 30 bis 50% der transformierten Zellen GFP exprimieren (Lemme et al., 2011). Möglich ist auch, dass nur eine Kopie des Plasmids in das Bakterienchromosom integriert wurde und dieses, in Bezug

## Diskussion

auf die Gesamtgröße des Chromosoms, nicht genügend repliziert wird. Bei zu geringer Replikation wird nicht genügend GFP produziert, um eine detektierbare Menge an Fluoreszenz zu erhalten.

Auch auf den mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bildern war keine starke Fluoreszenz zu erkennen. Vergleicht man die im erythromycinhaltigen Medium und antibiotikafreien Medium kultivierte *E. coli*-Transformanten, fluoreszierten die in antibiotikahaltigen Medium kultivierten etwas mehr als die anderen (Abb. 9h). Jedoch ist zwischen transformierten (Abb. 9h) und nicht transformierten *E. coli* (Abb. 15) kein optischer Unterschied in der Fluoreszenzintensität zu vermerken. Deutlich wird, dass mit GFP-transformierte *E. coli* nicht mehr fluoreszieren als ihr nicht transformierter Wildtyp. Auf den Bildern der ersten und zweiten *E. mundtii*-Transformanten sind im Vergleich zur Gesamtzahl der sichtbaren Bakterien nur extrem wenige fluoreszierende Bakterien zu erkennen (Abb. 9i, Abb. 9j). Dabei macht es keinen Unterschied ob die Bakterien in erythromycinhaltigem oder -freiem Medium kultiviert wurden. Bei den Aufnahmen des nicht transformierten Wildtyps von *E. mundtii* (Abb. 16) waren jedoch gar keine fluoreszierenden Bakterien zu sehen. Trotzdem wurde deutlich, dass auch zwischen transformierten und nicht transformierten *E. mundtii* kaum ein Unterschied der Fluoreszenzintensitäten vorhanden war. Eine eindeutige Unterscheidung anhand der Fluoreszenz zwischen mit pALSM02 transformierten und natürlichen *E. coli* oder *E. mundtii* ist somit nicht möglich. Folglich ist es nicht realisierbar die mit pALSM02 transformierten *E. mundtii*, nach der Fütterung an *S. littoralis* Larven, im Darm zu sehen und die Integration in die Darmflora analysieren zu können. Ein Nachweis des Vorhandenseins der Transformanten kann somit nur über DNS-Extraktion mit anschließender PCR und Gelelektrophorese erfolgen. Die Beziehung zwischen Insektendarm und Darmmikrobiota kann ohne Fluoreszenz jedoch nicht untersucht werden. Es wäre interessant zu sehen, was mit den Darmbakterien beim Darmauf- und -abbau während der Verpuppung passiert und wo sie sich in den Puppen befinden. Möglich ist dies nur mit ausreichend starker Fluoreszenz.

## Diskussion

Um stärker fluoreszierende *E. mundtii*-Transformanten zu erhalten, müssen weitere Transformationsexperimente mit anderen GFP-Gen-codierenden Plasmiden vorgenommen werden. Dies war innerhalb des Bachelorpraktikums zeitlich nicht realisierbar.

### 4.6 Nachweis der Transformanten in *Spodoptera littoralis*

#### 4.6.1 *Spodoptera littoralis* Larven

Da die mit pALSM02 transformierten *E. mundtii* nicht mit Hilfe der Fluoreszenz optisch nachgewiesen werden konnten, wurde die Methode der DNS-Extraktion mit anschließender PCR und Gelelektrophorese genutzt. Das dabei entstandene Gelbild (Abb. 17) zeigte in den Spalten Zwei bis Sechs jeweils eine Bande, die mit einer Größe von ca. 750 bp als das amplifizierte GFP-Gen der *E. mundtii*-Transformanten zu identifizieren waren. Das in den Spalten Zwölf, Dreizehn und Vierzehn schwache Banden derselben Größe zu sehen waren, ist auf eine Kontamination zurückzuführen. Wie im Gelbild des Transformantentests mit dem Primern GFPf/r (Abb. 10) zu sehen war, würde normalerweise keine Amplifizierung der nicht transformierten *E. mundtii*-DNS mit diesen Primern erfolgen. Demnach waren in den Larven, die wie in 2.8 beschrieben gefüttert wurden, kurz vor der Verpuppung *E. mundtii*-Transformanten im Darm vorhanden. Lediglich in dem Insektenansatz KBE konnten keine transformierten *E. mundtii* im Darm nachgewiesen werden. Wahrscheinlich konnten sich die transformierten Bakterien aufgrund der natürlich im Larvendarm vorkommenden, und nicht zuvor durch Antibiotika reduzierten, Bakterien nicht durchsetzen und somit sich nicht in der natürlichen Darmflora anreichern.

Da mit DNS-Extraktion und PCR nicht gesagt werden kann, ob die nachgewiesenen GFP-Gene von toten oder lebendigen Transformanten stammt, wurden mit Hilfe des Ausplattierens nur noch die lebenden Transformanten nachgewiesen. Es konnte in allen Ansätzen eine hohe Konzentration an erythromycinresistenten Enterokokken im Vergleich zur Gesamtzahl der im Darm vorhandenen Bakterien nachgewiesen werden. Auch die Zahl aller erythromycinresistenten Bakterien war meist annähernd so groß wie die der resistenten Enterokokken. Dagegen besaß die Kontrolle nur sehr wenige undifferenzierte erythromycinresistente Bakterien und keine erythromycinresistenten Enterokokken im Vergleich zur Gesamtzahl (Abb. 19). Es wird deutlich, dass sich die resistente

## Diskussion

Enterokokken durch das Zufüttern der Transformanten im Larvendarm angereichert haben und als lebende Bakterien vorlagen. Auch im Vergleich zwischen der Anzahl erythromycinresistenter Enterokokken und nicht resistenten Enterokokken ist eine deutlich höhere Bakterienkonzentration der resistenten Variante in der Darmsuspension zu erkennen. In der Kontrolle ist die höchste Konzentration an nichtresistenten Enterokokken festgestellt worden. Auch hier wird erkennbar, dass sich die erythromycinresistenten Enterokokken nur in den Larvendärmen anreicherten, welche mit *E. mundtii*-Transformanten gefüttert wurden.

Die Ergebnisse der DNS-Extraktionen, PCR und Gelelektrophorese decken sich mit denen der Ausplattierung. Bei den erythromycinresistenten Enterokokken handelte es sich demnach um die mit pALSM02 transformierten *E. mundtii*. Jedoch konnte im Ansatz KBE per PCR keine Transformanten-DNS nachgewiesen werden, bei der Ausplattierung wurde jedoch eine nicht zählbare Menge erythromycinresistenter Enterokokken festgestellt. Dadurch kann nicht sicher gesagt werden, ob es sich bei den erythromycinresistenten Enterokokken auf der Agarplatte um die zu gefütterten *E. mundtii*-Transformanten handelte. Der Ausplattierung nach ist KBE der vielversprechendste Ansatz. Die Methode, die Larven erst nach fünf Tagen mit Antibiotika und Transformanten zu füttert, scheint sich demnach am besten für die Integration der *E. mundtii*-Transformanten in den Darm zu eignen. Um diese Vermutung zu bestätigen und eine sichere Aussage über das Vorhandensein der Transformanten zu erhalten, hätten mehr Larven getestet werden müssen, was aber aufgrund der großen Sterberate der Insekten und Zeitknappheit innerhalb des Bachelorpraktikums nicht möglich war.

### 4.6.2 *Spodoptera littoralis* Puppen

Da im Gelbild des Transformantennachweises in den Puppen (Abb. 17) der Ansätze Bp und KBp keine Banden zu sehen waren, wurde deutlich, dass die zuvor in den Larven nachgewiesenen Transformanten nach der Verpuppung mittels PCR nicht mehr aufzuweisen sind. Ansatz KBep wies, wie auch in 4.6.1.1, keine Bande auf. Lediglich in BEp konnte Transformanten-DNS festgestellt werden, da sich hier eine Bande mit der dem GFP-Gen entsprechenden Größe befand. Eine Möglichkeit für die nicht dokumentierbaren *E. mundtii*-Transformanten in den Puppen ist die katastrophale Metamorphose. Diese

## Diskussion

besteht aus den Vorgängen Histolyse und Histogenese. Dabei werden larvale Organe ab- und imaginale aufgebaut. Es erfolgt eine vollständige Auflösung der Larvenorgane und eine anschließende Neubildung von organischem Gewebe. Neben dem Darm betrifft die Umwandlung der inneren Metamorphose auch Tracheen-, Nervensystem und die Sinnesorgane (Dettner et al., 2013). Durch diese Vorgänge werden auch die meisten im Darm lebenden Bakterien stark gehemmt oder abgetötet. Vermutlich überleben die Bakterien die Verpuppung nur in einer sehr geringen Konzentration oder als Bakterienspore und erholen und vermehren sich erst wenn die adulten Insekten wieder Nahrung aufnehmen und so eine stabilere Umgebung geschaffen wird. Wenn die Konzentration der Transformanten im Larvendarm zu gering war, konnten sie möglicherweise in den Puppen mittels PCR nicht mehr nachgewiesen werden. War die Konzentration hoch genug, hätte die Methode einen Nachweis erbringen können. Dies könnte dafür verantwortlich sein, dass nur in dem Ansatz BEp das GFP-Gen und somit das Vorhandensein der *E. mundtii*-Transformanten belegt werden konnte. Würde eine Transformantensuspension mit einer wesentlich höheren Konzentration an Bakterien zugefüttert werden, wird möglicherweise die Konzentration der Transformanten im Larvendarm erheblich gesteigert. Somit kann auch die Konzentration in den Puppen erhöht werden, sodass Transformanten per PCR nachgewiesen werden können. Wiederum kann jedoch nicht sicher gesagt werden, ob das nachgewiesene GFP-Gen in BEp von lebenden Transformanten stammt. Für den In-vivo-Nachweis wurde die Ausplattierung durchgeführt.

Hierbei konnten im Vergleich zum Kontrollansatz der Larven nur wesentlich weniger CFU/ $\mu$ l Suspension dokumentiert werden (Abb. 20). Am Vergleich von Bp zur Kontrolle ist zu sehen, dass die Gesamtzahl der Darmbakterien der Larven um zwei Drittel verloren ging. BEp und KBep konnten im Schnitt nur noch ca. ein Achtel, und KBp sogar nur noch ein Sechsendneunzigstel der Gesamtzahl aufweisen. Das zeigt, dass die Bakterienzahl im Darm während der Verpuppung erheblich reduziert wird, aber die Bakterien den Prozess überleben.

Die Gesamtzahl der Enterokokken im Larvendarm war um ein Vielfaches größer als die in den Puppen. Bei Betrachtung der Zahl aller Enterokokken und aller erythromycinresistenter Enterokokken in den Puppen war nur in den Ansätzen BEp und KBep eine vergleichbare Konzentration der Bakterien vorhanden (Abb. 20). In der Probe BEp betrug der Anteil der

## Diskussion

erythromycinresistenten Enterokokken knapp ein Zehntel der Gesamtzahl an Enterokokken. In KBep war ein Anteil von gut einem Drittel zu verbuchen. Trotz dessen, dass der prozentuale Anteil der erythromycinresistenten Enterokokken an der Gesamtzahl in BEp kleiner war als in KBep, konnten die mit pALSM02 transformierten *E. mundtii* auch per PCR nachgewiesen werden. In der Probe KBep war dies nicht möglich. Dieses Ergebnis lässt nicht darauf schließen, ob es sich bei den erythromycinresistenten Enterokokken in KBep um die zu gefütterten Transformanten handelte. Auch hierbei ist es nötig mehr Proben über einen längeren Zeitraum zu testen, um gesicherte Aussagen treffen zu können. Es lässt sich jedoch sagen, dass im Ansatz BEp eindeutig lebende *E. mundtii*-Transformanten nachgewiesen werden konnten.

### 4.6.3 *Spodoptera littoralis* Falter

Getestet wurde nur ein Falter aus dem Insektenansatz BE, da aus anderen Ansätzen keine Falter hervor gingen. Wie im Gelbild (Abb. 18) zu sehen ist, wurde eine sehr dicke Bande mit der des GFP-Gens entsprechenden Größe sichtbar. Positiv- und Negativkontrolle lieferten die erwarteten Ergebnisse.

Die auf dem Gelbild (Abb. 14) mitgeführte Kontroll-DNS einer ohne Antibiotika und Transformanten gefütterten *S. littoralis* Larve zeigte, dass normalerweise keine GFP-Genenthaltende Bakterien in der natürlichen Darmflora der Insekten vorhanden sind, da keine Bande mit der Größe des GFP-Gens zu sehen war. Die in den Larven, Puppen und Faltern erhaltenen Amplifizierungen waren demnach eindeutig auf die mit pALSM02 transformierte *E. mundtii* zurückzuführen.

Da aus den anderen Insektenansätzen keine weiteren Falter schlüpften, konnte nicht festgestellt werden, ob auch in ihren Därmen *E. mundtii*-Transformanten hätten nachgewiesen werden können. Weiterhin konnten keine Ausplattierungen vorgenommen werden um festzustellen, ob die nachgewiesenen Transformanten lebendig im Falter vorlagen. Um darüber genauere und gesichere Aussagen treffen zu können, hätte mehr Zeit zur Verfügung stehen müssen, um das Experiment in einem größeren Rahmen zu wiederholen. Letztendlich konnte nachgewiesen werden, dass, wenn *S. littoralis* Larven wie in 2.2.8 beschrieben, zuerst mit dem entsprechenden Antibiotikagemisch und anschließend mit denen in erythromycinhaltigem Medium kultivierten *E. mundtii*-Transformanten gefüttert



## Diskussion

werden, sich die Bakterien in die natürliche Darmflora integrieren und über die Entwicklungsstadien der Insekten fortbestehen und weitergegeben werden. Durch die bakterienkritischen Verhältnisse im Puppeninneren wird die Zahl der Bakterien zwar stark reduziert, jedoch reicht diese aus, um sich später im Darm der Falter wieder zu erholen und anzusiedeln. Die im Larvenstadium zugefütterten Transformanten könnten nun mittels Fluoreszenz im Puppenstadium und Falterdarm beobachtet werden. Wenn es gelingt ausreichend fluoreszierende Transformanten in die Darmflora zu integrieren, kann die Verteilung der Bakterien im gesamten Darm analysiert und so auf die ablaufenden Verdauungsvorgänge geschlossen werden. Weiterhin kann beobachtet werden, was im Darm mit den Bakterien während der Verpuppung passiert bzw. wo sie sich befinden, wenn dieser vollständig aufgelöst ist. Außerdem kann analysiert werden, wie die Darmbakterien während einer Veränderung der Umweltbedingungen reagieren und ob diese Reaktionen Auswirkungen auf das Leben und die Entwicklung der Insekten haben. Das Ergebnis dieser Arbeit stellt also einen wichtigen und grundlegenden Schritt für die weitere Forschung an der Darmmikrobiota der *S. littoralis* dar.

## Zusammenfassung

### 5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, *Enterococcus mundtii* ein GFP-codierendes Plasmid einzutransformieren, sodass diese eine deutliche Fluoreszenz ausweisen. Sie sollten *Spodoptera littoralis* zugefüttert werden um sie mittels ihrer Fluoreszenz über die Entwicklungsstadien der Insekten hinweg beobachten zu können und zu testen, ob sie innerhalb dieser Stadien weitergegeben werden oder aus dem Organismus verlorengehen. Dazu musste ein GFP-codierendes Plasmid gefunden werden, welches sich für die Transformation in *E. mundtii* eignet. Des Weiteren sollte eine möglichst erfolgsversprechende Transformationsmethode gefunden werden. Getestet wurden einige verschiedenen Plasmide sowie mehrere Methoden zur Transformation. Es stellte sich heraus, dass allein die Plasmide pALSM01 und pALSM02 durch Elektroporation in *E. mundtii* transformiert werden konnten. Alle anderen verwendeten Plasmide sowie verwendete Transformationsmethoden erwiesen sich als nicht geeignet. Leider produzierten die erhaltenen Transformanten mit dem GFP-codierenden Plasmid pALSM02 nicht genug GFP um mittels Lumineszenz-Messgerät und Mikroskop Fluoreszenz nachzuweisen. Grund dafür ist, dass pALSM02 ein low-copy Plasmid ist und das GFP-Gen nicht ausreichend transkribiert wird. Trotzdem wurden sie für weitere Experimente in *S. littoralis* verwendet. Die Transformanten sollten in den Larvendarm der *S. littoralis* durch Zufütterung eingebracht werden, sodass sie sich dort ansiedeln. Am Ende der Versuche konnte festgestellt werden, dass die mit pALSM02 transformierten *E. mundtii* innerhalb des Entwicklungszyklus bis zum Erwachsenenstadium weitergegeben werden, wenn die Larven zuvor mit einem Ampicillin-Tetracyclin-Gemisch sowie in Erythromycin kultivierten *E. mundtii*-Transformanten gefüttert wurden. Die Verpuppung stellte das kritischste Stadium dar. Hierbei konnten in allen, außer zuvor genanntem, Ansätzen die Transformanten nicht mehr per PCR nachgewiesen werden. Vermutlich aufgrund zu geringer Transformantenkonzentration in den Insektendärmen. Um die erlangten Ergebnisse zu bestätigen und die eingebrachten Transformanten auch per Fluoreszenz beobachten zu können, müssen weitere Experimente vorgenommen werden. Dies war innerhalb des kurzen Zeitraumes des Bachelorpraktikums nicht möglich.

### 6. Literaturverzeichnis

*addgene*. Abgerufen am 01. Juli 2013 von <http://www.addgene.org/11150/>

Aymanny, S., Maurerer, S., van Zanderbergen, G., Wolz, C., & Spellerberg, B. (2011). High-Level Fluorescence Labeling of Gram-Positive Pathogens. *PLoS ONE*.

Balganesh, T., & Sanford Lacks, A. (1984). Plasmid vector for cloning in *Streptococcus pneumoniae* and strategies for enrichment for recombinant plasmids. *Gene*, S. 29, 221-230.

*biologie.deacademic*. Abgerufen am 03. Juli 2013 von <http://biologie.deacademic.com/1780/Holometabolie#sel=3:104,3:109>

*chemie*. Abgerufen am 10. Juli 2013 von <http://www.chemie.de/lexikon/Cholinesterase.html>

Dettner, K., & Peters, W. (2013). *Lehrbuch Der Entomologie, Teil 1*. München: Spektrum Akademischer Verlag.

*enzyklo*. Abgerufen am 03. Juli 2013 von <http://www.enzyklo.de/Begriff/phagozytieren>

epicenter. *epibio*. Abgerufen am 29. Juli 2013 von <http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/masterpure-complete-dna-and-rna-purification-kit-bulk-reagents.pdf?sfvrsn=4>

Friesenegger, A., Fiedler, S., Devriese, L. A., & Wirth, R. (1991). Genetic transformation of various species of *Enterococcus* by elektroporation. *FEMS Microbiology Letters*, 79, S. 323-328.

Hahn, H., Kaufmann, S., Schulz, T., & Suerbaum, S. (2009). *Medizinische Mikrobiologie und Infektionsbiologie. 6. Auflage*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

Hansen, M., Palmer, R., Udsen, C., White, D., & Molin, S. (2001). Assessment of GFP fluorescence in cells of *Streptococcus gordonii* under conditions of low pH and low oxygen concentration. *Microbiology*, S. 147, 1383–1391.

## Literaturverzeichnis

- Lemme, A., Gröbe, L., Reck, M., Tomasch, J., & Wagner-Döbler, I. (2011). Subpopulation-Specific Transcriptome Analysis of Competence-Stimulating-Peptide-Induced *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, S. 1865, 1863–1877.
- Lutz, R., & Bujard, H. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, No. 6, S. 1203–1210.
- Rüden, H., Wendt, C., & Edmond, M. (1998). Vancomycin-resistente Enterokokken: Epidemiologie, Risikofaktoren und Prävention. *Deutsches Ärzteblatt*, 40.
- Shepard, B., & Gilmore, M. (1995). Electroporation and Efficient Transformation of *Enterococcus faecalis* Grown in High Concentrations of Glycine. *Methods in Molecular Biology*. Volume 47, S. 221-222.
- Sullivan, K. F., & Kay, S. A. (1999). *Green Fluorescent Proteins*. San Diego: Academic Press.
- Tang, X., Freitag, D., Vogel, H., Ping, L., Shao, Y., & al., e. (2012). Tang X, Freitag D, VoComplexity and Variability of Gut Commensal Microbiota in Polyphagous Lepidopteran Larvae. *PLoS ONE* 7(7).
- ThermoScientific. (kein Datum). *thermoscientificbio*. Abgerufen am 30. Juli 2013 von <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/k0502-product-information.pdf>
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Poyart-Salmeron, C., & Courvalin, P. (1991). Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a lacZa gene for conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to Gram-positive bacteria. *Gene*, 102, S. 99-104.
- Wilkinson, T. (1998). The elimination of intracellular microorganisms from insects: an analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 119, S. 871-881.

## Abbildungsverzeichnis

### 7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Verschiedene Zusammensetzungen der Darmmikrobiota in *S. littoralis* Larven in verschiedenen Larvenstadien bei künstlicher Ernährung. Bakterielle Zusammensetzung, detektiert durch Klonierungen und Sequenzierungen von Insekten die 2 Tage (n = 33), 6 Tage (n = 104), 10 Tage (n = 232), und 14 Tage (n = 490) alt sind, der Pfeil repräsentiert die Lebensdauer der *S. littoralis* Larven. Die Entwicklungsstadien, das Schlüpfen, Verpuppung und Larvenstadien sind durch Balken dargestellt. Der Einschub zeigt die relative Häufigkeit von Bakterien auf dem Epithel von 10 Tage alten Larven (n = 94). (Tang, Freitag, Vogel, Ping, Shao, & al., 2012) .....8
- Abbildung 2:** Genetische und physikalische Karte des Plasmidvektors pCM18. Nur relevante Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Abkürzungen: mcs) multiple cloning site; T<sub>1</sub>) Transkriptionsterminator aus dem *rmb* Operon von *E. coli*; T<sub>0</sub>) Transkriptionsterminator von Phage lambda; *gfpmut3\**) Gen codierendes *gfpmut3\** (*s2r*, *s65g*, *s72a*); *rbsii*) synthetische Ribosomenbindungsstelle; *cp25*) synthetischer konstitutiver *Lactococcus*-Promoter; *ori*) Replikationsursprung (Origin); *Erm<sup>r</sup>*) Erythromycinresistenzgen (Hansen, Palmer, Udsen, White, & Molin, 2001)..... 10
- Abbildung 3:** Wachstumskurve *Enterococcus mundtii* Stamm 1 bei Kultivierung mit verschiedenen Antibiotika .....25
- Abbildung 4:** Wachstumskurve *Enterococcus mundtii* Stamm 2 bei Kultivierung mit verschiedenen Antibiotika .....26
- Abbildung 5:** Wachstumskurve *Enterococcus mundtii* Stamm KD212 bei Kultivierung mit verschiedenen Antibiotika .....26
- Abbildung 6:** Wachstumskurve *Enterococcus mundtii* Stamm KD251 bei Kultivierung mit verschiedenen Antibiotika .....27
- Abbildung 7:** Wachstumskurve der *Spodoptera littoralis* Larven bei Zufütterung verschiedener Antibiotikagemische.....28
- Abbildung 8:** Gbild der PCR der *Spodoptera littoralis* Larven-DNS. 1) DNS-Massenstandart; 2,3) DNS der ohne Antibiotika gefütterte Larven; 4,5) DNS der mit Ampicillin und Erythromycin gefütterten Larven; 6,7) DNS der mit Ampicillin und

## Abbildungsverzeichnis

- Chloramphenicol gefütterten Larven; 8,9) DNS der mit Ampicillin und Tetracyclin gefütterten Larven; 10) Negativkontrolle mit Aqua dest.; 11) Positivkontrolle mit 16s ribosomaler DNS .....29
- Abbildung 9:** Transformantentest mit Primern EECT down HindIII und EECT up SphI. 1) DNS-Massenstandard; 2) erste Transformante mit pALSM02; 3) zweite Transformante mit pALSM02; 4) dritte Transformante mit pALSM02; 5) vierte Transformante mit pALSM02; 6) erste Transformante mit pALSM01; 7) zweite Transformante mit pALSM01; 8) reiner Plasmid pALSM01 als Positivkontrolle; 9) reiner Plasmid pALSM02 als Positivkontrolle; 10) Negativkontrolle mit Aqua dest. .30
- Abbildung 10:** Transformantentest mit Primer GFPf/r. 1) DNS-Massenstandard; 2) erste Transformante mit pALSM02; 3) zweite Transformante mit pALSM02; 4) *E. mundtii*-DNS; 5) mit pALSM01 transformierte *E. coli*; 6) mit pALSM02 transformierte *E. coli*; 7) reiner Plasmid pALSM01 als Positivkontrolle; 8) reiner Plasmid pALSM02 als Positivkontrolle; 9) kontaminierte Spalte; 10) Negativkontrolle mit DNS die nicht von GFPf/r amplifiziert wird; 11-13) Negativkontrolle mit Aqua dest .....31
- Abbildung 11:** Gelbild der Minipräparation am ersten Tag der Kultivierung der Transformanten mit und ohne Antibiotika. 1,7) DNS-Massenstandard; 3) P02-E; 4) P02; 5) T1-E; 6) T1; 9) T2-E; 10) T2; 11) KD251 kultiviert in antibiotikafreiem Medium; 12) *E. coli* kultiviert in antibiotikafreiem Medium. P = *E. coli* transformiert mit pALSM02; E = mit Erythromycin kultiviert; T = Transformante (*E. mundtii* transformiert mit pALSM02) .....32
- Abbildung 12:** Gelbild der Minipräparation am fünften Tag der Kultivierung. 1) DNS-Massenstandard; 2) P02-E; 3) P02; 4) T1-E; 5) T1; 6) T2-E; 7) T2; 8) KD251 kultiviert in antibiotikafreiem Medium; 9) *E. coli* kultiviert in antibiotikafreiem Medium. P = *E. coli* transformiert mit pALSM02; E = mit Erythromycin kultiviert; T = Transformante (*E. mundtii* transformiert mit pALSM02).....33
- Abbildung 13:** Gelbild der Minipräparation am siebten Tag der Kultivierung. 1) DNS-Massenstandard; 2) P02-E; 3) P02; 4) T1-E; 5) T1; 6) T2-E; 7) T2; 8) KD251 kultiviert in antibiotikafreiem Medium; 9) *E. coli* kultiviert in antibiotikafreiem Medium. P = *E. coli* transformiert mit pALSM02; E = mit Erythromycin kultiviert; T = Transformante (*E. mundtii* transformiert mit pALSM02).....34

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 14:** extrahierte DNS nach der PCR mit den Primern GFPf/r am siebten Tag. 1) DNS-Massenstandard; 2) P02-E; 3) P02; 4) T1-E; 5) T1; 6) T2-E; 7) Pipettierfehler; 8) T2; 9) pALSM02 als Positivkontrolle; 10) Negativkontrolle mit Aqua dest. P = *E. coli* transformiert mit pALSM02; E = mit Erythromycin kultiviert; T = Transformante (*E. mundtii* transformiert mit pALSM02) .....35
- Abbildung 15:** Mikroskopaufnahme von *E. coli*; A) 20000fache Vergrößerung; Aa) 20000fache Vergrößerung unter Einwirkung von Fluoreszenzstrahlung .....37
- Abbildung 16:** Mikroskopaufnahme von *E. mundtii*; B) 20000fache Vergrößerung; Ba) 20000fache Vergrößerung unter Einwirkung von Fluoreszenzstrahlung .....37
- Abbildung 17:** Gelbild der PCR nach der DNS-Extraktion aus *Spodoptera littoralis* Larven und Puppen. 1) DNS-Massenstandart; 2, 3) B; 4) BE; 5, 6) KB; 7) KBE; 8) Bp; 9) BEp; 10) KBp; 11) KBEP; 12) *E. mundtii* KD251; 13) *E. coli*, 14) *Lactobacillus lactis*, 15) pALSM02 als Positivkontrolle, 16) Negativkontrolle mit Aqua dest. B = Larven zuerst gefüttert mit Antibiotika, dann mit Transformanten; BE = Larven zuerst gefüttert mit Antibiotika, dann mit Transformanten+Erythromycin; KB = Larven zuerst gefüttert ohne Antibiotika, dann mit Transformanten; KBE = Larven zuerst gefüttert ohne Antibiotika, dann mit Transformanten+Erythromycin; p = Puppen aus zuvor genannten Ansätzen .....38
- Abbildung 18:** Gelbild der PCR der *Spodoptera littoralis*-Falter-DNS. 1) DNS-Massenstandart; 2) DNS aus Falterdarm, zuerst gefüttert mit Antibiotika, anschließend mit transformierten *E. mundtii* und 4 µl/ml Erythromycin; 3) Kontroll-DNS aus Larvendarm, nur mit künstlichem Futter gefüttert; 4) pALSM02 als Positivkontrolle; 5) Negativkontrolle mit Aqua dest.....39
- Abbildung 19:** Darstellung der Anzahl der Bakterien pro µl Larvendarmsuspension bei Kultivierung auf Enterokokken-Agar mit 4 µl/ml Erythromycin, LB-Agar mit 4 µl/ml Erythromycin, LB-Agar und Enterokokken-Agar. B = gefüttert 5 d + Antibiotika, dann mit Transformante – Antibiotika; BE = gefüttert 5 d + Antibiotika, dann mit Transformante + Antibiotika; KB = gefüttert 5 d – Antibiotika, dann mit Transformante – Antibiotika; KBE = gefüttert 5 d ohne Antibiotika, dann mit Transformante + Antibiotika .....40

## Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 20:** Darstellung der Anzahl der Bakterien pro  $\mu\text{l}$  Puppensuspension bei Kultivierung auf Enterokokken-Agar mit  $4 \mu\text{l/ml}$  Erythromycin, LB-Agar mit  $4 \mu\text{l/ml}$  Erythromycin, LB-Agar und Enterokokken-Agar. B = gefüttert 5 d + Antibiotika, dann mit Transformante – Antibiotika; BE = gefüttert 5 d + Antibiotika, dann mit Transformante + Antibiotika; KB = gefüttert 5 d – Antibiotika, dann mit Transformante – Antibiotika; KBE = gefüttert 5 d ohne Antibiotika, dann mit Transformante + Antibiotika; p = Puppen aus zuvor genannten Ansätzen .....42



## Tabellenverzeichnis

### 8. Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabelle 1:</b> für Transformationsexperimente verwendete Bakterienstämme .....   | 11 |
| <b>Tabelle 2:</b> Zusammensetzung und Hersteller der verwendeten Medien .....   | 11 |
| <b>Tabelle 3:</b> für Transformation verwendete Plasmide. Erm: Erythromycinresistenzgen (Lemme, Gröbe, Reck, Tomasch, & Wagner-Döbler, 2011); rbsii: synthetic ribosome-binding site; T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub> : transcriptional terminators from phage lambda and from the <i>rrnB</i> operon of <i>E. coli</i> . (Hansen, Palmer, Udsen, White, & Molin, 2001); EGFP: enhanced GFP (Aymanny, Mauerer, van Zanderbergen, Wolz, & Spellerberg, 2011)..... | 12 |
| <b>Tabelle 4:</b> Enzym für die PCR .....   | 12 |
| <b>Tabelle 5:</b> Bezeichnung der verwendeten Primer mit Nukleotidsequenz, Annealingtemperaturen und Hersteller .....   | 12 |
| <b>Tabelle 6:</b> Antibiotika mit verwendeten Konzentrationen und Herstellern .....   | 13 |
| <b>Tabelle 7:</b> verwendete Kits mit Herstellern .....   | 13 |
| <b>Tabelle 8:</b> verwendete Lösungen mit ihren Inhaltsstoffen, Konzentrationen und der Hersteller.....   | 14 |
| <b>Tabelle 9:</b> Zusammenstellung aller verwendeten Chemikalien, ihre Konzentrationen und Hersteller.....  | 14 |
| <b>Tabelle 10:</b> verwendete Geräte .....  | 15 |
| <b>Tabelle 11:</b> Zusammensetzung des Mastermix der PCR .....  | 20 |
| <b>Tabelle 12:</b> PCR-Programm für die Primer GFPf/r .....   | 21 |

## Anhang

### 9. Anhang

#### Antibiotikaselektion

**Tabelle 9a:** Antibiotikaselektion verschiedener *E. mundtii*-Stämme mit verschiedenen Antibiotika. ++) starkes Bakterienwachstum; +) Bakterienwachstum; -) kein Wachstum

| Antibiotika                  | Kultivierungszeit [h] | Stamm 1 | Stamm 2 | KD212 | KD251 |
|------------------------------|-----------------------|---------|---------|-------|-------|
| Streptomycin                 | 24                    | ++      | +       | +     | +     |
|                              | 48                    | ++      | +       | +     | +     |
| Gentamycin                   | 24                    | ++      | -       | -     | ++    |
|                              | 48                    | ++      | ++      | ++    | ++    |
| Tetracyclin                  | 24                    | -       | -       | -     | -     |
|                              | 48                    | -       | -       | -     | -     |
| Chloramphenicol              | 24                    | -       | -       | -     | -     |
|                              | 48                    | -       | -       | -     | -     |
| Rifampicin                   | 24                    | -       | -       | -     | +     |
|                              | 48                    | -       | ++      | -     | +     |
| Erythromycin                 | 24                    | -       | -       | -     | -     |
|                              | 48                    | -       | -       | -     | -     |
| Spectinomycin                | 24                    | -       | ++      | -     | -     |
|                              | 48                    | ++      | ++      | +     | ++    |
| Kanamycin                    | 24                    | ++      | ++      | ++    | ++    |
|                              | 48                    | ++      | ++      | ++    | ++    |
| Ampicillin                   | 24                    | -       | -       | -     | -     |
|                              | 48                    | -       | -       | -     | -     |
| Kontrolle (ohne Antibiotika) | 24                    | ++      | ++      | ++    | ++    |
|                              | 48                    | ++      | ++      | ++    | ++    |

#### Ergebnisse der OD<sub>600</sub>

**Tabelle 9b:** OD<sub>600</sub> von *E. mundtii* Stamm 1 kultiviert in verschiedenen Antibiotika

| Tag | Gentamycin | Rifampicin | Spectinomycin | Ampicillin | Kontrolle |
|-----|------------|------------|---------------|------------|-----------|
| 1   | -0,011     | 0,049875   | -0,01475      | -0,01175   | 1,115     |
| 2   | -0,001     | 0,066375   | 0,006375      | 0,023875   | 1,87875   |
| 3   | -0,00225   | 0,050375   | 0,000375      | 0,00025    | 0,5275    |
| 4   | -0,002125  | 0,06325    | -0,002375     | -0,002125  | 0,535     |
| 5   | -0,003625  | 0,0515     | -0,004        | -0,00325   | 0,42875   |

## Anhang

**Tabelle 9c:** OD<sub>600</sub> von *E. mundtii* Stamm 2 kultiviert in verschiedenen Antibiotika

| Tag | Gentamycin | Rifampicin | Spectinomycin | Ampicillin | Kontrolle |
|-----|------------|------------|---------------|------------|-----------|
| 1   | -0,014     | 0,047875   | -0,014        | 0,28775    | 0,63375   |
| 2   | -0,000125  | 0,064625   | 0,005125      | 0,045375   | 0,4225    |
| 3   | -0,000875  | 0,046125   | -0,00075      | 0,402125   | 2,71625   |
| 4   | -0,002125  | 0,0625     | 0,001125      | 0,331375   | 0,47875   |
| 5   | -0,002125  | 0,057875   | 0,022125      | 0,4045     | 0,44125   |

**Tabelle 9d:** OD<sub>600</sub> von *E. mundtii* Stamm KD212 kultiviert in verschiedenen Antibiotika

| Tag | Gentamycin | Rifampicin | Spectinomycin | Ampicillin | Kontrolle |
|-----|------------|------------|---------------|------------|-----------|
| 1   | -0,00525   | 0,054125   | -0,007125     | -0,00775   | 0,31875   |
| 2   | -0,002375  | 0,065625   | 0,007625      | 0,024625   | 0,44625   |
| 3   | -0,002125  | 0,05375    | -0,001875     | 0,00175    | 1,11875   |
| 4   | -0,002125  | 0,06       | -0,00225      | 0,000875   | 0,5325    |
| 5   | -0,001875  | 0,05975    | -0,0025       | 0,0025     | 0,41125   |

**Tabelle 9e:** OD<sub>600</sub> von *E. mundtii* Stamm KD251 kultiviert in verschiedenen Antibiotika

| Tag | Gentamycin | Rifampicin | Spectinomycin | Ampicillin | Kontrolle |
|-----|------------|------------|---------------|------------|-----------|
| 1   | -0,007875  | 0,0515     | -0,007375     | -0,006375  | 0,5075    |
| 2   | -0,00125   | 0,05825    | 0,0285        | 0,024375   | 0,6025    |
| 3   | -0,001375  | 0,049875   | 0,070375      | 0,001875   | 2,46625   |
| 4   | -0,000875  | 0,056      | 0,076125      | 0          | 0,51375   |
| 5   | -0,0015    | 0,064      | 0,030125      | 0,000125   | 0,45375   |

## Anhang

### Masse der *Spodoptera littoralis* Larven

**Tabelle 9f:** Massen der *S. littoralis* innerhalb von elf Tagen Wachstum bei Fütterung mit verschiedenen Antibiotikagemischen

| Tag                                      |       | 1          | 2    | 3    | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9          | 10         | 11         |
|--|-------|------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|------------|------------|
| Antibio-<br>tikage-<br>misch             | Larve | Masse [mg] |      |      |       |       |       |       |       |            |            |            |
| Ampicil-<br>lin<br>+Erythro-<br>mycin    | 1     | 1,91       | 3,61 | 4,23 | 9,25  | 14,98 | 32,04 | 45,86 | 65,01 | 81,49      | 181,7<br>6 | 250,9<br>6 |
|  | 2     | 2,31       | 2,74 | 5,44 | 11,2  | 11,59 | 33,48 | 47,49 | 49,34 | 95,9       | 170,6<br>6 | 228,7<br>9 |
|  | 3     | 2,47       | 2,49 | 6,03 | 12,02 | 11,84 | 30,6  | 46,02 | 53,5  | 89,79      | 197,2<br>9 | 244,0<br>3 |
|  | 4     | 2,32       | 2,96 | 6,15 | 12,38 | 12,04 | 36,85 | 56,66 | 63,57 | 112,0<br>8 | 235,7<br>3 | 292,1<br>1 |
|  | 5     | 1,93       | 1,91 | 4,47 | 9,42  | 10,71 | 28,13 | 41,94 | 62,55 | 80,97      | 190,6<br>3 | 273,9<br>7 |
|  | 6     | 2,03       | 3,45 | 4,76 | 11,02 | 15,1  | 32,72 | 49,66 | 53,01 | 85,26      | 195,3<br>4 | 196,1<br>5 |
|  | 7     | 3,13       | 3,81 | 8,1  | 15,25 | 13,44 | 40,73 | 56,06 | 62,93 | 125,3<br>8 | 240,4<br>5 | 215,6<br>2 |
|  | 8     | 2,16       | 4,22 | 5,88 | 13,48 | 16,47 | 40,65 | 62,4  | 64,51 | 126,0<br>7 | 249,9<br>6 | 233,9<br>4 |
|  | 9     | 1,71       | 3,66 | 4,35 | 8,82  | 17,97 | 25,54 | 38,13 | 74,7  | 69,88      | 160,9<br>7 | 266,0<br>4 |
|  | 10    | 2,96       | 3,78 | 7,3  | 13,81 | 16,34 | 40,09 | 60,09 | 51,5  | 125,0<br>6 | 232,2<br>8 | 201,9<br>9 |
| Ampicil-<br>lin<br>+Chloram-<br>phenicol | 11    | 2,64       | 3,49 | 6,58 | 12,68 | 13,19 | 37,34 | 55,15 | 53,16 | 110,8<br>6 | 230,8<br>4 | 208,5      |
|  | 12    | 3,56       | 4,78 | 9,61 | 17,62 | 23,43 | 59,09 | 86,42 | 80,35 | 177,0<br>8 | 331,1<br>8 | 344,4<br>8 |
|  | 13    | 1,87       | 3,73 | 5,51 | 11,44 | 15,93 | 36,28 | 55,17 | 70,4  | 119,5<br>5 | 266,6<br>8 | 295,4<br>5 |
|  | 14    | 1,98       | 4    | 4,72 | 11,04 | 17,19 | 34,96 | 53,96 | 81,28 | 95,46      | 198,3<br>6 | 278,5<br>8 |
|  | 15    | 2,27       | 3,11 | 5,29 | 10,98 | 14,3  | 34,11 | 46,13 | 69,73 | 98,3       | 221,1<br>1 | 264,4<br>8 |
|  | 16    | 1,25       | 2,69 | 3,02 | 6,18  | 13,66 | 17,02 | 30,38 | 63,74 | 59,46      | 138,3<br>2 | 262,5<br>9 |
|  | 17    | 1,79       | 3,25 | 3,92 | 8,02  | 16,04 | 21,26 | 33,38 | 68,48 | 70,75      | 166,0<br>3 | 282,3<br>6 |
|  | 18    | 1,92       | 2,94 | 3,8  | 8,14  | 16,6  | 22,91 | 35,13 | 70,18 | 63,09      | 166,9<br>1 | 327,1<br>2 |
|  | 19    | 2,3        | 4,2  | 4,83 | 10,13 | 21    | 27,74 | 42,65 | 80,9  | 74,51      | 199,4<br>3 | 283,7<br>4 |
|  | 20    | 1,78       | 3,23 | 3,56 | 8,46  | 15,94 | 22,28 | 32,09 | 67,26 | 68,54      | 161,9<br>3 | 275,6      |
| Ampicil-<br>lin<br>+Tetracy-<br>clin     | 21    | 1,5        | 3,27 | 3,08 | 7,43  | 14,48 | 19,91 | 27,67 | 56,25 | 60,28      | 125,3<br>3 | 250,1<br>1 |
|  | 22    | 1,88       | 3,66 | 4,89 | 10,02 | 20,51 | 28,39 | 40,87 | 80,64 | 77,33      | 190,2<br>6 | 304,5<br>1 |
|  | 23    | 1,53       | 2,82 | 3,34 | 8,3   | 14,91 | 24,67 | 34,03 | 66,68 | 67,2       | 173,2      | 306,1      |

## Anhang

|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       |       |       |
|---|----|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       | 4     | 1     |
|   | 25 | 2,15 | 3,64 | 5,67 | 11,41 | 14,96 | 34,3  | 47,43 | 66,29 | 96,17 | 223,8 | 263,5 |
|   | 26 | 2,07 | 2,33 | 5,03 | 10,33 | 12,38 | 31,27 | 47,83 | 53,49 | 97,4  | 208,6 | 258,0 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       | 4     | 4     |
|   | 27 | 1,59 | 3,52 | 4,33 | 8,55  | 16,96 | 24,17 | 32,83 | 67,6  | 65,15 | 148,3 | 294,3 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       | 3     | 6     |
|   | 28 | 3,32 | 4,87 | 8,91 | 15,47 | 19,85 | 45,69 | 59,77 | 57,21 | 138,1 | 243,9 | 219,4 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       | 2     | 4     | 2     |
|   | 29 | 1,65 | 3,54 | 3,09 | 8,32  | 16,91 | 25,06 | 37    | 69,2  | 69,47 | 173,0 | 247,2 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       | 4     | 7     |
|   | 30 | 3,35 | 4,2  | 8,37 | 16,5  | 20,4  | 53,43 | 66,52 | 77,21 | 158,9 | 265,7 | 281   |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       | 3     |       |
| Kontrolle<br>(ohne<br>Antibio-<br>tika) | 31 | 1,78 | 2,71 | 3,93 | 8,37  | 14,16 | 20,4  | 32,59 | 62,32 | 65,52 | 154,6 | 265,0 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       | 7     | 1     |
|   | 32 | 1,86 | 3,38 | 3,93 | 8,16  | 16,87 | 21,76 | 32,11 | 65,61 | 65,55 | 159,9 | 264,3 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       | 3     | 8     |
|   | 33 | 2,63 | 2,94 | 6,66 | 12,12 | 12,85 | 33,5  | 48,82 | 48    | 110,7 | 215,7 | 250,3 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       | 2     | 5     | 5     |
|   | 34 | 2,52 | 3,39 | 5,94 | 13,07 | 12,7  | 31,03 | 46,29 | 45,19 | 83,08 | 152,8 | 210,1 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       | 2     | 5     |
|   | 35 | 2,09 | 4,04 | 4,95 | 12,03 | 18,92 | 31,02 | 42,99 | 81,94 | 84,54 | 203,9 | 327,7 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       |       | 8     |
|   | 36 | 1,84 | 3,72 | 4,74 | 8,99  | 19,07 | 22,03 | 34,34 | 72,18 | 70,05 | 165,2 | 269,5 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       | 9     | 1     |
|   | 37 | 2,68 | 2,75 | 6,26 | 11,54 | 12,4  | 30,4  | 49,02 | 63    | 77,6  | 176,7 | 302,0 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       |       | 7     |
|   | 38 | 3,06 | 4,87 | 8,84 | 17,7  | 19,34 | 50,67 | 72,78 | 69,18 | 168,1 | 264,6 | 276,5 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       | 3     | 8     | 5     |
|   | 39 | 1,62 | 3,17 | 3,58 | 8,58  | 15,86 | 18,94 | 29,12 | 62,46 | 66,44 | 146,8 | 290,9 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       | 2     | 1     |
|   | 40 | 1,58 | 3,17 | 3,48 | 6,43  | 14,11 | 16,74 | 26,16 | 59,77 | 52,32 | 132,8 | 237,8 |
|   |    |      |      |      |       |       |       |       |       |       | 5     | 6     |

### Differenzen der Fluoreszenzintensitäten der Transformanten und Wildtyp Bakterien

**Tabelle 13:** Darstellung der Differenzen der Fluoreszenzintensitäten zwischen mit pALSM02 transformierten *E. coli* bzw. *E. mundtii* und ihren Wildtypen. P02-E) mit pALSM02 transformierte *E. coli*, kultiviert in erythromycinhaltigem (4 µl/ml) LB-Medium; P02) Mit pALSM02 transformierte *E. coli*, kultiviert in LB-Medium; T1-E) erste Transformante – mit pALSM02 transformierte *E. mundtii*, kultiviert in erythromycinhaltiger (4 µl/ml) THB; T1) erste Transformante – mit pALSM02 transformierte *E. mundtii*, kultiviert in THB; T2-E) zweite Transformante – mit pALSM02 transformierte *E. mundtii*, kultiviert in erythromycinhaltiger (4 µl/ml) THB; T2) zweite Transformante – mit pALSM02 transformierte *E. mundtii*, kultiviert in THB

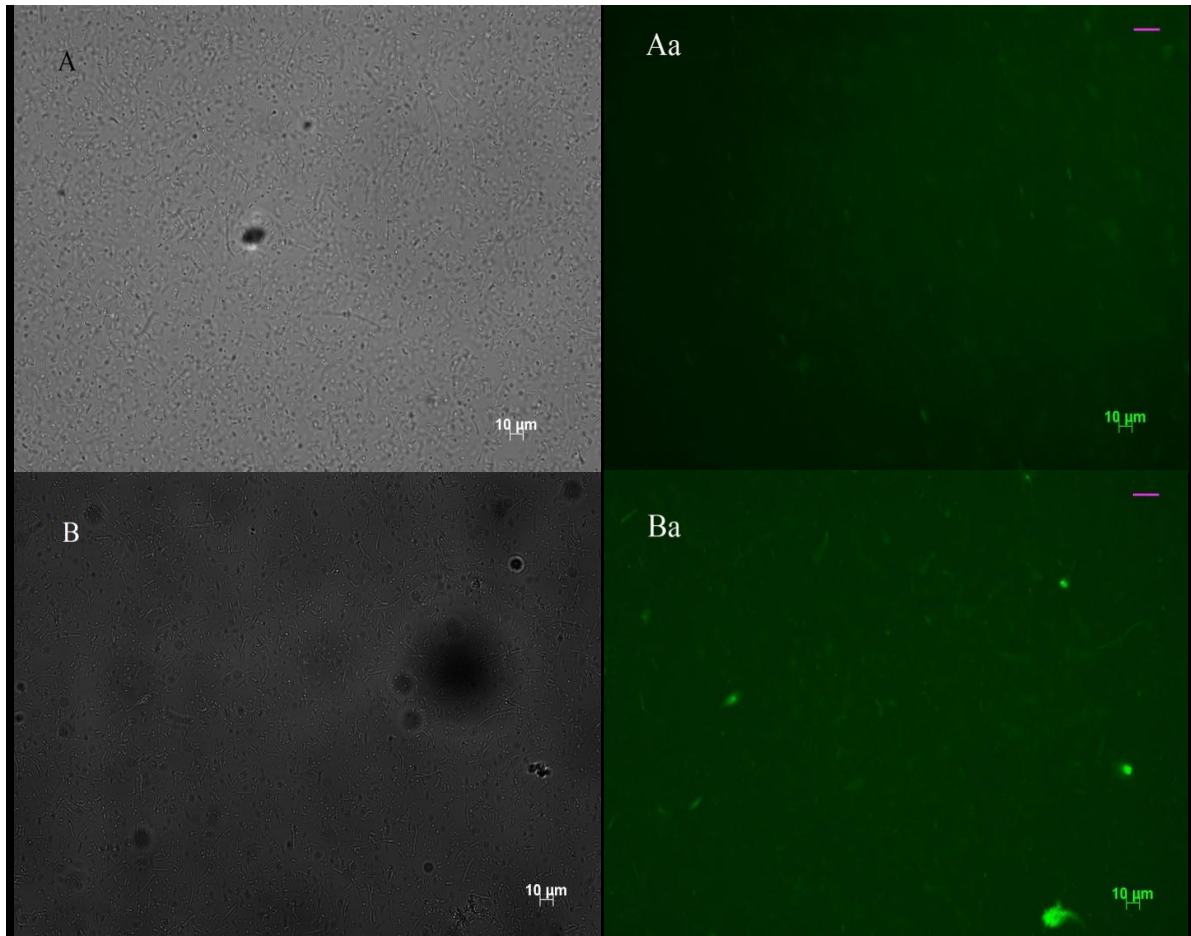
| Kultivierungstag | Bakterienstamm | Differenz zur natürlichen<br>Fluoreszenz |
|------------------|----------------|--|
| 1                | P02 - E        | 1.00                                     |
|                  | P02            | 0.96                                     |
|                  | T1 -E          | 1.00                                     |
|                  | T1             | 1.01                                     |

## Anhang

|   |         |      |
|---|---------|------|
|   | T2 -E   | 0.99 |
|   | T2      | 0.97 |
| 2 | P02 - E | 0.98 |
|   | P02     | 0.93 |
|   | T1 -E   | 0.93 |
|   | T1      | 0.91 |
|   | T2 -E   | 0.93 |
|   | T2      | 0.91 |
| 3 | P02 - E | 0.91 |
|   | P02     | 0.91 |
|   | T1 -E   | 0.94 |
|   | T1      | 0.92 |
|   | T2 -E   | 1.01 |
|   | T2      | 1.01 |
| 4 | P02 - E | 0.98 |
|   | P02     | 0.98 |
|   | T1 -E   | 1.01 |
|   | T1      | 1.00 |
|   | T2 -E   | 1.01 |
|   | T2      | 1.00 |
| 5 | P02 - E | 0.95 |
|   | P02     | 0.93 |
|   | T1 -E   | 0.98 |
|   | T1      | 0.98 |
|   | T2 -E   | 0.96 |
|   | T2      | 0.96 |
| 6 | P02 - E | 0.89 |
|   | P02     | 0.92 |
|   | T1 -E   | 0.99 |
|   | T1      | 0.98 |
|   | T2 -E   | 0.96 |
|   | T2      | 0.94 |
| 7 | P02 - E | 0.91 |
|   | P02     | 0.91 |
|   | T1 -E   | 0.94 |
|   | T1      | 0.96 |
|   | T2 -E   | 1.00 |
|   | T2      | 0.98 |

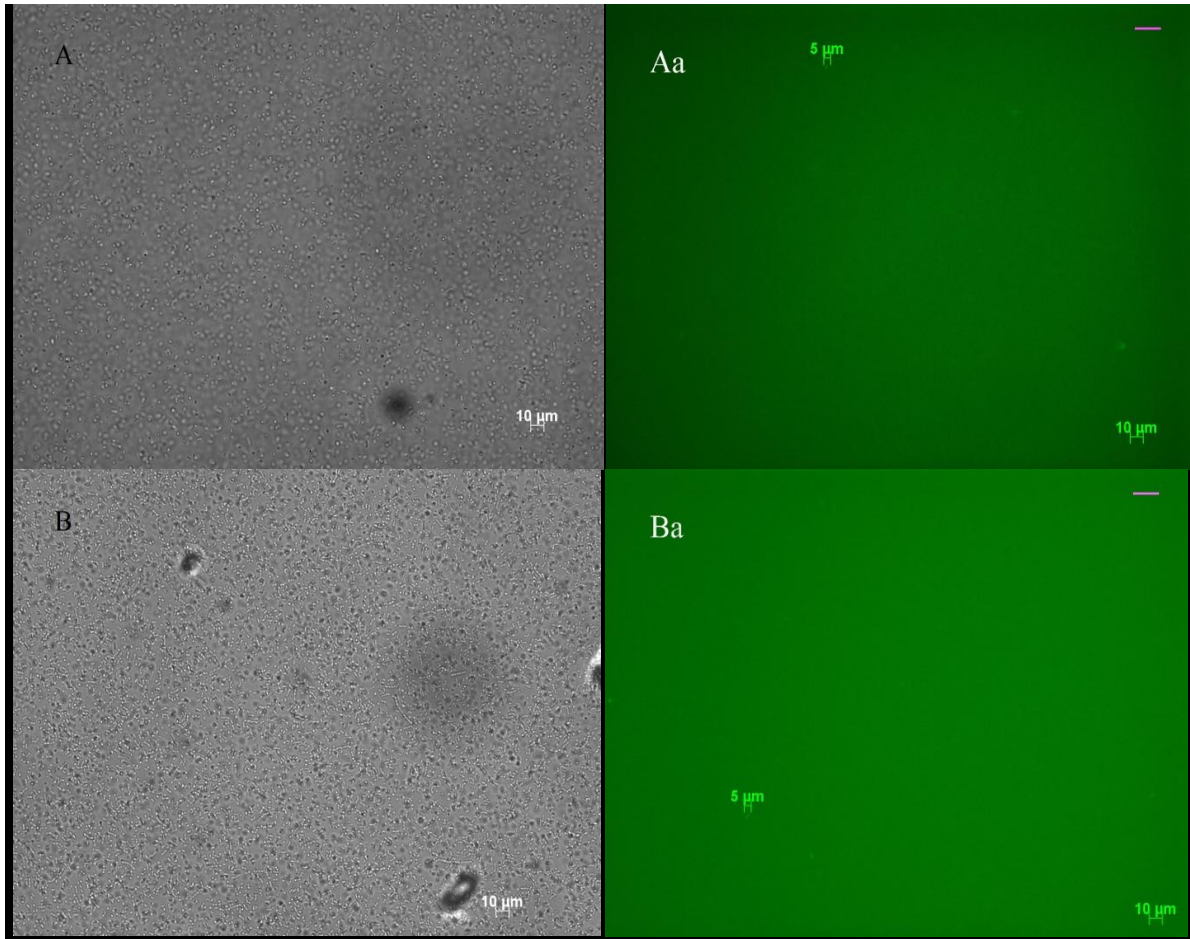
## Anhang

### Mikroskopbilder der Fluoreszenzvisualisierungen



**Abbildung 9h:** *E. coli* mit transformiertem pALSM02 bei 20000facher Vergrößerung. A) P02-E; Aa) Betrachtung von Bild A unter Einwirkung von Fluoreszenzstrahlung; B) P02; Ba) Betrachtung von Bild B unter Einwirkung von Fluoreszenzstrahlung

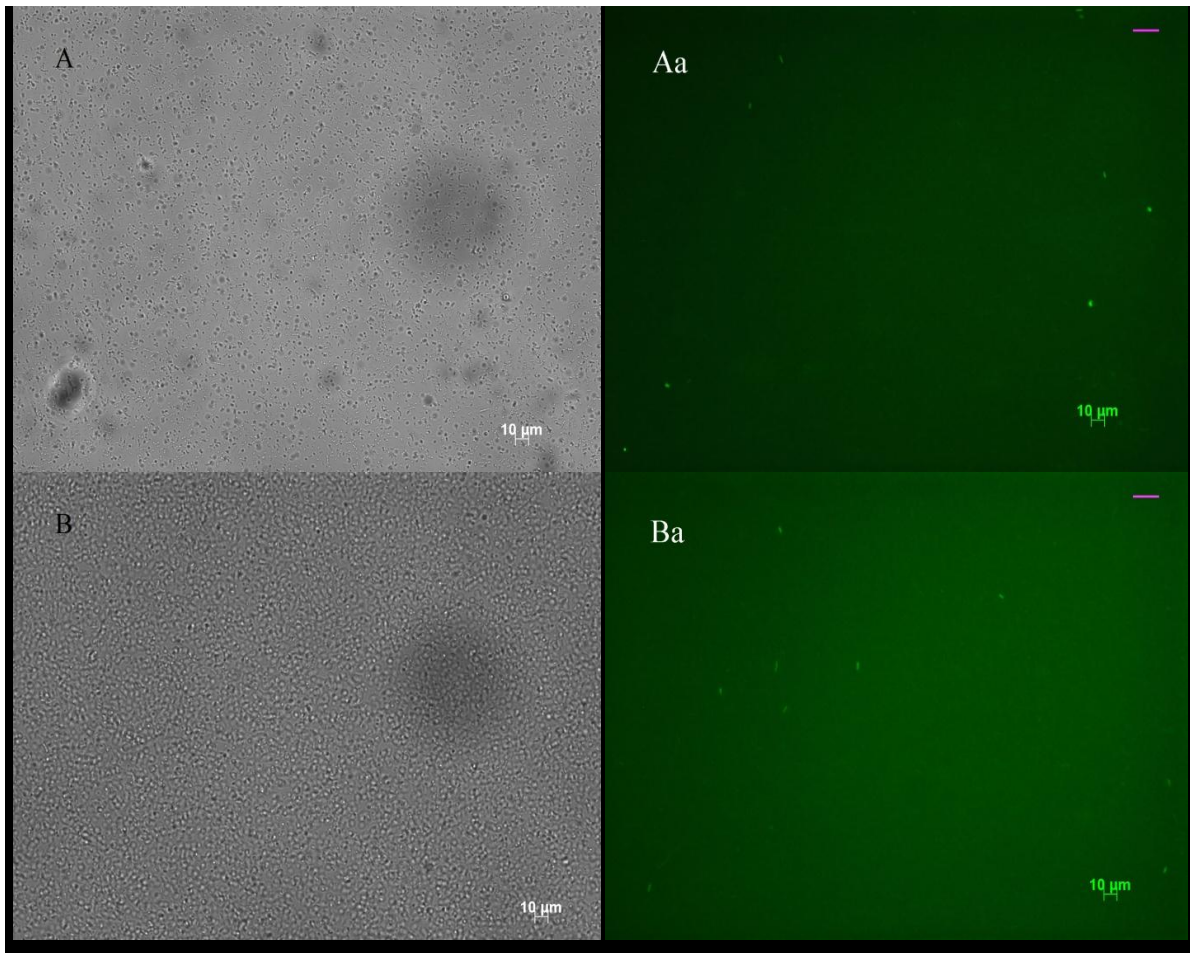
## Anhang



**Abbildung 9i21:** *E. mundtii* (erste Transformante) mit transformierten pALSM02 bei 20000facher Vergrößerung. A) T1-E; Aa) Betrachtung von Bild A unter Einwirkung von Fluoreszenzstrahlung; B) T1; Ba) Betrachtung von Bild B unter Einwirkung von Fluoreszenzstrahlung



## Anhang



**Abbildung 9j22:** *E. mundtii* (zweite Transformante) mit transformierten pALSM02 bei 20000facher Vergrößerung. A) T2-E; Aa) Betrachtung von Bild A unter Einwirkung von Fluoreszenzstrahlung; B) T2; Ba) Betrachtung von Bild B unter Einwirkung von Fluoreszenzstrahlung

### Programmeigenschaften für die Fluoreszenzmessung

**Tabelle 9k:** Programmeigenschaften zur Messung der OD<sub>600</sub>

| OD <sub>600</sub> |                   |
|-------------------|-------------------|
| Methode           | Absorption        |
| Wellenlänge       | 600 nm            |
| Bandbreite        | 9 s <sup>-1</sup> |
| Anzahl der Blitze | 25                |

## Anhang

**Tabelle 91:** Programmeigenschaften zur Messung der Fluoreszenz

| <b>GFP</b>             |                          |
|------------------------|--------------------------|
| Methode                | Fluorescence Top Reading |
| Exzitationswellenlänge | 483 nm                   |
| Emissionswellenlänge   | 512 nm                   |
| Exzitationsbandbreite  | 9 s <sup>-1</sup>        |
| Emissionsbandbreite    | 20 s <sup>-1</sup>       |
| Verstärkung            | 100                      |
| Anzahl der Blitze      | 25                       |
| Integrationszeit       | 20                       |
| Verzögerungszeit       | 0                        |
| Ruhezeit               | 0                        |

## **Danksagung**

### **10. Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Erika Arias-Cordero bedanke, die mir während meiner Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich bei der Bearbeitung dieser interessanten Aufgabenstellung unterstützt hat.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wilhelm Boland dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie meine Praxisphase absolvieren und eine Bachelorarbeit verfassen zu können.

Weiterhin möchte ich mich bei der Fachhochschule Jena und insbesondere Herrn Prof. Dr. Waldemar Künkel für die Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Zuletzt danke ich meiner Familie für ihre moralische und nicht zuletzt finanzielle Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit.

## Selbstständigkeitserklärung

### 11. Selbstständigkeitserklärung

Eingereicht von: Pauline Gehb  
Salzunger Straße 43  
36460 Merkers

Matrikel Nummer: 633954

Studiengang: Biotechnologie

Angefertigt am: Max Planck Institut für chemische Ökologie  
Hans-Knöll-Straße 8  
07745 Jena

Betreuer am MPI: Erika Arias-Cordero

Arbeitsgruppenleiter: Prof. Dr. Wilhelm Boland

Hochschulbetreuer: Prof. Dr. Waldemar Künkel

Hiermit erkläre ich, Pauline Gehb, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen Quellen und Hilfsmittel, als die angegebenen, verwendet habe.

.....  
Jena, im August 2013