



# Molekulare Mikrobiologie

**Versuchsdurchführende**

Huyen Anh Nguyen (572309)  
Johanna Laetitia Heide (...)

**Versuchsort**

Haus 14, Kursraum  
Gruppe 3

**Versuchsleiter**

Prof. Dr. Marc Erhardt

**Versuchsbetreuer**

Dr. Caroline Kühne  
Heidi Landmesser

Abgabe 31. Januar 2025

# Contents

<b>1</b>	<b>Note from the Author</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Insertion mutagenesis using the transposable element T-Pop</b>	<b>3</b>
2.1	Einleitung . . . . .	3
2.2	Methode . . . . .	3
2.3	Ergebnis . . . . .	4
2.4	Diskussion . . . . .	4
<b>3</b>	<b>The Luria-Delbrück fluctuation test</b>	<b>5</b>
3.1	Einleitung . . . . .	5
3.2	Methode . . . . .	5
3.3	Ergebnis . . . . .	6
3.4	Diskussion . . . . .	6
<b>4</b>	<b>Phenotypic analysis of type-III protein secretion</b>	<b>7</b>
4.1	Analysis of protein secretion via the fT3SS in Salmonella mutants using SDS-PAGE and western blot . . . . .	7
4.1.1	Einleitung . . . . .	7
4.1.2	Methode . . . . .	7
4.1.3	Ergebnis . . . . .	8
4.1.4	Diskussion . . . . .	8
4.2	Luciferase assay to measure gene expression . . . . .	8
4.2.1	Einleitung . . . . .	8
4.2.2	Methode . . . . .	8
4.3	Ergebnis . . . . .	9
4.4	Motility assay to analyze the swimming behavior of Salmonella mutants . . . . .	9
4.4.1	Einleitung . . . . .	9
4.4.2	Methode . . . . .	9
4.4.3	Ergebnis . . . . .	10
4.4.4	Diskussion . . . . .	10
<b>5</b>	<b>Dissecting the regulatory mechanism of an unknown flagellar regulator</b>	<b>11</b>
5.1	Einleitung . . . . .	11
5.2	Methode . . . . .	11
5.3	Ergebnis . . . . .	11
5.4	Diskussion . . . . .	11
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>12</b>
	Bibliography . . . . .	12

# Note from the Author

Wir erklären ausdrücklich, dass wir die Anmerkungen zur Anfertigung des Protokolls gelesen und befolgt haben, dass es sich bei der von uns eingereichte Arbeit um eine von uns erstmalig, selbstständig ohne fremde Hilfe verfasste Arbeit handelt und dass wir sämtliche verwendete zulässige Literatur (Fachpublikationen/-bücher), die unverändert oder abgewandelt wiedergeben werden, insbesondere Quellen für Texte, Grafiken, Tabellen und Bilder als solche kenntlich gemacht haben. Uns ist bewusst, dass Verstöße gegen diese Grundsätze als Täuschung betrachtet und entsprechend der Prüfungsordnung und/oder der Fächerübergreifenden Satzung zur Regelung von Zulassung, Studium und Prüfung der Humboldt-Universität zu Berlin geahndet werden.

Die Versuche werden wie im Skript "Praktikum Molekulare Mikrobiologie" von Dr. Caroline Kühne<sup>1</sup> durchgeführt. Nur bei Abweichungen werden diese in diesen Protokoll aufgeführt. Zudem wird in diesen Protokoll für die einzelnen Versuchen, die verwendete Phagen- und Sallmonella-Stämme aufgelistet, da in den meisten Versuchen, die unterschiedlichen Stämme unter den Studentenen-Gruppen aufgeteilt wurden.

# Insertion mutagenesis using the transposable element T-Pop

## 2.1 Einleitung

In diesen Experiment wird untersucht, wie viele Gene des Salmonella Chromosom durch die Insertion des T-POP-Transposon in seinem Salmonella-Stamm mit einem fljB-lac Fusion beeinflusst werden.

In den Salmonella Zellen sind die zwei Gene FljB und FliC (Klasse 3 - Proteine) für die Proteine der Filamente verantwortlich.<sup>2</sup> Der Salmonella-Stamm für diesen Versuch besitzt in seinem fljB-Gen den Mud-lac-Operon, ein Fusionsgen. (MudJ besitzt ein Kanamycin-Resistenz Kassetten fusioniert mit den lac-Operon, wobei hier der Kanamycin-Resistenz Kassetten durch ein Chloramphenicol-Resistenz Kassetten ersetzt wird.) Das bedeutet, wenn das fljB-Gen exprimiert wird, wird zugleich auch der lac Operon mit exprimiert, da der lac Operon den fljB Promotor mitbenutzt.

## 2.2 Methode

In Table 2.1 wurden die in dem Versuch verwendete Biologisches Material aufgeführt.

Table 2.1: Verwendete biologische Material für die Insertion von Mutagenen mittels eines T-Pop Transposon.

Biologisches Material	Stamm	Phänotyp
P22 Phagen Lysat	TH3468	F'128 (pro-lac) zzf-3834::Tn10dTc[del-20 del-25] (T-POP3) / proAB4
Recipienten Salmonellazellen	EM8052	MvP103 sseC::aphT (Km <sup>R</sup> ) fljB23028::MudJ-Cm (Km in MudJ replaced by FCF)/ pNK2880 (Ap <sup>R</sup> )

Durchführung siehe Skript.<sup>1</sup>

## 2.3 Ergebnis

Table 2.2: Mittelwert von der Table 6.1. Der Transposon T-POP wurde mit dem Phagenstamm TH3468 in die Salmonella-Recipientenstamm EM8052 in den Genom eingefügt. Hier wurde der Mittelwert der Anzahl der Gene ermittelt, die durch die Insertion betroffen sind.

#TcR	Lac <sup>-</sup>	lac <sup>-</sup> (beide Platten)	Tc-dep.-Lac <sup>-</sup>	Tc-dep.Lac <sup>+</sup>	Ratio: $\frac{Lac^-}{\#TcR}$	Genes affected
130	2	1.5	0.5	0	2/130	72

Durch die T-POP insertion konnte im Durchschnitt bestimmt werden, dass 72 Gene für die flüB-lac-Expression verantwortlich sind (siehe Table 2.2).

## 2.4 Diskussion

Für die Expression des flüB-lac-Fusionsproteine sind ca. 60 Gene verantwortlich (Erwartungswert von Dr. Caroline Kühne im Praktikum vorgegeben). Hier wurde ein Wert von 72 affected Genes ermittelt, welches um 20% höher liegt als der erwartete Wert. Die Daten wurde aus dem Schnitt von 8 verschiedene Gruppe berechnet, wobei die Standardabweichung circa  $\pm 31$  Gene liegt.

Damit die Standardabweichung verringert werden kann, müsste der Versuch nochmal innerhalb der Gruppen die Replicaplaten mit n=6 für die MacConkey-Tc- und MacConkey-Lac-Tc-Platten wiederholt werden.

# The Luria-Delbrück fluctuation test

## 3.1 Einleitung

In diesen Versuch werden die Hypothese überprüft, ob Mutation adaptiv oder zufällig passiert. Dabei werden zwei Salmonella-Stämme verwendet, ein Wildtyp und eine die eine Mutation in ihren DNA-Reperatursystem besitzt, und mit den Antibiotika Rifampicin behandelt.

Anhand der Anzahl von Kolonienbildenden Einheiten auf den Antibiotika-Platten wird die Mutationsereignis pro Kultur bestimmt und überprüft, ob die Mutation adaptiv oder zufällig passiert ist.

## 3.2 Methode

Table 3.1: Verwendete biologische Material für die den Luria-Delbrück Fluktationstest. Die Stämme wurden in E25-Medium (E Salz Minimal Medium mit 0.0025 % Glukose) kultiviert bevor es im Versuch in E1000 kultiviert wurde.

Biologisches Material	Stamm	Phänotyp
Salmonella Wildtyp	EM7653	MvP103 sseC::aphT ( $Km^R$ ) wildtype
Salmonella Mutant	EM8021	MvP103 sseC::aphT ( $Km^R$ ) $\Delta$ mutS::FCF ( $Cm^R$ )

### 3.3 Ergebnis

Table 3.2: Inoculum-Tabelle. Koloniezahlen von Wildtyp (EM7653) und Mutant (EM8021) der jeweiligen Gruppen, die auf LB-Rifampicilin- und LB-Platten gewachsen sind.

WT (EM7653)				$\Delta$ mutS (EM8021)		
Gr-No.	$N_t$	# cultures	# cultures with zero mutations	$N_t$	# cultures	# cultures with zero mutations
1	$1.36 \cdot 10^7$	36	36	$1.39 \cdot 10^7$	36	20
2	$6.2 \cdot 10^4$	36	36	$4.6 \cdot 10^4$	36	36
3	$1.085 \cdot 10^9$	36	36	$5.05 \cdot 10^6$	36	31
4	N/A	36	36	N/A	36	31
5	$1.34 \cdot 10^7$	36	36	$1.26 \cdot 10^7$	36	34
6	$2.6 \cdot 10^9$	36	33	$3.95 \cdot 10^9$	35	0
7	$9.2 \cdot 10^5$	36	36	N/A	36	28
8	N/A	36	36	N/A	36	30

Table 3.3: Durchschnittliche Poisson Verteilung  $p_0$ , Mutationsrate  $a$  und Mutationsereignis pro Kultur  $m$  vom Wildtyp (EM7653) und Mutant (EM8021)

WT (EM7653)			$\Delta$ mutS (EM8021)		
$p_0$	$a$	$m$	$p_0$	$a$	$m$
0.982	$1.300 \cdot 10^{-9}$	0.017	0.732	$2.479 \cdot 10^{-8}$	0.312

In der Table 3.3 wurden die Poisson Verteilung  $p_0$ , Mutationsrate  $a$  und Mutationsereignis pro Kultur nach folgende Rechnung bestimmt:  
(Beispielzahlen wird für die Gruppe 3 eingesetzt)

$$p_0(WT) = \frac{\text{\#cultures with zero mutations}}{\text{\#cultures}} = \frac{36}{36} = 1$$

$$m(WT) = -\ln(p_0(WT)) = -\ln(1) = 0$$

$$a(WT) = \frac{m(WT)}{N_t(WT)} = \frac{0}{1.085 \cdot 10^9} = 0$$

Diese Rechnung wird für alle Gruppen gemacht und für den Mutantenstamm und dann den Mittelwert genommen.

### 3.4 Diskussion

# Phenotypic analysis of type-III protein secretion

## 4.1 Analysis of protein secretion via the fT3SS in Salmonella mutants using SDS-PAGE and western blot

### 4.1.1 Einleitung

### 4.1.2 Methode

Table 4.1: Salmonella-Stämme die für den Versuch der Analyse der Sekretionsproteine mittels SDS-PAGE und Western Blot verwendet wurde.

Biologisches Material	Stamm	Phänotyp
Salmonella Wildtyp	EM8016	MvP103 sseC::aphT (Km <sup>R</sup> ) $\Delta$ hin5717::FRT (fliC-ON)
Salmonella Mutant	EM8035	MvP103 sseC::aphT (Km <sup>R</sup> ) $\Delta$ hin5717::FRT (fliC-ON) $\Delta$ fliP6659::tetRA



### 4.1.3 Ergebnis

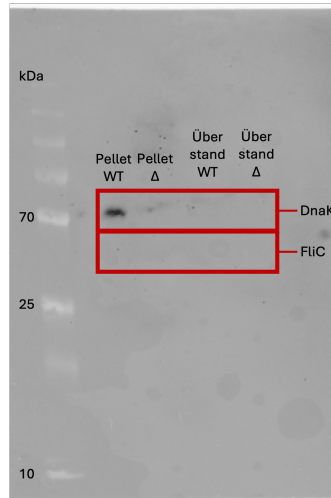


Figure 4.1: WesternBlot vom Überstand und vom Pellet des Wildtyps EM8016 und Mutant 8035 nach einem SDS-PAGE. Banden wurden mit Antikörper für DnaK und FliC sichtbar gemacht. DnaK gilt hier als Kontrollprotein und hat eine Molekülgröße von 77kDa und FliC eine Größe von 55kDa.

### 4.1.4 Diskussion

## 4.2 Luciferase assay to measure gene expression

### 4.2.1 Einleitung

### 4.2.2 Methode

Table 4.2: Salmonella-Stämme die für den Luciferase Assay verwendet wurde.

Biologisches Material	Stamm	Phänotyp
Salmonella Wildtyp 1	EM8009	pRG38 ( $P_{flhD}$ -luxCDABE; $Tc^R$ )
Salmonella Wildtyp 2	EM8008	pRG52 ( $P_{flhB}$ -luxCDABE; $Tc^R$ )
Salmonella Wildtyp 3	EM8007	pRG19 ( $P_{motA}$ -luxCDABE; $Tc^R$ )
Salmonella Mutant 1	EM8044	$\Delta flgE22964::FCF$ / pRG38 ( $P_{flhD}$ -luxCDABE; $Tc^R$ )
Salmonella Mutant 2	EM8045	$\Delta flgE22964::FCF$ / pRG52 ( $P_{flhB}$ -luxCDABE; $Tc^R$ )
Salmonella Mutant 3	EM8043	$\Delta flgE22964::FCF$ / pRG19 ( $P_{flhB}$ -luxCDABE; $Tc^R$ )

## 4.3 Ergebnis

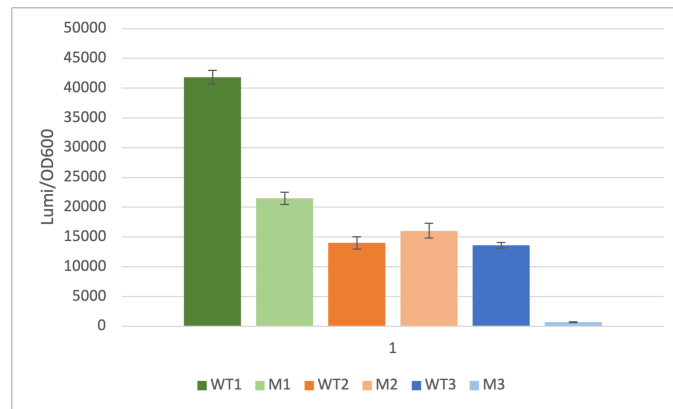


Figure 4.2: Luminiszenz-Verhältnis zu der Zelldichte im Vergleich von Wildtyp und Mutant.

## 4.4 Motility assay to analyze the swimming behavior of Salmonella mutants

### 4.4.1 Einleitung

### 4.4.2 Methode

Table 4.3: Salmonella-Stämme die für den Motility-Assay verwendet wurde.

Biologisches Material	Stamm	Phänotyp
Salmonella Wildtyp	EM8016	MvP103 sseC::aphT ( $Km^R$ ) $\Delta$ hin5717::FRT (fliC-ON)
Salmonella Mutant 1	EM8033	MvP103 sseC::aphT ( $Km^R$ ) $\Delta$ hin5717::FRT (fliC-ON) $\Delta$ fliT5758::FCF
Salmonella Mutant 2	EM8034	MvP103 sseC::aphT ( $Km^R$ ) $\Delta$ hin5717::FRT (fliC-ON) $\Delta$ fliS5728::FRT
Salmonella Mutant 3	EM8035	MvP103 sseC::aphT ( $Km^R$ ) $\Delta$ hin5717::FRT (fliC-ON) $\Delta$ fliP6659::tetRA
Salmonella Mutant 4	EM8036	MvP103 sseC::aphT ( $Km^R$ ) $\Delta$ hin5717::FRT (fliC-ON) $\Delta$ fliC7715::tetRA

### 4.4.3 Ergebnis

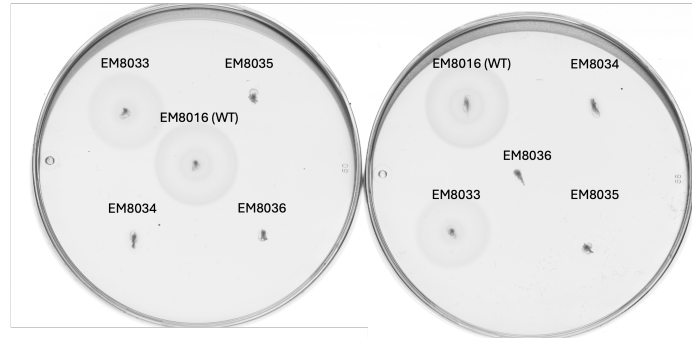


Figure 4.3: Inokulierte Kulturen in Motility Agar und Inkubation für 4h bei 37°C.

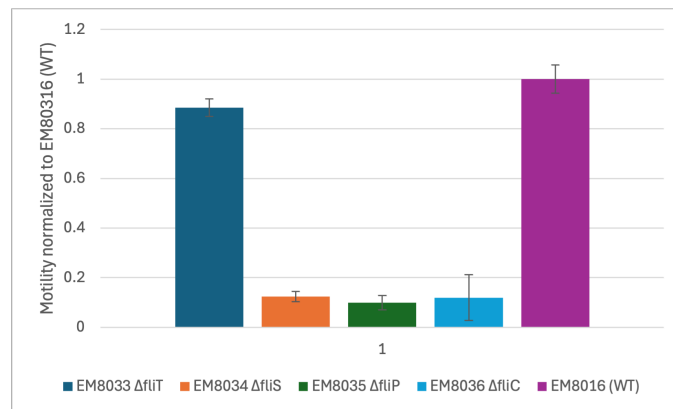


Figure 4.4: Durchschnittliches Durchmesser der Kulturen, die nach 4h bei 37°C sich bewegt haben. Normalisiert wurden die Werte auf dem Wildtyp EM8016 und die Standardabweichung von zwei Platten genommen.

### 4.4.4 Diskussion

# Dissecting the regulatory mechanism of an unknown flagellar regulator

## 5.1 Einleitung

## 5.2 Methode

Table 5.1: Salmonella-Stämme die für die Untersuchung des unbekannten Flaggella Regulator verwendet wurde.

Biologisches Material	Stamm	Phänotyp
Salmonella Wildtyp	EM8017	fliL23026::MudJ-Cm ( $Km^R$ in MudJ replaced by FCF = $Cm^R$ )
Salmonella Mutant	EM9900	fliL23026::MudJ-Cm ( $Km^R$ in MudJ replaced by FCF = $Cm^R$ ) $\Delta$ regulator::tetRA

## 5.3 Ergebnis

## 5.4 Diskussion

# Anhang

Table 6.1: Versuch 2: Insertion mutagenesis using the transposable element T-POP. Der Transposon T-POP wurde in die Recipientenzellen des Stammes EM8052 (Table 2.1) über Nacht mit einem Phagenlysate TH3468 (Table 2.1) transduziert. Anzahl der Kolonien von Gruppe 1-8, die auf MacConkey-lactose Platten mit Tetracyclin und MacConkey-lactose Platten ohne Tetracyclin gewachsen sind, wurden bestimmt und die Anzahl der betroffene Gene ermittelt.

Gr.	#TcR	Lac <sup>-</sup>	lac <sup>-</sup> (beide Platten)	Tc-dep.-Lac <sup>-</sup>	Tc-dep.Lac <sup>+</sup>	Ratio: $\frac{Lac^-}{\#TcR}$	Genes affected
1	246	5	3	2	0	5/246	81
2	77	1	0	0	1	1/77	52
3	115	1	1	0	0	1/115	35
4	93	2	1	1	0	2/93	86
5	33	1	1	0	0	1/33	121
6	95	0	0	0	0	NA	NA
7	106	1	1	0	0	1/106	38
8	274	6	5	1	0	6/274	88

# Bibliography

<sup>1</sup> Dr. Caroline Kühne. Skript modul mb22 - praktikum molekulare mikrobiologie, 2024.

<sup>2</sup> Tomoko Yamaguchi. Structural and functional comparison of salmonella flagellar filaments composed of fljB and fliC. 2020. doi:10.3390/biom10020246.