

**Regulation der Expression
von *multiple drug resistance* (mdr) Effluxpumpen
in klinisch relevanten *Salmonella*-Stämmen**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Silke Schmidt

aus Löhne

Hamburg 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2004 bis Dezember 2006
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig
in der Abteilung für Pharmazeutische Biologie & Mikrobiologie
am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Heisig
2. Gutachter: Prof. Dr. Bernward Bisping

Disputationstermin: 15.06.2007

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Die Gattung <i>Salmonella</i>	1
1.1.1 Bedeutung von <i>Salmonella</i> als Krankheitserreger	2
1.2 Struktur und Wirkung von Fluorchinolonen	3
1.3 Resistenzmechanismen gegenüber Fluorchinolonen	6
1.3.1 Veränderung der Zielstrukturen	7
1.3.2 Enzymatische Inaktivierung	8
1.3.3 Plasmid-vermittelte Resistenz (Qnr)	9
1.3.4 Verringerung der Akkumulation	10
1.4 <i>multiple drug resistance</i> (mdr) Effluxsysteme	11
1.4.1 Klassifizierung und Organisation von Effluxpumpen	12
1.5 Regulation von Effluxpumpen	18
1.5.1 Lokale Regulatoren	18
1.5.2 Globale Regulatoren	19
1.5.2.1 Das <i>marRAB</i> -Operon	19
1.5.2.2 Das <i>soxRS</i> -Operon	22
1.5.2.3 Der Regulator Rob	23
1.5.2.4 Der Regulator Rma	24
1.6 Ziel der Arbeit	25
2. Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Mikroorganismen	27
2.1.2 Plasmide	28
2.1.3 Oligonukleotide	29
2.1.4 Antibiotika	30
2.1.5 Nährmedien	31
2.1.6 Puffer und Lösungen	31
2.1.7 Kits	32
2.1.8 Enzyme	33
2.1.9 Chemikalien	33
2.1.10 Geräte und sonstige Materialien	34
2.2. Methoden	35
2.2.1. Stammhaltung und Kryokonservierung	35
2.2.2. Stammanzucht und Zellernte	35
2.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl (KBE)	36

2.2.4	Bestimmung der Generationszeit	36
2.2.5	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	37
2.2.6	Isolierung von DNA	38
2.2.6.1	Isolierung chromosomaler DNA	38
2.2.6.1.1	Isolierung chromosomaler DNA nach der Kochmethode	38
2.2.6.1.2	Isolierung chromosomaler DNA mittels CTAB und anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion	38
2.2.6.2	Isolierung von Plasmid-DNA	39
2.2.6.2.1	Plasmid-Minipräparation verändert nach Birnboim & Doly	39
2.2.6.2.2	Plasmid-Minipräparation mittels Qiagen-Kits	40
2.2.6.2.3	Plasmid-Midipräparation mittels Qiagen-Kits	41
2.2.7	Aufreinigung und Konzentrierung von DNA	41
2.2.7.1	Phenol/Chloroform-Extraktion	41
2.2.7.2	Alkoholpräzipitation	42
2.2.7.3	Aufreinigung von PCR-Produkten mittels Silika-Säulen	42
2.2.7.4	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	42
2.2.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen	43
2.2.8.1	Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	43
2.2.8.2	Abschätzung der Konzentration im Agarosegel	44
2.2.9	Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese	44
2.2.10	In-vitro-Amplifikation von DNA	45
2.2.11	Modifizierung von DNA	47
2.2.11.1	Restriktion von DNA	47
2.2.11.2	Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	48
2.2.11.3	Ligation von DNA	48
2.2.12	Herstellung kompetenter Bakterienzellen und Transformation	49
2.2.12.1	Herstellung kompetenter Bakterien nach der CaCl ₂ -Methode	49
2.2.12.2	Transformation nach der Methode von Hanahan	50
2.2.12.3	Herstellung elektrokompenter Zellen	50
2.2.12.4	Elektroporation	51
2.2.13	Sequenzierung	51
2.2.14	Gendisruption nach Datsenko & Wanner	53
2.2.15	Herstellung und Ausstempeln einer chromosomalen Genbank	55
2.2.16	Allgemeines Arbeiten mit RNA	58
2.2.17	Isolierung von Gesamt-RNA mit DNase-Behandlung	58

2.2.18	Qualitätsprüfung von RNA	59
2.2.19	Quantitative real-time PCR	60
2.2.19.1	cDNA-Synthese	60
2.2.19.2	real-time PCR	61
2.2.19.3	Bestimmung der Genexpression	63
3.	Ergebnisse	65
3.1	Einführung	65
3.2	Charakterisierung der In-vitro-Mutanten aus den Selektionsexperimenten	67
3.2.1	Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika in An- und Abwesenheit eines Effluxpumpeninhibitors	67
3.2.2	Sequenzierung möglicher, für die Verringerung der Empfindlichkeit verantwortlicher Gene	68
3.2.3	Bestimmung von Generationszeiten	69
3.3	Erstellung einer chromosomalen Genbank	70
3.3.1	Analyse der <i>shotgun</i> -Klone	71
3.3.2	Subklonierung eines möglichen die Empfindlichkeit verringernden Gens	72
3.4	Aminosäuresequenz-Alignments zur Identifizierung unbekannter Effluxpumpen	74
3.5	Herstellung von <i>marR</i> -Deletionsmutanten zur Identifizierung MarA-regulierter Effluxpumpen	77
3.5.1	Konstruktion der <i>marR</i> -Deletionsmutanten	77
3.5.2	Charakterisierung der <i>marR</i> -Deletionsmutanten	80
3.6	Untersuchungen zur Expression von Effluxpumpen und Regulatoren	81
3.6.1	Auswahl geeigneter Kontrollgene	82
3.6.2	Untersuchungen zur Induktion von Effluxpumpen und Regulatoren durch Fluorchinolone und Chloramphenicol	82
3.6.3	Vergleich der Expression von Effluxpumpen in Wildtyp- und Mutantenstämmen	84
3.6.4	Vergleich der Expression von Regulatoren in Wildtyp- und Mutantenstämmen	86
3.6.5	Vergleich der Expression von Effluxpumpen und Regulatoren nach Induktion verschiedener Regulatoren	88
3.6.5.1	Induktion von <i>marA</i> mittels Salicylsäure	88
3.6.5.1.1	Phänotypische Auswirkungen der verstärkten Expression von <i>marA</i>	91
3.6.5.2	Induktion von <i>soxS</i> mittels Paraquat	92
3.6.5.2.1	Phänotypische Auswirkungen der verstärkten Expression von <i>soxS</i>	95

3.6.5.3	Posttranslationale Verstärkung von Rob mittels 2,2'-Bipyridin	96
3.6.5.3.1	Phänotypische Auswirkungen der posttranslationalen Verstärkung von Rob	99
3.6.6	Vergleich der Expression von Effluxpumpen und Regulatoren nach Überexpression verschiedener Regulatoren	100
3.6.6.1	Überexpression von <i>rob</i>	100
3.6.6.2	Überexpression von <i>rma</i>	104
3.6.6.3	Phänotypische Auswirkungen der Überexpression von <i>rob</i> und <i>rma</i>	108
3.6.7	Untersuchung des Einflusses der verstärkten Expression der Effluxpumpe AcrAB	112
3.7	Untersuchungen zur Expression von Regulatoren und der Effluxpumpe AcrAB in klinischen Isolaten von <i>Salmonella spec.</i>	114
4.	Diskussion	117
4.1	Selektion Fluorchinolon-resistenter In-vitro-Mutanten	117
4.2	Charakterisierung der In-vitro-Mutanten aus den Selektionsexperimenten	119
4.2.1	Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika	119
4.2.2	Sequenzanalyse von <i>acrRAB</i> , <i>soxR</i> sowie <i>rma</i>	120
4.2.3	Wachstumsverhalten als Indikator für die Fitness	122
4.3	Erstellung einer Genbank als globaler Ansatz	123
4.4	Identifizierung unbekannter Effluxpumpen	126
4.5	Deletion von <i>marR</i> zur Überexpression von MarA	127
4.6	Expression von Effluxpumpen und Regulatoren	129
4.6.1	Induktion durch Fluorchinolone und Chloramphenicol	130
4.6.2	Expressionsunterschiede in Wildtyp- und Mutantenstämmen	132
4.6.3	Rolle von MarA, SoxS, Rob und Rma für die Expression von Effluxpumpen	135
4.6.3.1	Induktion von <i>marA</i>	135
4.6.3.2	Induktion von <i>soxS</i>	138
4.6.3.3	Posttranslationale Verstärkung von Rob	140
4.6.3.4	Überexpression von <i>rob</i>	141
4.6.3.5	Überexpression von <i>rma</i>	143
4.6.3.6	Vergleich des Resistenzphänotyps nach Induktion bzw. Überexpression globaler Regulatoren	145
4.6.3.7	Modell der Regulation ausgewählter Effluxpumpen in <i>Salmonella spec.</i>	146

4.6.4	Bedeutung einer erhöhten Expression der Effluxpumpe AcrAB für die Resistenzeigenschaften	147
4.7	Expression von Regulatoren sowie der Effluxpumpe AcrAB in klinischen Isolaten von <i>Salmonella</i> spec.	149
4.8	Ausblick	151
5.	Zusammenfassung	153
6.	Literatur	157
7.	Abkürzungsverzeichnis	175
8.	Anhang	178
	Danksagung	181
	Lebenslauf	182
	Veröffentlichungen und Vorträge	183

1. Einleitung

Gastrointestinale Infektionskrankheiten, die durch Mikroorganismen der Gattung *Salmonella* verursacht werden, gehören weltweit zu den häufigsten bakteriellen Erkrankungen (115, 289). Folgt die Infektion keinem selbstlimitierenden Krankheitsverlauf, werden zur Therapie vor allem Fluorchinolone als Inhibitoren der bakteriellen Topoisomerasen (siehe 1.2) eingesetzt. Ein Problem bei der therapeutischen Behandlung stellen resistente Bakterien dar.

Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen entstehen durch Mutationen in den Targetgenen *gyrA*, *gyrB* (Gyrase), *parC* und *parE* (Topoisomerase IV) (108, 105). Darüber hinaus führt auch eine verringerte Akkumulation der Antibiotika in der Zelle (43) zu einer verringerten Antibiotika-Sensibilität. Eine reduzierte Akkumulation kann auf verringertem Einstrom (Influx) des Antibiotikums in die Zelle oder einem erhöhten Ausstrom (Efflux) aus der Zelle beruhen.

1.1 Die Gattung *Salmonella*

In die Gattung *Salmonella* werden stäbchenförmige, etwa 0,7–1,5 x 2,0–5,0 µm große, peritrich begeißelte, gramnegative Bakterien mit fakultativ anaerober Lebensweise eingeteilt. Der Name der Gattung geht auf den US-amerikanischen Veterinärmediziner Daniel E. Salmon zurück, der 1885 die Schweinecholerabakterien *Salmonella Choleraesuis* beschrieb (35). Als sogenannte Typhusbakterien wurden Bakterien der Gattung *Salmonella* erstmals 1880 von Karl J. Eberth beschrieben, der die Mikroorganismen mikroskopisch in Gewebeproben von an Typhus Verstorbenen nachwies. August Gärtner identifizierte Salmonellen 1888 erstmals als Verursacher von Lebensmittelvergiftungen (115).

Die Gattung *Salmonella* gehört systematisch zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Nach der derzeit gültigen Nomenklatur werden innerhalb der Gattung nur die beiden Spezies *S. enterica* und *S. bongori* unterschieden, wobei es unter den Isolaten der Spezies *S. bongori*, im Gegensatz zu denjenigen der Spezies *S. enterica*, weder human- noch tierpathogene Erreger gibt. Die beiden Spezies wiederum werden in diverse Subspezies unterteilt, wobei der überwiegende Teil der *Salmonella*-Stämme der Subspezies *S. enterica* ssp. *enterica* angehört. Eine weitere Differenzierung dieser Subspezies in ca. 2500 Serovare ergibt sich nach dem sogenannten Kauffmann-White-Schema (156) anhand unterschiedlicher Kapsel-, Zellwand- (O-) und Flagella-Antigene (H-Antigene). Üblicherweise wird statt der vollständigen Bezeichnung (z. B. *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Typhimurium) nur die verkürzte Serovarbezeichnung (*Salmonella* Typhimurium) verwendet (37). Einige humanpathogene

Serovare wie Typhimurium, Paratyphi und Enteritidis werden zudem weiter in sogenannte Lysotypen unterteilt. Bei der Lysotypie oder dem *phage typing* werden Bakteriophagen zur Typendifferenzierung eingesetzt. Aufgrund spezifischer Rezeptoren auf der Oberfläche der Bakterien und der Wirtsspezifität der Phagen, sind nur bestimmte Phagen in der Lage bestimmte Bakterienstämme zu lysieren. Auf diese Weise können die zu untersuchenden Isolate nach der Infektion mit Phagen einem bestimmten Phagentyp zugeordnet werden. Als epidemiologisch bedeutsame Lysotypen (*defined phage type*) von *S. Typhimurium* sind z. B. DT 104 sowie DT 204c bekannt (256). Trotz dieser starken Differenzierung wird die Gattung *Salmonella* als genetisch sehr homogen eingestuft.

1.1.1 Bedeutung von *Salmonella* als Krankheitserreger

Die Salmonellose, hervorgerufen durch zur Gattung *Salmonella* gehörende Bakterien, stellt weltweit eine der häufigsten bakteriellen Infektionskrankheiten dar (106, 115, 289). Salmonellosen gehören zu den Zoonosen, da sie vom Tier auf den Menschen übertragbar sind. Zudem ist eine Infektion über kontaminierte Lebensmittel tierischen Ursprungs, insbesondere Fleisch und Fleischprodukte, Geflügel, Eier oder Eiprodukte möglich (153). Präventive Maßnahmen haben daher die Verhinderung einer Übertragung vom Nutztier auf den Menschen zum Ziel.

Grundsätzlich lassen sich die von *Salmonella spec.* ausgelösten Krankheiten in sogenannte enteritische und typhöse Salmonellosen unterscheiden. Bei der enteritischen Salmonellose handelt es sich um eine akute Durchfallerkrankung (Gastroenteritis), die als lebensmittelbedingte Infektion vor allem von den Serovaren *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* ausgelöst wird (106). Die infektiöse Dosis liegt, abhängig von dem Zustand des Immunsystems des Patienten, zwischen 10^3 und 10^6 Keimen (57). Nach der Inkubationszeit, die 5 bis 72 Stunden betragen kann, setzen die Symptome, wie Leibschmerzen und wässriger Stuhl, oft verbunden mit Fieber, Übelkeit und Kopfschmerzen ein. Die Infektion heilt nach wenigen Tagen meist spontan aus und muss in der Regel nicht antibiotisch behandelt werden. Allerdings können bei Risikogruppen, wie Älteren, Kleinkindern oder immunsupprimierten Patienten, schwere Dehydratisierung sowie Allgemeininfektionen hervorgerufen werden. In seltenen Fällen kommt es zu hohem Fieber oder es treten andere Komplikationen auf, die unter Umständen zum Tode führen können. In diesen schweren Fällen werden auch enteritische Salmonellosen mit Antibiotika behandelt.

Eine typhöse Salmonellose nimmt einen deutlich schwereren Verlauf. Die Erreger *S. Typhi* und *S. Paratyphi* lösen in geringer Infektionsdosis (100-1000 Keime) und nach einer Inkubationsdauer von durchschnittlich 10 Tagen die als Typhus bekannte Krankheit aus. Zunächst äußert sich die Infektion durch stufenweise ansteigendes Fieber, Übelkeit,

Kopf- und Gliederschmerzen. Bleibt die Krankheit unbehandelt, so folgt ein bis zu 3 Wochen andauerndes Stadium mit kontinuierlich hohem Fieber, breiartigen Stuhlemlungen und Bewußtseinsbeeinträchtigungen. Eine Infektion des Menschen mit dem Typhus-Erreger erfolgt über die Aufnahme von Wasser oder Lebensmitteln, die durch menschliche Fäkalien verunreinigt sind. Die beste Prophylaxe stellt eine gute Hygiene dar. Die verfügbare Vaccine bietet nur einen Schutz von 60-75 %, mildert im Infektionsfall jedoch den Krankheitsverlauf.

Nach Angaben der WHO treten jährlich weltweit ca. 1,3 Milliarden Fälle von durch enteritische Salmonellen verursachter Diarrhö auf. Etwa 3 Millionen dieser Erkrankungen enden tödlich, wobei die Entwicklungsländer Asiens und Afrikas besonders betroffen sind. Infektionen mit *Salmonella spec.* stellen jedoch auch in industrialisierten Ländern ein erhebliches Problem dar. Aufgrund der großen epidemiologischen und wirtschaftlichen Bedeutung (106, 116) sind die Überwachung und Bekämpfung in Deutschland seuchenrechtlich vorgeschrieben und Erkrankungen unterliegen der Meldepflicht. Die Zahlen der gemeldeten *Salmonella*-Infektionen sind zwar nach Angaben des Robert-Koch-Institutes seit einigen Jahren rückläufig. Mit 52245 gemeldeten Erkrankungen in Deutschland im Jahr 2005 (257) ist diese Infektion jedoch noch immer eine der häufigsten gemeldeten lebensmittelbedingten Infektionskrankheiten. Zu berücksichtigen ist zudem, dass die Dunkelziffer zehnmal höher geschätzt wird.

1.2 Struktur und Wirkung von Fluorchinolonen

Besteht die Notwendigkeit der Behandlung einer Salmonellose mit Antibiotika, so werden in der Regel Fluorchinolone eingesetzt, da diese eine hohe antibakterielle Aktivität gegenüber *Salmonella spec.* sowie gute pharmakokinetische Eigenschaften aufweisen (22, 249).

(Fluor)chinolone sind synthetische, niedermolekulare, antimikrobiell wirksame Substanzen. Grundsätzlich verfügen alle Chinolone über ein Chinolin- oder NaphthyridinGrundgerüst (Nalidixinsäure, Enoxacin und Gemifloxacin), die jeweils am C3-Atom eine Carboxy- und am C4-Atom eine Oxogruppe tragen. Häufig befindet sich am C7-Atom ein Piperazinrest (z. B. bei Norfloxacin und Ciprofloxacin).

1962 wurde Nalidixinsäure (Abb. 1.1) als erster Vertreter der sogenannten 4-Chinolone entdeckt, welche durch Derivatisierung von 7-Chlorochinolin, einem Abfallprodukt bei der Reinigung des Malariamedikamentes Chloroquin entstehen (160). Nalidixinsäure wurde nach der Zulassung zur Behandlung unkomplizierter, durch gramnegative Enterobakterien hervorgerufene, Harnwegsinfekte eingesetzt (110). Zur Verbesserung der antibakteriellen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Chinolone wurden im Laufe der Zeit diverse

Modifikationen der Struktur vorgenommen (95, 321), die sowohl eine Veränderung des Grundgerüsts, als auch eine Variation der Substituenten betrafen. Die neueren Vertreter der Chinolone verfügen in der Regel über ein Chinolingrundgerüst, da es sich für die Variation von Substituenten am besten eignet. Veränderungen sowohl am C3- als auch am C4-Atom führen zum Verlust antimikrobieller Aktivität. Die Substituenten an diesen Positionen sind offenbar essentiell für die Interaktion mit den bakteriellen Zielstrukturen der Chinolone, den Typ II-Topoisomerasen (10). Substitutionen an anderen Positionen erwiesen sich jedoch hinsichtlich der Wirksamkeit, der Verträglichkeit sowie der Bioverfügbarkeit als vorteilhaft. So führte die Einführung eines Fluor-Atoms an C6 (63) zu einer deutlichen Erhöhung der Aktivität gegenüber gramnegativen Bakterien und zu einer verbesserten Aktivität gegenüber einigen grampositiven Erregern wie *Staphylococcus aureus*. Norfloxacin, das 1978 entwickelt wurde, galt als erster Vertreter der sogenannten Fluorchinolone (Abb. 1.1). Durch Substitution eines apolaren Cyclopropylrestes am N1-Atom entstand Ciprofloxacin (Abb. 1.1), welches sich durch eine erhöhte Aktivität gegenüber Enterobakterien und *Pseudomonas aeruginosa* sowie verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften auszeichnet (269).

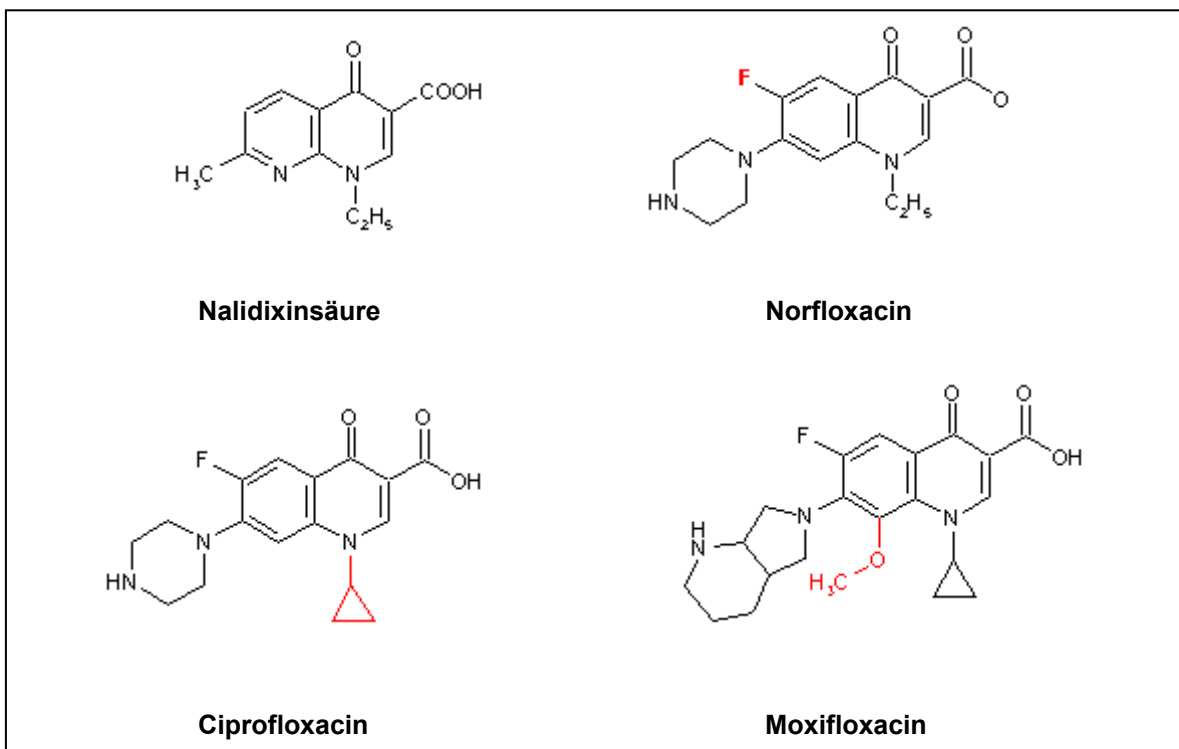


Abb. 1.1: Ausgewählte Vertreter der (Fluor-)Chinolone.

Der Austausch der C7-Piperazingruppe durch einen Azabicyclosubstituenten ((S,S)-2,8-diazabicyclo[4.3.0]non-8-yl bei Moxifloxacin, Abb. 1.1) führte zu einer deutlichen Steigerung der Wirksamkeit gegenüber grampositiven Bakterien. Die Azabicyclogruppe

führt zudem zu einer erhöhten Lipophilie sowie verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften, wie einer deutlich verlängerten Halbwertszeit (19). Substituenten am C8-Atom, wie die Methoxygruppe bei Moxifloxacin, verbessern die orale Verfügbarkeit sowie die Aktivität gegenüber grampositiven und anaeroben Bakterien (2, 29, 324) wie auch gegenüber Problemkeimen wie Mycobakterien (64, 250, 323).

Die Zielstrukturen der (Fluor)chinolone sind die bakteriellen Typ II-Topoisomerasen Gyrase und Topoisomerase IV. Da die Topoisomerasen aufgrund ihrer Funktion, der Aufrechterhaltung der räumlichen Anordnung der DNA (Topologie) in der Zelle, essentiell für das Überleben der Bakterien sind, stellen sie besonders geeignete Zielstrukturen dar. Bei beiden Topoisomerasen handelt es sich um Heterotetramere, die aus jeweils zwei identischen Untereinheiten aufgebaut sind. Die Gyrase besteht aus jeweils zwei Untereinheiten A und B (A_2B_2), die durch die Gene *gyrA* und *gyrB* kodiert werden, wohingegen die Topoisomerase IV aus jeweils zwei Untereinheiten C und E (C_2E_2) aufgebaut ist, die durch die Gene *parC* und *parE* kodiert werden. Die Wirkung der meisten Chinolone auf eukaryontische Zellen ist sehr gering (23, 74). Für die Hemmung eukaryontischer Typ II-Topoisomerasen ist eine bis zu 1000-fach höhere Konzentration der (Fluor)chinolone als für prokaryontische Enzyme notwendig, so dass das Prinzip der selektiven Toxizität gewahrt bleibt.

Chinolone wirken bakterizid auf sich teilende Bakterien mit aktiver Proteinbiosynthese. Die Wirkung der Chinolone beruht auf der Stabilisierung des Gyrase- bzw. Topoisomerase IV-DNA-Komplexes. Während des Reaktionszyklus der Typ II-Topoisomerasen besteht ein Gleichgewicht zwischen der Einführung (Cleavage) und der Religation eines Doppelstrangbruchs (220, 259, 301). Nach Bindung des Chinolons an den DNA-Enzym-Komplex wird das Gleichgewicht in Richtung der Cleavage-Reaktion verschoben. Die Religation der DNA wird verhindert, so dass doppelsträngige Brüche der DNA vorliegen (9). Wie sich die Interaktion zwischen Chinolonen und dem DNA-Enzym-Komplex genau vollzieht, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es existieren jedoch zwei Hypothesen: Nach dem „Modell der kooperativen Bindung“ binden vier oder mehr Chinolon-Moleküle an die, während der DNA-Enzym-Interaktion vorliegende, einzelsträngige DNA (157, 280), während nach dem „positional poison model“ nur ein einziges Chinolon-Molekül mit der DNA interagiert. Durch Bindung der Chinolone an den DNA-Enzym-Komplex entsteht ein stabiler ternärer Komplex (42), der eine Barriere für replikative Helikasen sowie DNA- und RNA-Polymerasen darstellt, so dass essentielle Prozesse wie DNA-Replikation und Transkription nicht mehr stattfinden können (68, 279, 306). Die Hemmung dieser essentiellen Prozesse führt allerdings nur zur Bakteriostase. Am Zelltod ist maßgeblich die durch die DNA-Doppelstrangbrüche ausgelöste SOS-Antwort beteiligt (187, 231). Die Induktion der Gene des SOS-Regulons führt zur Einstellung der Zellteilung und zur

verstärkten Expression von DNA-Reparaturenzymen (122). Kommt es beispielsweise aufgrund von UV-Strahlung zu reparablen Schäden und dadurch zur Induktion der SOS-Antwort, so wird die Expression der SOS-Gene nach Beseitigung des DNA-Schadens wieder reprimiert. Im Falle der Chinolon-Wirkung kommt es jedoch aufgrund der irreparablen Schäden (Cleavage-Komplex) zu einer konstitutiven Induktion des SOS-Systems, die aufgrund des fehlerhaft arbeitenden Reparatursystems zu einer fortschreitenden Mutagenisierung des Genoms führt. Zur Verhinderung der Weitergabe von stark mutagenisierter DNA an die Tochterzellen, wird die Bildung von Autolysinen induziert, die schließlich zum Tod der Bakterienzelle führt (131, 299).

1.3 Resistenzmechanismen gegenüber Fluorchinolonen

Grundsätzlich sind Bakterien in der Lage, Resistenzen gegenüber antimikrobiell wirksamen Substanzen zu entwickeln. Angegeben wird die Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber Antibiotika als minimale Hemmkonzentration. Das Überschreiten eines für eine bestimmte Spezies und ein bestimmtes Antibiotikum angegebenen Grenzwertes, der einen Therapieerfolg verhindert, wird als klinische Resistenz bezeichnet. Unterschieden wird zwischen einer natürlichen und einer erworbenen Resistenz. Bei einer natürlichen Resistenz handelt es sich um die natürliche Unempfindlichkeit einer Spezies gegenüber einem bestimmten Antibiotikum aufgrund der Physiologie des Bakteriums. So ist z. B. die natürliche Unempfindlichkeit von *E. coli* und *Salmonella spec.* gegenüber Makroliden u. a. auf die äußere Membran zurückzuführen, die eine Permeationsbarriere für große Moleküle darstellt (325). Erwerben können Bakterien Resistenzen durch das Auftreten von Mutationen oder den Transfer von Resistenzgenen, wobei verschiedene Mechanismen zur Ausbildung von Resistenzen bestehen.

1. Eine Veränderung der Zielstruktur führt zu einer verringerten Affinität des Antibiotikums zu dem entsprechenden Target.
2. Durch die Aufnahme von Genen, die für das Antibiotikum abbauende oder modifizierende Proteine kodieren, kommt es zu einer enzymatischen Inaktivierung des Wirkstoffes.
3. Eine verringerte Expression von Porinen oder eine erhöhte Expression von Effluxpumpen führt zu einer Verringerung der Konzentration des Antibiotikums am Wirkort.

Hinsichtlich der Resistenzentwicklung gegenüber den Fluorchinolonen sind alle drei Mechanismen beschrieben worden, wobei vorwiegend die Veränderung der Zielstruktur sowie eine verringerte Akkumulation in der Zelle für das Auftreten klinisch resistenter Isolate verantwortlich gemacht werden konnten. Als weitere, erst kürzlich beschriebene

Mechanismen, sind die Plasmid-vermittelte Resistenz durch DNA-imitierende Qnr-Schutzproteine und die enzymatische Inaktivierung von ausgewählten Fluorchinolonen durch eine Acetyltransferase zu nennen. Im Folgenden soll auf die genannten Mechanismen bezüglich der Fluorchinolonresistenz ausführlicher eingegangen werden.

1.3.1 Veränderung der Zielstrukturen

Die Empfindlichkeit eines Bakteriums gegenüber Fluorchinolonen ist abhängig von der Anzahl der gebildeten Komplexe aus DNA, Topoisomerase und Chinolon. Diese Anzahl wird wiederum bestimmt durch die Konzentration des Chemotherapeutikums am Wirkort sowie die Affinität des Chinolons zu der Zielstruktur. Herabgesetzt wird diese Affinität durch Mutationen in den Targetgenen (69). In verschiedenen In-vitro-Selektionsversuchen mit *E. coli* und *Salmonella spec.* wurde nachgewiesen, dass Mutationen in *gyrA*, dem für die A-Untereinheit der Gyrase kodierenden Gen, für eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Chinolonen verantwortlich sind (52, 112, 252, 271). Da im ersten Selektionsschritt dieser Experimente unter Verwendung von Fluorchinolonen ausschließlich *gyrA*-Mutationen auftraten, wurde postuliert, dass die Gyrase die primäre Zielstruktur der Chinolone darstellt. Als sekundäres Target der Chinolone gilt die Topoisomerase IV, da in späteren Selektionsschritten Mutationen in *parC*, dem für die ParC-Untereinheit der Topoisomerase IV kodierenden Gen, auftraten (105, 109). Invers verhält es sich bei grampositiven Bakterien, wie z. B. *Staphylococcus aureus*, wo die Topoisomerase IV, kodiert durch *griA* und *griB*, als primäre und die Gyrase als sekundäre Zielstruktur fungiert (77, 78, 79). Bei *Streptococcus pneumoniae* hingegen ist die primäre Zielstruktur von dem eingesetzten Fluorchinolon abhängig. So findet sich beispielsweise bei der Verwendung von Ciprofloxacin und Norfloxacin in den unempfindlichen In-vitro-Mutanten zuerst eine Mutation in *parC*, während bei der Behandlung mit Sparfloxacin und Gatifloxacin zunächst eine Mutation in *gyrA* auftritt (224, 225).

Mutationen, die zu verringerter Empfindlichkeit gegenüber den Chinolonen führen, treten in bestimmten Genabschnitten, den sogenannten QRDRs (quinolone resistance determining regions) der Targetgene *gyrA*, *gyrB* (Gyrase), *parC* sowie *parE* (Topoisomerase IV) auf. Aus Versuchen zur Selektion resistenter *E. coli*-Stämme wurde die QRDR von *gyrA* zwischen den Aminosäuren 67 und 106 und diejenige von *gyrB* zwischen 426 und 447 definiert (316, 317). Da Mutationen in diesen Bereichen zu einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Chinolonen führen, wird angenommen, dass die QRDR einen Bereich direkter Interaktion zwischen Enzym und Chinolon darstellt (248). Innerhalb der QRDR gibt es wiederum Aminosäurepositionen, an denen sich besonders häufig ein Austausch ereignet, wie an den Positionen 83 und 87 in *gyrA* sowie 80 und 84 in *parC* (25, 50, 98, 111, 117, 140). Die Nummerierung ist hier auf die Gyrase von *E. coli*

bezogen. Zur Ausbildung von klinischer Resistenz gegenüber älteren Chinolonen, wie Nalidixinsäure, ist in der Regel eine einzige Mutation in *gyrA* ausreichend, während für eine klinische Resistenz gegenüber den Fluorchinolonen das Auftreten mehrerer Mutationen, wie der *gyrA*-Doppelmutation an den Positionen 83 und 87, notwendig ist (298).

Die Mutationen in den Targetgenen führen für das Bakterium jedoch nicht nur zu einem Selektionsvorteil in Anwesenheit von Chinolonen, sondern unter Umständen auch zu einer eingeschränkten Enzymaktivität der Gyrase bzw. der Topoisomerase IV. Die aufgrund der Aminosäureaustausche veränderten Enzyme weisen vermutlich eine geringere Affinität zu der DNA auf oder katalysieren die Reaktion mit geringerer Geschwindigkeit, was sich wiederum auf den DNA-Superspiralisierungsgrad auswirkt (17). Durch eine veränderte DNA-Topologie kann dann u. a. die Zugänglichkeit von Promotorregionen bestimmter Gene für die RNA-Polymerase verändert werden, so dass bestimmte Gene stärker exprimiert werden und andere schwächer (118, 213). Mutationen in den Targetgenen der Gyrase und der Topoisomerase IV können sich demnach über einen veränderten DNA-Superspiralisierungsgrad auf die Expression verschiedener anderer Gene auswirken (65).

1.3.2 Enzymatische Inaktivierung

Die enzymatische Inaktivierung von Antibiotika als bakterieller Resistenzmechanismus ist vor allem für die β -Laktam-Antibiotika, die Aminoglykosid-Antibiotika sowie für Chloramphenicol bekannt. In Bezug auf die Fluorchinolone ist ein solcher Mechanismus erst kürzlich von Robicsek et al. (258) beschrieben worden. Bis zu dieser Entdeckung wurde das Auftreten von inaktivierenden Enzymen ausschließlich bei natürlich vorkommenden Antibiotika beobachtet. Als Erklärung dafür galt die wechselseitige Anpassung von antimikrobiell wirksamen Substanzen und den entsprechenden Resistenzmechanismen im Laufe der Evolution. Da die ersten Chinolone erst vor etwa 40 Jahren synthetisch hergestellt wurden, wurde die Koevolution inaktivierender Enzyme als wenig wahrscheinlich angesehen. Robicsek et al. (258) beobachteten jedoch das Auftreten einer mutierten Aminoglykosid-Acetyltransferase in verschiedenen klinischen Isolaten, welche eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin aufwiesen. Aus den Stämmen wurden Plasmide isoliert, die für eine Variante des *aac(6'')-Ib* Gens kodierten. Das veränderte Gen besitzt im Vergleich zu dem herkömmlichen Aminoglykosid-Acetyltransferase-Gen, das für die Resistenz gegenüber den Aminoglykosiden Kanamycin, Amikacin und Tobramycin verantwortlich ist, zwei Mutationen, die zu Aminosäureaustauschen führen (W102R, D179Y). Die Variante dieses Gens wurde *aac(6'')-Ib-cr* (*cr* = *ciprofloxacin resistance*) genannt. *aac(6'')-Ib-cr* wurde

umkloniert und vermittelt in zuvor sensiblen *E. coli*-Stämmen, wie erwartet, Resistenz gegenüber Kanamycin und zudem eine erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin. AAC(6')-Ib-cr führt jedoch nicht zu einer Modifikation aller Fluorchinolone. Angegriffen werden nach Robicsek et al. (258) nur Fluorchinolone wie Ciprofloxacin und Norfloxacin, die am C7-Atom einen unsubstituierten Piperazinrest besitzen, da an dieser Position die N-Acetylierung stattfindet. Diese Acetyltransferase-Variante stellt ein Enzym dar, das zwei Klassen von Antibiotika gleichzeitig modifiziert und auf diese Weise eine Koselektion von Resistenzen ermöglicht.

1.3.3 Plasmid-vermittelte Resistenz (Qnr)

Übertragbare Resistenz gegenüber Fluorchinolonen wurde erstmalig 1998 von Martinez-Martinez et al. (186) beschrieben. Ein Multiresistenz-Plasmid aus ciprofloxacinresistenten klinischen Isolaten von *Klebsiella pneumoniae* vermittelte nach Konjugation in sensible Stämme von *K. pneumoniae* und *E. coli* erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin und Nalidixinsäure. 2002 identifizierten Tran und Jacoby (292) in einer Integron-ähnlichen Umgebung das auf einem Plasmid lokalisierte *qnr*. Nach Überexpression von *qnr* und Aufreinigung des Proteins stellten die Autoren in einem DNA-Gyrase-Assay fest, dass Qnr die Gyrase von *E. coli* vor Inhibition durch Ciprofloxacin *in vitro* schützt. Qnr interagiert mit der Gyrase bevor diese an die DNA bindet, da in Anwesenheit von Qnr eine reduzierte Affinität des Enzyms zu der DNA zu beobachten war (291). Der Mechanismus ähnelt vermutlich dem des aus *Mycobacterium tuberculosis* stammenden MfpA-Proteins, welches die Helixstruktur der DNA imitiert. Die Gyrase bindet an MfpA und nicht an die DNA, wodurch sie vor der Inhibition durch die Chinolone geschützt ist (107). So werden Gyrase-Moleküle, die nach Interaktion mit der DNA als Angriffspunkte für die Chinolone zur Verfügung stünden, durch die Bindung an Qnr austitriert und stehen als Zielstruktur nicht mehr bereit. Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für den Schutz der Topoisomerase IV durch Qnr beschrieben worden (293).

Verschiedene Varianten des Qnr-Proteins wurden mittlerweile in vielen Enterobakterien beschrieben, wie QnrA in *K. pneumoniae* (292), QnrB in *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae* und *E. coli* (135) und QnrS in *Enterobacter cloacae* (236). In *Salmonella enterica* wurden mittels PCR die Gene *qnrB* und *qnrS* nachgewiesen (87).

Sowohl der Schutz der Gyrase mittels Qnr-Proteinen, als auch der zuvor beschriebene Resistenzmechanismus der enzymatischen Inaktivierung, führt zwar nur zu einer leichten Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen, begünstigt aber, aufgrund der verlängerten Überlebensfähigkeit der Mikroorganismen bei erhöhten Fluorchinolone-Konzentrationen, die Entwicklung von Mutanten, die Mutationen in den Targetgenen tragen und dadurch eine höhere Resistenz erreichen. Da Qnr plasmidkodiert auf einem

Multiresistenz-Plasmid vorliegt, werden neben der verringerten Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen zusätzlich Resistenzen gegenüber anderen Antibiotika wie β -Laktamen, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfonamiden und Trimethoprim vermittelt. Eine große Gefahr liegt daher zusätzlich in der Entwicklung multiresistenter Keime, was von Martinez-Martinez et al. (185) bereits *in vitro* gezeigt wurde.

1.3.4 Verringerung der Akkumulation

Neben dem Erwerb von Punktmutationen in den für die Gyrase und die Topoisomerase IV kodierenden Genen, stellt die Verringerung der intrazellulären Antibiotika-Konzentration hinsichtlich der Fluorchinolon-Resistenz in *Salmonella spec.* den bedeutsamsten Resistenzmechanismus dar. Eine Verringerung der Akkumulation beruht auf einem erhöhten Ausstrom (Efflux) des Antibiotikums aus der Zelle und/oder einem verringerten Einstrom (Influx) in die Zelle. Auf die bakteriellen Effluxsysteme sowie ihre Regulation wird in den Abschnitten 1.4 sowie 1.5 ausführlich eingegangen.

Ein verringerter Influx beruht hauptsächlich auf einer Reduktion von Porinen. Bei gramnegativen Bakterien stellt neben der Cytoplasmamembran und der Zellwand die äußere Membran eine Barriere für eindringende Substanzen dar. Lipophile Moleküle wie Nalidixinsäure gelangen zu einem großen Teil mittels Diffusion direkt durch die Lipidschicht der Membranen (123). Hydrophile Substanzen, wie Norfloxacin und Ciprofloxacin, hingegen sind auf den Weg durch Porine angewiesen. Bei Porinen handelt es sich um wassergefüllte Transmembrankanäle, durch die kleinere Moleküle und Ionen hindurch diffundieren können. In *E. coli* ist eine Reduktion des Porins OmpF (outer membrane protein) vielfach mit einer erniedrigten Antibiotika-Empfindlichkeit in Verbindung gebracht worden (54, 124, 130, 193). Zur exakten Anpassung der Porin-Expression an die vorherrschenden Umweltbedingungen, wie z. B. das Nährstoffangebot, unterliegt jene einer strikten Kontrolle. Die Regulation der OmpF-Expression findet sowohl über den Regulator OmpR als auch auf posttranskriptionaler Ebene über die *micF* antisense-RNA statt (8). Durch Anlagerung der *micF*-RNA an die *ompF*-mRNA bildet sich ein RNA-Doppelstrang, so dass die Translation von *ompF* nicht mehr möglich ist. Die Expression von *micF* wird, wie auch die Expression vieler Effluxpumpengene, über den globalen Regulator MarA (siehe 1.5.2.1) gesteuert. Bei konstitutiver Expression von *micF* wird die Translation der *ompF*-mRNA vollständig unterbunden was zu einem Verlust der OmpF-Porine in der äußeren Membran führt (60, 129). Der daraus resultierende verminderte Influx von Antibiotika führt zu einer erhöhten Unempfindlichkeit der Zelle gegenüber verschiedenen antimikrobiell wirksamen Substanzen (56).

1.4 **multiple drug resistance (mdr) Effluxsysteme**

Eine verringerte Konzentration eines Antibiotikums am Wirkort führt zu einer erhöhten Unempfindlichkeit gegenüber der antimikrobiell wirksamen Substanz. Neben einer verringerten Expression von Porinen, die zu einem herabgesetzten Influx des Antibiotikums führt, ist vor allem ein erhöhter Efflux durch eine gesteigerte Expression von Effluxpumpen für die erniedrigte Empfindlichkeit gegenüber dem Antibiotikum verantwortlich. Die erhöhte Expression von Effluxpumpen ist auf die Inaktivierung lokaler Repressoren durch z. B. induzierende Substanzen oder Mutationen in den Repressorgenen zurückzuführen. Zudem nehmen globale Regulatoren Einfluss auf die Expression von Effluxpumpen. Auf die Regulation der Expression von Effluxsystemen, sowohl durch lokale als auch durch globale Regulatoren, wird in Abschnitt 1.5 ausführlich eingegangen.

Natürlicherweise spielen Effluxsysteme für enterische Bakterien eine bedeutende Rolle bei der Besiedelung ihrer verschiedenen Habitate, darunter des mammalen und aviären Gastrointestinaltraktes. Die natürliche Umgebung enterischer pathogener Mikroorganismen, wie *Salmonella spec.*, ist reich an Gallensalzen und Fettsäuren, so dass angenommen wird, dass physiologische Funktionen aktiver Effluxsysteme sowohl die Sekretion intrazellulärer Metabolite als auch der Schutz gegenüber diversen cytotoxischen Substanzen sind. Für Mutanten von *E. coli*, *S. Typhimurium* und *Campylobacter jejuni*, denen Komponenten der AcrAB-TolC- bzw. der CmeABC-Effluxpumpe fehlen, konnte Hypersensibilität gegenüber Gallensalzen festgestellt werden. Mutanten, die diese Effluxpumpen überexprimieren weisen hingegen deutliche Unempfindlichkeiten gegenüber Gallensalzen auf (28, 154, 164, 244, 288). Daraus wurde abgeleitet, dass die Hauptfunktion der *E. coli* bzw. der *Salmonella spec.* AcrAB-TolC- und der *C. jejuni* CmeABC-Effluxpumpe darin besteht, das Überleben enterischer Bakterien in der Gegenwart von Gallensalzen zu ermöglichen (165, 174). Die Induktion der AcrAB-TolC-Effluxpumpe mittels Gallensalzen findet in *E. coli* über den globalen Regulator Rob statt (261). Die Autoren beobachteten zudem in Anwesenheit von Gallensalzen eine erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika, die auf die verstärkte Expression von AcrAB-TolC zurückzuführen war. Prouty et al. (243) beobachteten bei *S. Typhimurium* in Anwesenheit von Gallensalzen eine Expressionssteigerung des globalen Aktivators MarA sowie von AcrAB.

Zudem wird den Effluxsystemen eine Rolle hinsichtlich der Pathogenität zugeschrieben. Mutanten von *S. Enteritidis*, denen das *outer membrane* Protein TolC, das einen wichtigen Bestandteil vieler RND-Effluxpumpen (siehe 1.4.1) darstellt, fehlt zeigten Avirulenz gegenüber Mäusen (283). Hirakata und Mitarbeiter (125) folgerten, dass die MexAB-OprM-Effluxpumpe von *Pseudomonas aeruginosa* Virulenzfaktoren exportiert. Die

Bedeutung der AcrAB-TolC-Effluxpumpe von *S. Typhimurium* für die Kolonisation des Gastrointestinaltraktes des Huhns wurde kürzlich demonstriert. TolC-defiziente Stämme der Lysotypen DT104 und DT204 waren nicht mehr in der Lage Blinddarm, Milz oder Leber zu besiedeln (26). Buckley et al. (40) zeigten, dass Stämme von *S. Typhimurium*, denen AcrB oder TolC fehlten, den Hühnerdarm nur sehr schlecht kolonisierten, während eine Disruption der Effluxpumpengene *acrF* und *acrD* zu keiner Einbuße hinsichtlich der Besiedelungsfähigkeit führte.

Die natürliche Funktion von Effluxpumpen besteht demnach in der Vermittlung von Schutz gegenüber schädlichen Substanzen in der natürlichen Umgebung enterischer Bakterien. Zudem haben Effluxpumpen eine große Bedeutung hinsichtlich Kolonisation und Virulenz.

1.4.1 Klassifizierung und Organisation von Effluxpumpen

Neben Effluxpumpen mit hoher Substratspezifität, wie beispielsweise Tetracyclin-Pumpen (191) transportieren sogenannte *multidrug efflux* (mde) Transporter ein breites Spektrum strukturell sehr unterschiedlicher Substanzen. Grundsätzlich werden, aufgrund der für den Transport verwendeten Energiequelle, zwei Gruppen von Effluxpumpen unterschieden. Pumpen, welche die benötigte Energie durch die Hydrolyse von ATP gewinnen gehören der ABC-Superfamilie (*ATP-binding cassette*) an (126, 155, 235). Transporter, die dieser Familie angehören sind vor allem für eukaryontische Zellen und für grampositive Bakterien von Bedeutung. Die zweite Gruppe von Effluxpumpen bezieht ihre Energie aus der Kopplung des Transporters an den transmembranen Protonengradienten (226, 227). Innerhalb dieser Gruppe werden die Effluxpumpen in vier Familien unterteilt: die RND-Familie (*resistance nodulation cell division*), die MFS-Familie (*major facilitator superfamily*), die MATE-Familie (*multidrug and toxic compound extrusion*) sowie die SMR-Familie (*small multidrug resistance*) (siehe Abb. 1.2). Im Folgenden werden die einzelnen Familien, am Beispiel für diese Arbeit relevanter Vertreter hinsichtlich ihres Aufbaus, ihrer Struktur und ihres Substratspektrums vorgestellt.

Der RND-Familie gehören die meisten mde-Transporter der gramnegativen Bakterien an. Effluxpumpen dieser Familie bestehen aus drei Teilen (171): dem in der Cytoplasmamembran lokalisierten Transporter, einem Porin in der äußeren Membran und einem Membranfusionsprotein, das über den periplasmatischen Raum die Verbindung zwischen Pumpe und Porin herstellt. Am Beispiel der in *E. coli* und *Salmonella spec.* bei der Entwicklung klinischer Resistenz bedeutsamen Effluxpumpe AcrAB-TolC (174, 208, 216) sollen nun die Struktur und die Funktion der RND-Pumpen näher erläutert werden. Mit Hilfe der Kristallographie konnten die Strukturen der Pumpen-Komponenten aufgeklärt werden (119, 146, 199).

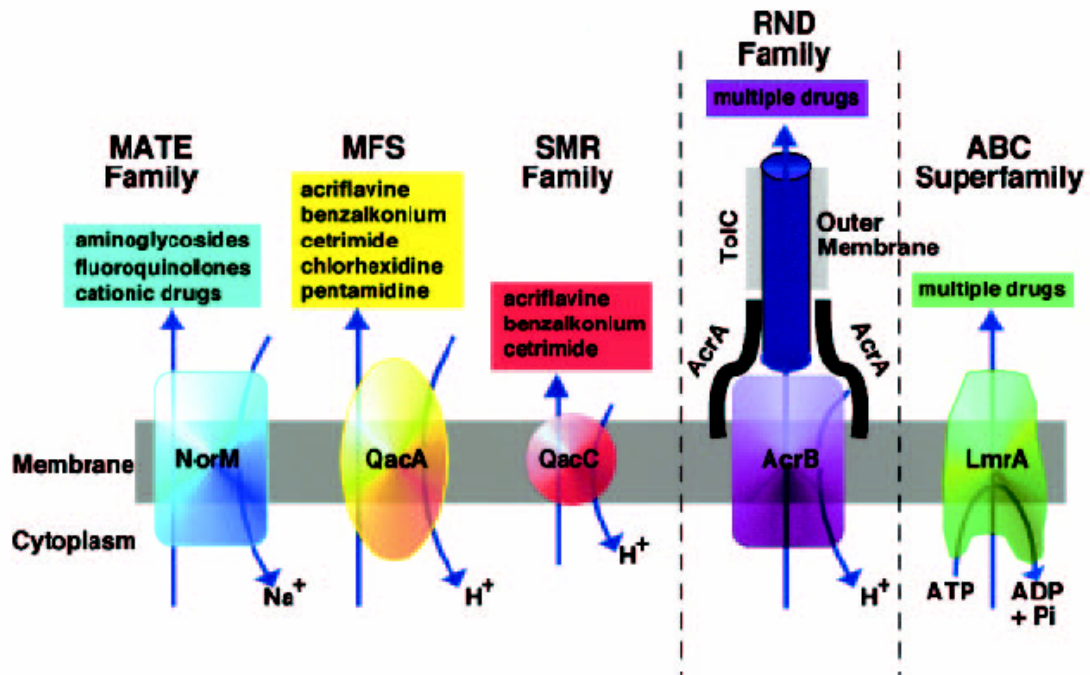


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der verschiedenen Familien von Effluxpumpen (aus (232)).

Die funktionale Einheit des Transporters AcrB ist ein Homotrimer mit je 12 membrandurchspannenden α -Helices und einer großen periplasmatischen Kopfdomäne, die sich trichterförmig erweitert. Dieser Bereich interagiert mit TolC und wird daher auch TolC-Anlagerungsbereich genannt (siehe Abb. 1.3). In Richtung der Cytoplasmamembran befindet sich der eigentliche Porenbereich, der von drei α -Helices gebildet wird. Im Bereich nahe der Cytoplasmamembran öffnet sich AcrB über drei, jeweils zwischen den Protomeren gelegene Vestibüle leicht gegenüber dem Periplasma. Die Struktur der Effluxpumpe lässt annehmen, dass die Substrate entweder vom Cytoplasma über die Membran transportiert werden und/oder direkt vom Periplasma über die Vestibüle in die Pumpe gelangen (3). In beiden Fällen werden die Substrate dann aktiv durch TolC ins Medium transportiert (siehe Abb. 1.3). Die transmembrane Region von AcrB enthält drei funktional essentielle Aminosäurereste (Asp 407, Asp 480, Lys 940) (199). Werden diese Reste durch andere ersetzt, so zeigen die Mutanten erhöhte Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika. Es wird angenommen, dass nach Bindung des Substrates ein Proton an einen sauren Rest (wie Asp 407 oder Asp 480) in der transmembranen Domäne bindet. Die dadurch ausgelösten Konformationsänderungen führen dann zur Exkretion des Substrates (284). Der Export der Substrate geschieht nach Murakami et al. (198) mittels eines Rotationsmechanismus in drei Schritten, in dem die Substrate verschiedene Bindungen mit dem Transporter eingehen.

Hinsichtlich der Substraterkennung spielt die periplasmatische Kopfdomäne von AcrB offenbar eine wichtige Rolle. Elkins und Nikaido (72) konnten zeigen, dass die Substratspezifitäten der RND-Transporter AcrB und AcrD durch Auswechseln bestimmter Bereiche der periplasmatischen Schleifen geändert werden konnten. Um die Substratbindung zu untersuchen, wurde AcrB mit verschiedenen Substraten kokristallisiert und die 3D-Strukturen dieser Komplexe wurden bestimmt (319). Alle Substrate zeigten Bindung in einer großen Aushöhlung im zentralen Bereich des AcrB-Trimers, jedoch interagierten jede Substanz mit einer unterschiedlichen Gruppe von Aminosäuren. Die Bindungen zwischen den Substraten und dem Transporter waren auf hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen sowie auf van der Waals-Kräfte zurückzuführen. Gezeigt werden konnte auch, dass eine simultane Bindung verschiedener Substrate möglich ist (71).

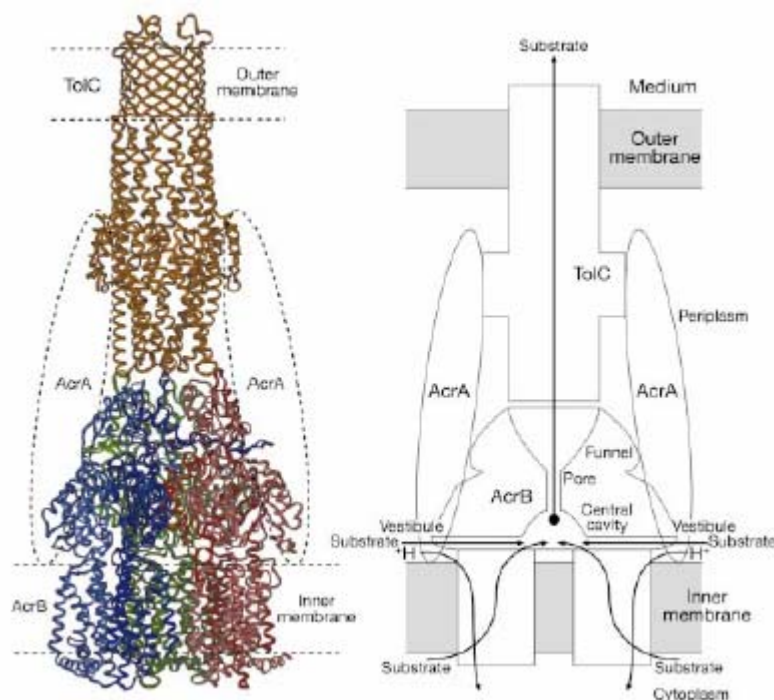


Abb. 1.3: Modell des AcrA-AcrB-TolC-Komplexes sowie schematischer Mechanismus des Substrat-Exports durch AcrAB-TolC (aus (199)).

Die funktionale Einheit des TolC-Proteins ist ebenfalls ein Homotrimer mit einem langen Tunnelbereich, der sowohl die äußere Membran als auch den periplasmatischen Raum durchspannt. Der periplasmatische Bereich besteht aus drei Monomeren, die jeweils aus vier α -barrels aufgebaut sind. Die Region, die die äußere Membran durchspannt, besteht strukturell ebenfalls aus drei Monomeren, die sich jeweils aus vier β -barrels zusammensetzen. Der periplasmatische Eingang ist solange

geschlossen, bis durch Rekrutierung Substrat-spezifischer Translokasen in der inneren Membran das Öffnen ausgelöst wird (142). Die Autoren postulieren ein Modell, nach dem sich die Öffnung von TolC durch eine blendenartige Umordnung der Helices im Eingangsbereich vollzieht. Das Schließen wird vermutlich durch die Ausbildung intra- und intermonomerer Wasserstoffbrücken- und Ionenbindungen gewährleistet (34). TolC fungiert als allgemeiner, bakterieller Ausgang für antimikrobiell wirksame Substanzen und Proteine und interagiert nicht nur mit AcrAB, sondern auch mit anderen mde-Transportern wie AcrEF und YegMNO sowie z. B. mit HlyBD, worüber der Export des Hämolytins (HlyA) in *E. coli* stattfindet (142).

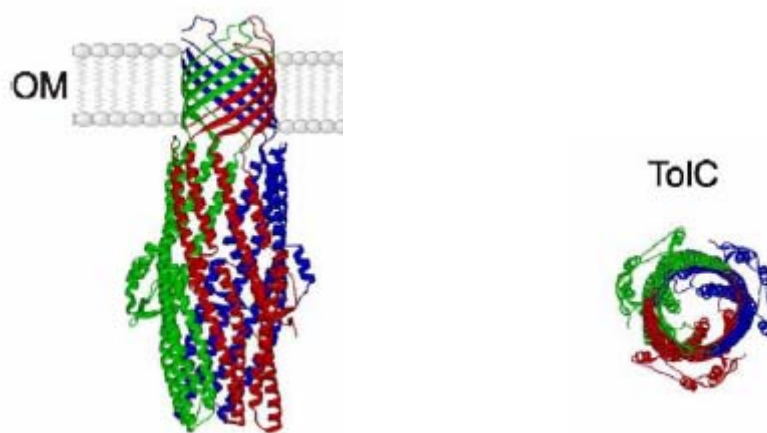


Abb. 1.4: Struktur von TolC aus *E. coli*. Die linke Darstellung zeigt einen Querschnitt durch die äußere Membran (OM). Rechts ist das Membranprotein in Aufsicht auf die Lipiddoppelschicht zu sehen. Die verschiedenen Farben verdeutlichen die Protomere (aus (142)).

Bei AcrA, dem sogenannten Membranfusionsprotein, handelt es sich um ein längliches, asymmetrisches Lipoprotein, das den periplasmatischen Raum durchspannt und den Kontakt von AcrB und TolC verstärkt (16, 320). Dieses geschieht vermutlich durch Zusammenziehen der inneren und äußeren Membran durch AcrA (320).

Es wird von *multidrug* Effluxpumpen gesprochen, wenn diese verringerte Empfindlichkeit gegenüber wenigstens drei verschiedenen Klassen von Antibiotika, Desinfektionsmitteln, Farbstoffen und Detergenzien vermitteln. Die minimalen Hemmkonzentrationen dieser Substrate für Stämme, die eine Effluxpumpe überexprimieren, liegen in der Regel zwei- bis achtfach höher als diejenigen für einen empfindlichen Stamm (232). Diese Verringerung der Empfindlichkeit führt zwar häufig nicht zu klinischer Resistenz, begünstigt jedoch die Entstehung anderer Mutationen, z. B. in den Topoisomerase-Genen hinsichtlich der Fluorchinolon-Resistenz, die dann zu einem hochresistenten Phänotyp führen können.

Die AcrAB-TolC *multiple drug resistance* Effluxpumpe vermittelt in *S. Typhimurium* erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber Gallensalzen, Fettsäuren, SDS, Triton X-100,

Kristalviolett, Acriflavinen, Novobiocin, Rifampicin, Tetracyclin, Chloramphenicol, β -Laktamen, Nalidixinsäure und Fluorchinolonen (238). Das Substratspektrum in *E. coli* ist nahezu identisch.

Die Gene, die für dreiteilige RND-Effluxpumpen kodieren, unterliegen einer gemeinsamen Kontrolle (siehe 1.5) und sind zumindest teilweise in einem Operon organisiert. So werden *acrA* und *acrB* gemeinsam transkribiert, wohingegen sich *tolC* an einem anderen Genlocus befindet. Diese Organisation erscheint sinnvoll, da TolC als *outer membrane* Protein mit verschiedenen in der Cytoplasmamembran lokalisierten Komponenten interagiert.

Die verschiedenen Effluxpumpen der RND-Familie weisen sowohl untereinander als auch zwischen unterschiedlichen Spezies hohe Homologien auf (119). Neben AcrAB-TolC spielen AcrEF-TolC und YegMNO-TolC in *E. coli* und in *Salmonella spec.* eine große Rolle bei der Resistenzentwicklung. Die Sequenzhomologie zwischen AcrEF und AcrAB beträgt etwa 90 % (70) und auch das Substratspektrum überschneidet sich überwiegend. Für *E. coli* sind Fluorchinolone, Tetracyclin, Trimethoprim, Linezolid, Makrolide, Gallensalze, SDS, Acriflavine, β -Laktame u. a. als Substrate beschrieben worden (238).

Die RND-Effluxpumpe YegMNO-TolC unterscheidet sich im Aufbau etwas von den zuvor beschriebenen Pumpen. YegM stellt, homolog zu AcrA und AcrE, das Membranfusionsprotein dar, während YegN und YegO als Heterodimer den Transporter in der Cytoplasmamembran bilden. Die Gene *yegM*, *yegN* und *yegO* sind zusammen mit *yegB*, welches für einen Transporter der MFS-Familie kodiert, in einem Operon organisiert. Als Substrate der YegMNO-TolC-Effluxpumpe sind für *E. coli* Novobiocin, β -Laktame, Gallensalze und SDS beschrieben worden (20, 204, 209).

Effluxpumpen, die der MFS-Familie (*multi facilitator superfamily*) angehören, werden unterteilt in solche, die über 12, und solche, die über 14 transmembrane Segmente (TMS) verfügen (229). Grundsätzlich wurde beobachtet, dass die Aminosäure-Sequenzhomologien der Transporter innerhalb der Familie im N-terminalen Bereich deutlich größer sind als im C-terminalen Bereich. Daher wird angenommen, dass die C-terminalen Bereiche von MFS-Transportern an der Bestimmung der Substratspezifität beteiligt sind, während die N-terminalen Regionen primär für die Energieversorgung des Transportes verantwortlich sind (96).

Zu der 12-TMS-Gruppe gehört z. B. NorA von *Staphylococcus aureus*, welche zuerst in einem Chinolon- und Methicillin-resistenten klinischen Isolat beschrieben wurde (295). Das in *E. coli* und *Salmonella spec.* auftretende EmrB-Protein gehört hingegen zu der 14-TMS-Gruppe. Das *emrB* Gen ist in einem Operon mit *emrA* organisiert, bei dem es sich um ein Membranfusionsprotein handelt (169). EmrA verfügt über ein TMS und eine lange C-terminale periplasmatische Domäne und stellt eine Verbindung zwischen der inneren

und der äußeren Membran her. Studien von Borges-Walmsley et al. (33) haben gezeigt, dass EmrA die Fähigkeit hat, Substrate von EmrB zu binden. Diese Experimente gaben den Hinweis, dass Membranfusionsproteine auch eine direkte Rolle bei der Translokation der Substrate über den periplasmatischen Raum spielen könnten. Im Gegensatz zu AcrA ist EmrA über die transmembrane Helix in der Cytoplasmamembran verankert (142). EmrAB interagiert ebenfalls mit TolC als *outer membrane* Protein. Nach verstärkter Expression vermittelt EmrAB-TolC erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber hydrophoben Entkopplern und antimikrobiell wirksamen Substanzen wie Nalidixinsäure und Thiolactomycin (82, 161, 169). Viele *multidrug* Transporter der MFS- und auch der SMR-Familie besitzen saure Aminosäurereste an einer ähnlichen Position in Helix 1. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass ein ähnlicher Mechanismus bei der Erkennung der Substrate von Bedeutung ist (34).

Effluxpumpen, die der MATE-Familie (*multidrug and toxic compound extrusion*) angehören beziehen die für den Transport notwendige Energie aus der Kopplung an den Influx von Na⁺-Ionen (45, 265). Hinsichtlich der Größe sind MATE-Transporter mit Effluxpumpen der MFS-Familie vergleichbar. Sie bestehen aus etwa 450 Aminosäuren und zeichnen sich durch 12 transmembrane Helices aus. Sie weisen jedoch keinerlei Sequenzhomologie zu den Transportern der MFS-Familie auf (134). Diese jüngste Familie der Effluxpumpen wurde erst 1998 von Morita et al. (195), mit der Charakterisierung von NorM, einem *multidrug* Na⁺-Antiporter aus *Vibrio parahaemolyticus* beschrieben. Im Gegensatz zu den RND-Pumpen transportieren die MATE-Transporter die Substrate nur über die Cytoplasmamembran in den periplasmatischen Raum. Von dort diffundieren sie über Porine in das Außenmedium oder gelangen möglicherweise über die Vestibüle eines RND-Transporters, wie AcrB, und ein gekoppeltes *outer membrane* Protein, wie TolC, über die äußere Membran.

Die in *E. coli* und *Salmonella* spec. vorkommende MATE-Effluxpumpe YdhE vermittelt erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber Norfloxacin, Ciprofloxacin, Aminoglykosiden und Acriflavinen (238).

Transporter, die der SMR-Familie (*small multidrug resistance*) angehören, sind mit durchschnittlich 100 Aminosäuren erheblich kleiner als Effluxpumpen der schon besprochenen Familien. Transporter der SMR-Familie bestehen aus vier transmembranen α -Helices (230). Die am besten charakterisierte Pumpe der SMR-Familie ist EmrE aus *E. coli*, die zu erhöhter Resistenz gegenüber Ethidiumbromid, Acridinen, Methylviologen, Tetracyclinen u. a. beiträgt (238, 275, 314, 315). Drei Monomere lagern sich vermutlich zu einem funktionalen Komplex zusammen, so dass die Tertiärstruktur derer der MFS-Transporter ähnelt (202, 264). Aufgrund verschiedener Experimente wurde angenommen, dass EmrE die Substrate über einen hydrophoben Weg transportiert (194). Wie die

Transporter der MATE-Familie, so transportieren auch die SMR-Pumpen die Substrate nur in den periplasmatischen Raum von wo aus sie über Porine oder RND-Transporter in das Außenmedium gelangen.

1.5 Regulation von Effluxpumpen

Die Expression von Effluxpumpen unterliegt einer strikten Kontrolle. Eine genaue Anpassung der Expression an die Umweltbedingungen des Bakteriums ist sehr wichtig, da eine konstitutive Expression von Effluxpumpen einen unnötigen energetischen Aufwand für die Zelle bedeutete und möglicherweise zudem zum Export wichtiger Nährstoffe und Metabolite führte (114). Die Regulation der Expression geschieht durch lokale und globale Regulatoren.

1.5.1 Lokale Regulatoren

Die meisten RND-Effluxpumpengene sind, wie bereits beschrieben, in einem Operon, unter der Kontrolle eines lokalen Repressors organisiert, der in der Regel vom TetR-Typ ist. So werden z. B. die Gene *acrA* und *acrB* in *E. coli* und *Salmonella* spec. unter der Kontrolle des Repressors *acrR* kotranskribiert (216), während sich die Gene *acrE* und *acrF* unter der Kontrolle des Regulators *acrS* befinden (162).

Das Gen *acrR* ist direkt benachbart zu *acrA*, wird jedoch in die entgegengesetzte Richtung transkribiert. AcrR verfügt über ein *helix-turn-helix* Motiv, das N-terminal lokalisiert ist (223) und fungiert nach Ma et al. (172) als sekundärer Regulator, welcher der Feinabstimmung der *acrAB*-Transkription dient und eine unerwünschte Überexpression von *acrAB* verhindert. Allgemeine Stressbedingungen, wie erhöhte Ethanol- oder NaCl-Konzentrationen, führen zu einer verstärkten Expression von *acrAB* (174). Interessanterweise führen diese Bedingungen ebenfalls zu einer erhöhten Expression des lokalen Repressorgens *acrR* (172). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass die stressinduzierte Transkription von *acrAB* vorwiegend durch globale Regulatoren vermittelt wird und dass die Hauptfunktion von AcrR in der Verhinderung einer exzessiven Pumpenexpression besteht.

Vielfach wurde bereits beobachtet, dass Mutationen in *acrR* in klinischen Isolaten von *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Haemophilus influenza* und *Enterobacter aerogenes* zu einer erhöhten Expression der Effluxpumpengene *acrAB* und damit zu einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika führen (139, 218, 242, 300, 302, 303). Ein Vergleich der Mutationen in den lokalen Repressorgenen verschiedener gramnegativer Spezies zeigte, dass die Mehrheit der

Aminosäuresubstitutionen in der *helix-turn-helix* Domäne des Proteins liegt, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist. Große Deletionen in *acrR*, die zur Inaktivierung des Repressors führen, wurden ebenfalls beobachtet. Darüber hinaus beschrieben Jellen-Ritter und Kern (138) in *E. coli* die Inaktivierung von *acrR* durch Insertion des Insertionselementes IS186.

Die Funktion des lokalen Regulators AcrS, unter dessen Kontrolle die Effluxpumpengene *acrE* und *acrF* stehen, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Trotz struktureller Ähnlichkeiten zu AcrR, dem Repressor der Gene *acrA* und *acrB* ist die Funktion von AcrS möglicherweise eine andere. Olliver et al. (219) beobachteten nach Deletion von *acrS* in *S. Typhimurium* DT204 weder eine Überexpression von *acrE* und *acrF* noch eine veränderte Antibiotika-Empfindlichkeit. Eine erhöhte Expression der Effluxpumpengene *acrE* und *acrF* sowie eine damit verbundene gesteigerte Unempfindlichkeit der *Salmonella*-Stämme gegenüber verschiedenen Antibiotika wurde allerdings nach Insertion der IS-Elemente IS1 und IS10 stromaufwärts der Strukturgene beobachtet (219). Die erhöhte Expression von *acrE* und *acrF* in diesem Fall ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die IS-Elemente Promotorstrukturen tragen, die eine effizientere Transkription der Effluxpumpengene ermöglichen. Ähnliches wurde schon von einer anderen Arbeitsgruppe beobachtet, die ebenfalls eine erhöhte Expression von *acrEF* als Folge einer Insertion des IS2 stromaufwärts der Effluxpumpengene beschrieb (138).

Die Gene *emrR*, *emrA* und *emrB* sind in *E. coli* ebenfalls in einem Operon organisiert und werden in derselben Richtung transkribiert (170). Die Überexpression des lokalen Regulorgens *emrR* führt zu einer reduzierten Transkription des *emr*-Locus, wohingegen eine Mutation in *emrR* zu einer Überexpression der Effluxpumpengene *emrAB* und damit zu einer verringerten Empfindlichkeit der Zelle gegenüber verschiedenen Antibiotika führt (170). Der lokale Regulator EmrR reprimiert die Expression der Effluxpumpengene *emrA* und *emrB* durch Bindung an die Promotorregion der Strukturgene. Induziert wird die Expression der Pumpengene durch strukturell unterschiedliche Substrate der Pumpe, wie Dinitrophenol, Salicylsäure und Nalidixinsäure, die mit dem Repressor interagieren, wodurch die Repression der *emrAB*-Transkription aufgehoben wird. Zur Inaktivierung eines Repressor-Dimers ist nach Brooun et al. (38) ein Ligand notwendig.

1.5.2 Globale Regulatoren

1.5.2.1 Das *marRAB*-Operon

Einer der am besten untersuchten globalen Regulatoren in *E. coli* ist MarA, der u. a. die Expression der Effluxpumpengene *acrAB-to/C* reguliert (5). Der *mar*-Locus besteht aus dem *marRAB*-Operon und dem divergent transkribierten Gen *marC*, welches wie auch

marB für ein Protein unbekannter Funktion kodiert (5). Die intrazelluläre Konzentration des globalen Aktivators MarA wird durch MarR reguliert. Sowohl MarR als auch MarA binden an die Operatorregion *marO*, die zwischen *marRAB* und *marC* lokalisiert ist. MarA, welcher der XylS/AraC-Familie der Transkriptionsaktivatoren zugeordnet wird, aktiviert die eigene Transkription und diejenige einer großen Gruppe von Genen, die dem *mar*-Regulon angehören. Die Aktivierung geschieht durch Bindung an sogenannte *marboxes*, bei denen es sich um DNA-Sequenzen von etwa 20 Basenpaaren handelt, die sich in der Nähe der Promotoren der entsprechenden Gene befinden. Teile des *mar*-Regulons sind z. B. *acrAB* und *tolC*, die über *marboxes* in Promotornähe verfügen (5, 11). Genarray-Experimente eines Stammes, der MarA konstitutiv exprimiert zeigten, dass in *E. coli* mehr als 60 Gene durch MarA reguliert werden (21). Ein gut untersuchtes Beispiel stellt die Aktivierung der Transkription von *micF* durch MarA dar (60). *micF* kodiert für eine antisense-RNA, welche die Translation der *ompF*-mRNA, wie bereits oben beschrieben, durch komplementäre Bindung verhindert.

MarA bindet als Monomer an die degenerierten 20 bp-*marbox*-Sequenzen, die asymmetrisch sind und keine der für bakterielle Regulationssequenzen charakteristischen direkten oder invertierten Wiederholungsbereiche aufweisen. MarA und auch der nah verwandte globale Regulator SoxS, auf den später noch genauer eingegangen wird, sind zudem deutlich kleiner als andere Aktivatoren der XylS/AraC-Familie, da sie über keine Domäne zur Bindung von Liganden verfügen (183). MarA besitzt zwei getrennte *helix-turn-helix*(HTH)-DNA-Bindedomänen, die über eine lange α -Helix verbunden sind (253). Auch dieses Merkmal ist ungewöhnlich für bakterielle Transkriptionsaktivatoren. Gewöhnlich bindet ein Regulator als Dimer an die DNA, da ein typisches HTH-Motiv nur 6 bp erkennt. Um jedoch zu verhindern, dass ein Regulator willkürlich im bakteriellen Genom bindet, ist eine Operatorsequenz von 11-12 bp erforderlich (282). Bei MarA erklärt das Vorhandensein von zwei HTH-Motiven in einer Polypeptidkette die Fähigkeit des Aktivators als Monomer zu funktionieren. Zur Erleichterung der Bindung zweier HTH-Domänen an benachbarte Furchen der DNA ist die DNA im Bereich der *marbox* um etwa 35 ° gekrümmt (253) (siehe Abb. 1.5). Die Orientierungen von *marboxes* und ihre Abstände zu den Promotorbereichen variieren, sind jedoch entscheidend für die effiziente Ausbildung der ternären Komplexe aus MarA, RNA-Polymerase und DNA (179). Martin et al. (178) erbrachten den Beweis, dass sich zunächst ein Komplex aus MarA und RNA-Polymerase bildet, der das Genom dann effizienter nach *marboxes* in Promotornähe absucht als der Aktivator oder die Polymerase alleine.

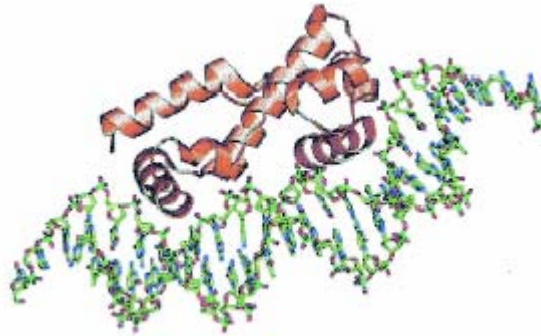


Abb. 1.5: Struktur von MarA während der Bindung an die *marRAB-marbox*. Die HTH-Domänen sind in dunkelbraun dargestellt. Deutlich wird die charakteristische Krümmung, die der Aktivator im *marRAB*-Promotorbereich induziert, um die Bindung beider HTH-Motive zu ermöglichen (aus (101)).

Der Repressor MarR kontrolliert die intrazelluläre Konzentration von MarA. Wie MarA, so bindet auch MarR innerhalb der Promotorregion *marO*, wenn auch an andere Sequenzen als an die *marboxes*, wobei jedoch ein gewisses Maß an kompetitiver Bindung existiert (181). MarR reprimiert die Transkription von *marRAB* durch Bindung als Dimer an zwei verschiedene Regionen in *marO*, die sich stromabwärts der Bindestelle von MarA befinden (182). MarR verfügt über eine DNA-Bindedomäne, die der sogenannten *winged-helix* Familie angehört (7). Zwei α -Helices bilden ein HTH-Motiv aus, während β -Faltblätter zu der Flügelstruktur beitragen.

Das *mar*-Operon kann durch verschiedene Substanzen wie z. B. Salicylsäure induziert werden. Nach Bindung eines Induktors an MarR ist dieser nicht mehr in der Lage, an *marO* zu binden, so dass der reprimierende Effekt aufgehoben und *marA* transkribiert wird (6). Nach Daten von Alekshun et al. (7) binden zwei Moleküle Salicylsäure pro MarR-Monomer.

In *E. coli* sind bis dato zahlreiche Mutationen in *marR* und *marO* identifiziert worden, die auch in Abwesenheit eines Induktors zu einer erhöhten Expression von *marA* und damit zu einer verringerten Sensibilität der Zellen gegenüber verschiedenen Antibiotika führen (13, 53, 210, 214, 302).

In *Salmonella spec.* ist ebenfalls ein *marRAB*-Operon beschrieben worden, welches starke Sequenzhomologien zu dem *mar*-Locus in *E. coli* aufweist. Sulavik et al. (285) zeigten, dass die Überexpression von *E. coli-marA* in *S. Typhimurium* zu einem Mar(*multiple antibiotic resistance*)-Phänotyp führte. Daher existiert in *S. Typhimurium* offenbar ein ähnliches Regulon. Die Induktion des Mar-Phänotyps mittels Salicylsäure konnte ebenfalls bestätigt werden (247). Im Gegensatz zu *E. coli* sind in *Salmonella spec.* jedoch keine Mutationen in *marR* oder *marO* beschrieben worden, die für eine gesteigerte Expression von *marA* und damit einen erhöhten Resistenzphänotyp verantwortlich sein könnten.

1.5.2.2 Das *soxRS*-Operon

Der globale Regulator SoxS kontrolliert die Antwort der Bakterienzelle auf oxidativen Stress und auf antimikrobiell wirksame Substanzen. SoxS, der Effektor des *soxRS*-Operons, ist ein Homolog von MarA und gehört somit ebenfalls zur Familie der XylS/AraC-Transkriptionsaktivatoren (309). SoxS aktiviert in *E. coli* nicht nur *marRAB* durch Bindung an *marO*, sondern auch die Expression verschiedener anderer Gene, die dem *mar*- und *sox*-Regulon angehören (136, 192). Daher ist es nicht überraschend, dass die Mehrheit der Aminosäurereste, die für die Interaktion zwischen MarA und der DNA eine wichtige Rolle spielt, auch in SoxS konserviert ist (253). MarA und SoxS aktivieren über Bindung an *mar/soxboxes* zwar teilweise die gleichen Gene, sie tun dieses jedoch nicht mit identischer Intensität. Die Ursache der Diskriminierung bestimmter Promotoren liegt v. a. in den strukturell unterschiedlichen *marboxes* begründet, wie Martin et al. (180) experimentell ermittelten.

Eine erhöhte Konzentration von SoxS führt zu einer verstärkten Expression von Genen wie *sodA* (kodiert für die Superoxiddismutase), die zum Abbau von oxidativem Stress führen. Durch SoxS werden aber z. T. auch die gleichen Gene angesprochen wie über MarA, so z. B. *acrAB* (172, 304), *tolC* und *micF* (214). Die Expression von *soxS* unterliegt einer negativen Autoregulation, wie von Nunoshiba et al. (212) beobachtet wurde.

Der globale Aktivator SoxS befindet sich unter der Kontrolle des lokalen Regulators *soxR*, der in divergenter Richtung transkribiert wird (309). Die Anwesenheit reaktiver Sauerstoff-Spezies (O_2^-) führt durch Oxidation eines $[2Fe-2S]$ -Zentrums und anschließende Konformationsänderung zur Aktivierung von SoxR (86). In aktivierter Form bindet der Regulator SoxR als Dimer an die *sox*-Operatorregion und ermöglicht die Transkription von *soxS* (211). Experimentell kann die Expression von *soxS* durch Zugabe von z. B. Paraquat gesteigert werden (61). Wie auch bei der Transkriptionsaktivierung durch MarA, bildet sich zunächst ein Komplex aus SoxS und RNA-Polymerase, der das Genom dann nach *mar/soxboxes* in Promotornähe absucht (178).

Nach Abklingen der induzierenden Signale unterbleibt die Neusynthese der globalen Aktivatoren SoxS und MarA sofort. Zur Gewährleistung einer schnellen Antwort auf sich ändernde Umweltbedingungen werden vorhandene SoxS und MarA Moleküle zudem proteolytisch abgebaut (97).

Obwohl die SoxS Proteine von *E. coli* und *Salmonella spec.* Homologien von über 90 % aufweisen (76), gibt es Unterschiede hinsichtlich der Funktion. Fang und Mitarbeiter (76) beobachteten, dass SoxS in *S. Typhimurium*, im Gegensatz zu dem *E. coli*-SoxS, keine Bedeutung in Bezug auf die Virulenz hat. In beiden Gattungen ist der globale Regulator SoxS jedoch wichtig hinsichtlich der Vermittlung erhöhter Unempfindlichkeit gegenüber reaktiven Sauerstoff-Spezies (237) und verschiedenen Antibiotika (148).

In klinischen Isolaten von *E. coli* und *S. enterica* wurde erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen und anderen Antibiotika verschiedenen Punktmutationen in *soxR* zugeschrieben, die zu einem konstitutiv aktiven SoxR führten (148, 149, 214, 302). Die Aktivierung der *soxS*-Transkription resultierte dann in einer erhöhten Expression von Genen des *sox/mar*-Regulons, wie *acrAB* und *tolC* (148).

1.5.2.3 Der Regulator Rob

Wie MarA und SoxS, so bindet auch der globale Regulator Rob (*right ori binding*) an *mar/sox/rob-boxes* und aktiviert in *E. coli* die Expression von Genen, die zu einer Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika führen, wie z. B. *acrAB* und *micF* (137, 287). Rob gehört ebenfalls zur Familie der XylS/AraC-Transkriptionsaktivatoren und zeigt im Bereich des N-Terminus, der die DNA-Bindedomäne enthält, starke Homologien zu SoxS und MarA (253), ist jedoch erheblich größer als diese. Die C-terminale Region ist für die Bindung eines Effektormoleküls, wie z. B. Bipyridin, von Bedeutung. Rosner et al. (263) beschrieben nach Bindung des Effektormoleküls eine Konformationsänderung von Rob, die zu einer verstärkten Expression der Gene des *rob*-Regulons führte. Rosenberg et al. (261) beobachteten die Aktivierung von Rob mittels Decanoat und Gallensalzen durch Bindung an den C-terminalen Bereich des Proteins und eine daraus resultierende Expressionserhöhung von *acrAB*.

Im Gegensatz zu dem globalen Regulator MarA, welcher eine charakteristische Krümmung im Bereich der *marbox* induziert, um die Bindung beider HTH-Motive an die DNA zu ermöglichen (siehe Abb. 1.5), ist bei Rob nur das N-terminale HTH-Motiv in die große Furche der DNA insertiert, während die C-terminale HTH-Domäne an das Rückgrat der DNA bindet (siehe Abb. 1.6).

Die Expression von *rob* unterliegt, im Gegensatz zu der von *marA* und *soxS*, nicht der Kontrolle eines lokalen Regulators. *rob* wird konstitutiv exprimiert, und erst nach posttranslationaler Verstärkung der Aktivität von Rob durch Bindung eines Effektors kann das Protein als globaler Regulator fungieren.

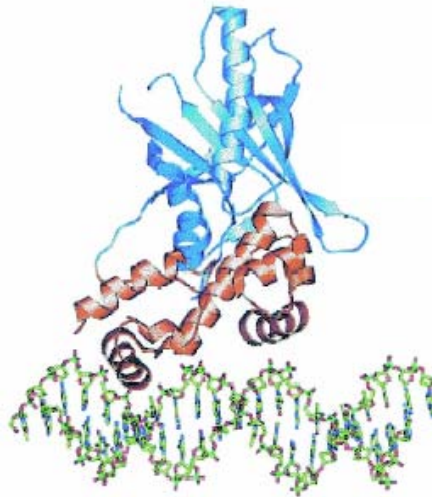


Abb. 1.6: Struktur von Rob während der Bindung an die *micF-marbox*. Die HTH-DNA-Bindedomänen sind in braun dargestellt. Blau hervorgehoben ist der C-terminale Bereich, welcher der Bindung des Effektormoleküls dient (aus (101)).

1.5.2.4 Der Regulator Rma

Ein weiterer globaler Regulator ist RamA bzw. Rma (*resistance to multiple antibiotics*), der bisher für *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella spec.* beschrieben worden ist (296), nicht jedoch für *E. coli*. Zuerst wurde *ramA* von George et al. (88) in *K. pneumoniae* als Gen identifiziert, das für einen Transkriptionsaktivator der XylS/AraC-Familie kodiert, welcher Homologien zu MarA, SoxS sowie dem N-terminalen Bereich von Rob aufweist (48). Nach Überexpression in *E. coli* vermittelt *ramA* erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika wie Chloramphenicol, Tetracyclin, Nalidixinsäure und Norfloxacin (88). Die Autoren beobachteten zudem eine verringerte Expression des Porins OmpF. Bei Salmonellen wurde *rma* zuerst bei *S. Paratyphi B* (313) und später auch bei *S. Typhimurium* (296) identifiziert und für die Vermittlung von *multidrug* Resistenz verantwortlich gemacht. Nach Überexpression von *rma* sowohl in *S. Typhimurium* als auch in *E. coli* zeigten die Stämme verringerte Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika unabhängig von *marA*. Yassien et al. (313) führten die erhöhte Antibiotika-Unempfindlichkeit auf eine erhöhte Expression von *tolC* und eine verringerte Expression von OmpF zurück und wiesen die Bindung von *rma* an *marboxes* nach. Schneiders und Kollegen (273) sowie Ruzin et al. (268) beobachteten in klinischen Isolaten von *K. pneumoniae* eine erhöhte Expression von *ramA* und eine daraus resultierende gesteigerte *acrAB*-Expression.

Die Regulation der Expression von *rma* bzw. *ramA* ist bislang noch nicht aufgeklärt. Auch ist unbekannt, welche Mutationen oder induzierenden Reize für eine verstärkte Expression des Regulators verantwortlich sind.

1.6 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Beitrag geleistet werden zu der Beantwortung der Frage nach der Entstehung Efflux-vermittelter Fluorchinolone-Resistenz in *Salmonella spec.* Anhand von In-vitro-Mutanten sowie von klinischen Isolaten soll untersucht werden, welche Efflux-Pumpen bzw. Regulatoren nach erhöhter Genexpression zu einer Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika beitragen. Darüber hinaus soll die Frage beantwortet werden, wie in *Salmonella spec.* die Regulation von Effluxpumpen auf globaler Ebene stattfindet.

Zur Untersuchung der Beteiligung von Efflux an der Resistenzentwicklung sollen verschiedene epidemiologisch bedeutsame Serovaren und Lysotypen von *Salmonella spec.* verwendet werden, die auf unterschiedlichen Fluorchinolonen selektiert wurden. Vorarbeiten bestehend aus Empfindlichkeits-Bestimmungen sowie Sequenzanalysen der Targetgene begründeten die Hypothese, dass erhöhter aktiver Efflux für eine verringerte Antibiotika-Empfindlichkeit der Zweitschritt-Mutanten aus diesen Selektionsexperimenten verantwortlich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Mutanten aus der In-vitro-Selektion zunächst näher charakterisiert werden: 1. anhand der MHK-Werte in An- und Abwesenheit eines Effluxpumpeninhibitors, 2. durch Sequenzanalysen verschiedener Gene (*acrR*, *soxR*, *rma*, *acrAB*), die nach Mutationen möglicherweise für die verringerten Empfindlichkeiten verantwortlich sein könnten und 3. durch Bestimmung der Generationszeiten.

Als globaler Ansatz soll anschließend durch Erstellung einer chromosomalen Genbank einer In-vitro-Zweitschritt-Mutante versucht werden, einen möglichen, für die Verringerung der Antibiotika-Empfindlichkeiten verantwortlichen, positiven Regulator oder eine Effluxpumpe zu identifizieren.

Zudem soll gezielt die Expression für Effluxpumpen bzw. globale Regulatoren kodierender Gene mittels quantitativer real-time PCR bestimmt werden. Verglichen werden soll die Genexpression der In-vitro-Mutanten mit den entsprechenden Wildtypstämmen, die für das Selektionsexperiment eingesetzt wurden.

Zur Beantwortung der Frage nach der Regulation von Effluxpumpen auf globaler Ebene soll die Expression der globalen Regulatoren MarA, SoxS, Rob und Rma gezielt mittels Induktion bzw. Überexpression gesteigert werden, um die daraus resultierende, veränderte Genexpression von Effluxpumpen und Regulatoren zu bestimmen. Zur Überexpression von *marA* sollen *marR*-defiziente Stämme hergestellt werden. Der Frage nach dem Induktionspotential von Substraten auf die Expression der Effluxpumpen soll durch Zugabe diverser Fluorchinolone und von Chloramphenicol nachgegangen werden. Zudem sollen die phänotypischen Auswirkungen der erhöhten Regulatoren-Expression, sowie der erhöhten Expression der Effluxpumpe AcrAB, mittels MHK-Wert-Bestimmung

ermittelt werden, um einschätzen zu können, welchen Beitrag eine verstärkte Expression dieser Gene an der Fluorchinolon-Resistenz hat.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Mikroorganismen

Die Tabellen 2.1 sowie 2.2 enthalten die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Tab. 2.1: Bakterienstämme der Spezies *Escherichia coli*.

Stammbezeichnung	Genotyp	Quelle/Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>thi</i> -1, <i>endA</i> 1, <i>gyrA</i> 96(Nal ^r), <i>supE</i> 44, <i>recA</i> 1, <i>hsdR</i> 17(<i>r</i> _K ⁻ , <i>m</i> _K ⁺), <i>relA</i> 1, Δ (<i>lac</i> ZYA- <i>argF</i>)U169, <i>deoR</i> (ϕ 80d/ <i>lac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15)	(308)

Tab. 2.2: Bakterienstämme der Spezies *Salmonella spec.*

Serovar	Lysotyp	Stammbezeichnung	bekannte Mutation	Quelle/Referenz
S. Hadar		D	-	Dr. W. Rabsch, Robert-Koch-Institut Wernigerode
S. Hadar		D Δ <i>marR</i>	Δ <i>marR</i>	Diese Arbeit
S. Hadar		Dla	<i>gyrA</i> : S83F	(104)
S. Hadar		Dla Δ <i>marR</i>	<i>gyrA</i> : S83F Δ <i>marR</i>	Diese Arbeit
S. Hadar		Dlla	<i>gyrA</i> : S83F	(104)
S. Hadar		Dlla Δ <i>marR</i>	<i>gyrA</i> : S83F Δ <i>marR</i>	Diese Arbeit
S. Hadar		Dlb	<i>gyrA</i> : D87Y	(104)
S. Hadar		Dlb-4a-2	<i>gyrA</i> : D87Y	(104)
S. Hadar		96-07291	<i>gyrA</i> : D87N	Dr. W. Rabsch, Robert-Koch-Institut Wernigerode
S. Hadar		97-13861	<i>gyrA</i> : D87N	Dr. W. Rabsch, Robert-Koch-Institut Wernigerode
S. Typhimurium	DT 204c	B	-	Dr. W. Rabsch, Robert-Koch-Institut Wernigerode
S. Typhimurium	DT 204c	BI	<i>gyrA</i> : S83F	(104)
S. Typhimurium	DT 204c	BII	<i>gyrA</i> : S83F	(104)
S. Typhimurium	DT 104	C	-	Dr. W. Rabsch, Robert-Koch-Institut Wernigerode
S. Typhimurium	DT 104	CI	<i>gyrA</i> : S83Y	(104)
S. Typhimurium	DT 104	CII	<i>gyrA</i> : S83Y	(104)

Tab. 2.2: Bakterienstämme der Spezies *Salmonella spec.* (Fortsetzung).

Serovar	Lysotyp	Stammbezeichnung	bekannte Mutation	Quelle/Referenz
S. Typhimurium	DT 104	96-06510	<i>gyrA</i> : S83 ⁽¹⁾	Dr. W. Rabsch, Robert-Koch-Institut Wernigerode
S. Typhimurium	DT 104	97-04764	<i>gyrA</i> : S83F	Dr. W. Rabsch, Robert-Koch-Institut Wernigerode
S. Typhimurium	DT 104	98-05405	-	Dr. W. Rabsch, Robert-Koch-Institut Wernigerode
S. Typhimurium	DT 104	Variante Copenhagen 80190	<i>gyrA</i> : S83A, D87N <i>gyrB</i> : S464F	Klinik in Ostfriesland
S. Typhimurium	DT 204c	96-01749	<i>gyrA</i> : S83 ⁽¹⁾	Dr. W. Rabsch, Robert-Koch-Institut Wernigerode

⁽¹⁾ mittels RFLP nachgewiesene *gyrA*-Mutation an der Position Ser83

2.1.2 Plasmide

In Tabelle 2.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten bzw. konstruierten Plasmide aufgeführt.

Tab. 2.3: Plasmide.

Bezeichnung	Größe (bp)	Charakteritika	Quelle/Referenz
pBAD18	4613	<i>araC</i> -P _{arab} , Amp	(102)
pBR322	4361	Amp, Tet	(32)
pCP20	9400	<i>repA</i> 101-ts, FLP, Amp, Clm	(47)
pKD4	3267	Kan-FRT-Templateplasmid, Amp, Kan	(59)
pKD46	6329	<i>repA</i> 101-ts, <i>araC</i> -P _{arab} , λ Red-Rekombinase-System (γ , β , <i>exo</i>), Amp	(59)
pPHB861*	9182	<i>araC</i> -P _{arab} mit <i>acrAB</i> aus <i>S. Hadar</i> , Amp,	Diese Arbeit
pPHB862*	5200	<i>araC</i> -P _{arab} mit <i>marR</i> aus <i>S. Hadar</i> , Amp	Diese Arbeit
pPHB863*	5083	<i>araC</i> -P _{arab} mit <i>rma</i> aus <i>S. Hadar</i> , Amp	Diese Arbeit
pPHB864*	5597	<i>araC</i> -P _{arab} mit <i>rob</i> aus <i>S. Hadar</i> , Amp	Diese Arbeit
pPHB865*	5970	<i>araC</i> -P _{arab} mit STM2126 aus <i>S. Hadar</i> , Amp	Diese Arbeit

* Nomenklatur der in dieser Arbeit konstruierten Vektoren: **p** = Plasmid; **PHB** = Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie Hamburg; **8** = Bezeichnung des Ausgangsvektors pBAD18; **6** = Projekte von Silke Schmidt; **3. Ziffer** = individuell vergeben.

Amp = Ampicillin-Resistenz; **Clm** = Chloramphenicol-Resistenz; **Kan** = Kanamycin-Resistenz; **Tet** = Tetracyclin-Resistenz; ***araC*-P_{arab}** = Promotor des Arabinose-Operons; **FLP** = FLP-Rekombinase; **FRT** = *FLP recognition target*; ***repA* 101-ts** = temperatursensitiver Replikationsursprung.

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH bzw. von der Invitrogen GmbH bezogen. In Tabelle 2.4 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt.

Tab. 2.4: Oligonukleotide (Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen dargestellt).

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3') (Nukleotidposition 5')	Länge (nt)	Schnittstelle/Modifikation
<i>acr_Seq1</i>	GCCAGCAGCGTTCGCAATCT (+126)	20	
<i>acr_Seq2</i>	GCGGCGATACTGATGCGCAG (+487)	20	
<i>acr_Seq3</i>	GGACTTCTCAACGCTCACGC (+396)	20	
<i>acr_Seq4</i>	GGTCGCGACAATCAGACGCT (+1687)	20	
<i>acrA_for</i> (rt)	TGGCAATAAGGTGTGATCCG (+867)	20	
<i>acrA_rev</i> (rt)	AGTTCTCCGACGTGACCGTT (+782)	20	
<i>acrAB_for</i> (oe)	AGGCTCTAGATTTACATACATTTA (-125)	24	<i>Xba</i> I
<i>acrAB_rev</i> (oe)	CGCAGTAAAGCTTATACCTTTTA (+3269)	23	<i>Hind</i> III
<i>acrB_for1</i> (rt)	TACGCCAGTACCTACCGCATT (+3021)	21	
<i>acrB_for2</i> (rt)	CGTGGAGTCACTGTTGGAGGA (+255)	21	
<i>acrB_rev1</i> (rt)	CCTCGTTAGCGTTCATGCTG (+2933)	20	
<i>acrB_rev2</i> (rt)	CAGGATACCGTCACGCAGGT (+172)	20	
<i>acrE_for</i> (rt)	AGCCCAATGCCATCCTTGT (+902)	19	
<i>acrE_rev</i> (rt)	GCTTCGACCTGGCTTTTATCG (+998)	21	
<i>acrR_for</i>	AAATCTAACGCCTGTAAATTCACCG (-29)	25	
<i>acrR_rev</i>	TGTAACCAACAGAATAGCGACACAG (+709)	25	
<i>dmarR_for</i>	TTCAATGAAATCATTCCGCTGGGTCGCTTGATC TACATGGTAAATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (+22)	66	
<i>dmarR_for2</i>	AGATCGCCTGTAAATAACTATTTATCCCCGCTGGA TATCACCGCAACACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC (+75)	71	
<i>dmarR_rev</i>	CAAATACTCAAGCGTTGCCACTTCGTCCGCCGT TAAGTTTTTGTGCATATGAATATCCTCCTTAGT (+414)	66	
<i>dmarR_rev2</i>	ATTCTGATGCAGGTCTTGCCCTGGTCGTTGATGAC ATTGCTCACAAATTCATATGAATATCCTCCTTAGT (+367)	71	
<i>emrA_for</i> (rt)	TTCAACGTCTGCCGGTACG (+947)	19	
<i>emrA_rev</i> (rt)	ACGGTGACCAGCGTCGATA (+1034)	19	
<i>K2</i> ⁽¹⁾	CGGTGCCCTGAATGAACTGC (+162)	20	
<i>Kt</i> ⁽¹⁾	CGGCCACAGTCGATGAATCC (+632)	20	
<i>mar_for</i>	AGGCGCGCCATTTCCGCCAGT (-200)	20	
<i>mar_rev</i>	GGTTATCCTCGATCCAGTCC (+518)	20	
<i>marA_for</i> (rt)	TAGCGTTCGCCAGATAGAGA (+302)	21	
<i>marA_rev</i> (rt)	CAATACATCCGCAGCCGTAA (+217)	20	
<i>marR_for</i> (rt)	ATGACAAACGCGGCGTACT (+272)	19	
<i>marR_rev</i> (rt)	TCTTGCCCTGGTCGTTGAT (+353)	19	
<i>mdfA_for</i> (rt)	GGTGGTTTCATCCCATGCTTA (+918)	21	
<i>mdfA_rev</i> (rt)	AGAGCGTCAGACGCACCACT (+1018)	20	
<i>pBAD18_for</i> (seq)	TTTATCCATAAGATTAGCGG (+1221)	20	
<i>pBAD18_rev</i> (seq)	TTTAATCTGTATCAGGCTGA (+1410)	20	
<i>pBR322_427_3'</i>	GCACCTGTGGCGCCGGTGAT (+427)	20	
<i>pBR322-Tet_for</i>	GCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAG (+31)	25	
<i>pKD4_Seq1</i>	TGTCTCTTGATCAGATCTTGATCCC (-19)	25	
<i>pKD4_Seq2</i>	ATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCG (+653)	25	
<i>rma_for</i>	TATGCGATAAGCCGACTCACAA (-109)	22	
<i>rma_for</i> (oe)	GATATCTAGACTCACAAATTTATGTGG (-104)	26	<i>Xba</i> I
<i>rma_for</i> (rt)	AGCAAACCTTTACGCGCATT (+257)	20	
<i>rma_rev</i>	CGCGCTGGAATATTATGTCATT (+408)	22	

Tab. 2.4: Oligonukleotide (Fortsetzung).

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3') (Nukleotidposition 5')	Länge (nt)	Schnittstelle/Modifikation
<i>rma_rev</i> (oe)	CGCTGGAAGCTTATGTCATTCGCT (+406)	24	<i>HindIII</i>
<i>rma_rev</i> (rt)	ATGCGTACGGCCATGCTT (+339)	18	
<i>rob_for</i> (oe)	AAATTCTAGAATCCTCTTACCTGAT (-61)	25	<i>XbaI</i>
<i>rob_for</i> (rt)	GCCGGTTCCTAACCCTTCAT (+705)	20	
<i>rob_rev</i> (oe)	ATTACCAGGAAAGCTTGTGGCTG (+967)	23	<i>HindIII</i>
<i>rob_rev</i> (rt)	AGGCCGATGGCTATGTTTCAG (+617)	20	
<i>rpoE_for</i> (rt)	CCCTCCCGGAAGATTTACGTA (+410)	21	
<i>rpoE_rev</i> (rt)	CACCGGACAATCCATGATAGC (+501)	21	
<i>rpoN_for</i> (rt)	GAAGTTAATTGCGCGGAAA (+1275)	20	
<i>rpoN_rev</i> (rt)	CGCCACCATGATACCTTGTTTC (+1362)	21	
<i>sodA_for</i> (rt)	CGGTTCCGTTGACAACTTCA (+321)	20	
<i>sodA_rev</i> (rt)	TGTCGCCTTTCAGACCA (+412)	18	
<i>soxR_for</i>	ATGCGACATATTGTTGCCTCTT (-95)	22	
<i>soxR_rev</i>	AGCGAAAGACAAAGACCGGAAA (+546)	22	
<i>soxS_for</i> (rt)	CGGAATACACGCGAGAAGGT (+278)	20	
<i>soxS_rev</i> (rt)	CGGCCGTTGAGCTACGAA (+185)	18	
STM2126_for(oe)	CCGTGTTCTAGAATTCCTCCA (-98)	21	<i>XbaI</i>
STM2126_rev(oe)	GGCGAAGCTTAAACAGACGC (+1299)	20	<i>HindIII</i>
<i>tolC_for</i> (rt)	TGCCATGGAAGCCGGTTA (+1131)	18	
<i>tolC_rev</i> (rt)	CGTTGGCCAGTTGCTGCT (+1228)	18	
<i>ydgF_for</i> (rt)	AGCGTGCTGCTATTTGATGAAG (+223)	22	
<i>ydgF_rev</i> (rt)	TTACGCGTCCCTGATTTGATC (+320)	21	
<i>ydhE_for</i> (rt)	AGCGCATCCGTAGCATCATT (+1324)	20	
<i>ydhE_rev</i> (rt)	ATTTGGTGGTGGATCGTATGG (+1229)	21	
<i>yegO_for</i> (rt)	CGCACTGCCATTGGTGTAT (+2892)	20	
<i>yegO_rev</i> (rt)	CTGGCTCATGACCAAACCG (+2982)	19	

⁽¹⁾ (59); oe = für Überexpression (*overexpression*); rt = für real-time PCR; seq = für Sequenzierung

2.1.4 Antibiotika

Tabelle 2.5 enthält die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Chemotherapeutika. Die Antibiotika wurden nach Angabe des Herstellers gelöst und anschließend steril filtriert.

Tab. 2.5: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Hersteller
Ampicillin	H ₂ O mit wenig Na ₂ CO ₃	Sigma Aldrich Chemie GmbH
BayY 3118	H ₂ O	Bayer Health Care
Chloramphenicol	50 % EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Ciprofloxacin	H ₂ O	Bayer Health Care
Clinafloxacin	H ₂ O	Bayer Health Care
Erythromycin	abs. EtOH	Abbott Laboratories Ltd.
Garenoxacin	H ₂ O	Bristol-Meyers-Squibb
Kanamycin	H ₂ O	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Levofloxacin	H ₂ O	Aventis Pharma GmbH
Marbofloxacin	H ₂ O mit wenig NaOH	Bayer Health Care
Moxifloxacin	H ₂ O	Bayer Health Care
Nalidixinsäure	H ₂ O	Sterling Winthrop Inc.
Norfloxacin	H ₂ O mit wenig NaOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Novobiocin	H ₂ O	Bayer Health Care

Tab. 2.5: Verwendete Antibiotika (Fortsetzung).

Antibiotikum	Lösungsmittel	Hersteller
Ofloxacin	H ₂ O	Aventis Pharma GmbH
Pradofloxacin	H ₂ O	Bayer Health Care
Roxithromycin	60 % MetOH	Aventis Pharma GmbH
Sparfloxacin	0,1 N NaOH	Bayer Health Care
Tetracyclin	abs. EtOH	Sigma Aldrich Chemie GmbH

2.1.5 Nährmedien

Die Herstellung der Nährmedien erfolgte wie in Tabelle 2.6 angegeben. Die Medien wurden direkt nach der Einwaage gelöst und autoklaviert. Festmedien wurden durch den Zusatz von 1,5 % (w/v) Agar hergestellt. Zur Herstellung von Antibiotika-haltigem Medium wurde der nach dem Autoklavieren auf ca. 50 °C abgekühlten Lösung das Antibiotikum entsprechend der jeweiligen Endkonzentration zugesetzt (Ampicillin: 100 µg/ml; Kanamycin: 25 µg/ml).

Tab. 2.6: Nährmedien.

Medium	Herstellung	Anbieter
Luria-Bertani (LB)	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl; mit dH ₂ O auf 1 l auffüllen; pH 7,4	-
M9-Minimalmedium	750 ml dH ₂ O autoklavieren (bzw. dH ₂ O-Agar für Festmedium), auf 50 °C abkühlen lassen, Zugabe von 1 ml 1 M MgSO ₄ -Lösung, 0,1 ml 1 M CaCl ₂ -Lösung sowie 100 ml 10 x M9-Salzen (5 g NaCl, 60 g Na ₂ HPO ₄ , 10 g NH ₄ Cl, 30 g KH ₂ PO ₄ ; mit H ₂ O auf 1 l auffüllen; pH 7,4); als C-Quelle wurde Glukose bzw. Arabinose (10 ml einer 20 %igen Stammlösung) zugesetzt	-
Mueller-Hinton-Bouillon	nach Angaben des Herstellers	Becton Dickinson
SOB	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ ; mit dH ₂ O auf 1 l auffüllen	-
SOC	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glukose; mit dH ₂ O auf 1 l auffüllen	-
Standard NI-Bouillon/ Agar	nach Angaben des Herstellers	Merck KGaA
TYE	3 g Trypton, 5 g Glukose, 5 g Hefeextrakt; mit dH ₂ O auf 1 l auffüllen; pH 7,0	-

2.1.6 Puffer und Lösungen

In Tabelle 2.7 sind die verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt. Die Angaben beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf ein Gesamtvolumen von 1 l.

Tab. 2.7: Puffer und Lösungen.

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
10 x Ligationspuffer	660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 10 mM ATP; Zugabe von 10 ml dH ₂ O; pH 7,5; Lagerung nach Aliquotieren bei -20 °C

Tab. 2.7: Puffer und Lösungen (Fortsetzung).

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
5 x DNA-Gelladepuffer	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 20 % Ficoll-400
5 x RNA-Gelladepuffer	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 20 % Ficoll-400, 3 % Formamid, 7 M Harnstoff, Ethidiumbromid (150 µg/ ml)
Elutionspuffer (EB-Puffer)	10 mM Tris-HCl (pH 8,5)
isotonische Kochsatzlösung (0,9 % (w/v))	9 g NaCl; Zugabe von dH ₂ O; autoklavieren
TAE-Puffer (50 x)	2 mM Tris-Base, 50 mM EDTA; mit Essigsäure auf pH 8,0 einstellen
Herstellung kompetenter Zellen zur Lagerung bei -80 °C	
TFB1	0,5 g KAc, 1 g MgCl ₂ , 0,75 g KCl, 1,6 ml 1 M CaCl ₂ , 17 ml Glycerin (87 %); Vol. bis auf 100 ml mit dH ₂ O auffüllen; pH 5,8
TFB2	0,1 g MOPS, 3,8 ml 1 M CaCl ₂ , 37,5 mg KCl, 8,5 ml Glycerin (87 %); Vol. bis auf 50 ml mit dH ₂ O auffüllen
Isolierung chromosomaler DNA mittels CTAB	
CTAB-NaCl-Lösung	4,1 g NaCl in 80 ml dH ₂ O lösen, langsam 10 g CTAB unter Rühren und Erhitzen (bis zu 65 °C) zugeben; Vol. bis auf 100 ml mit dH ₂ O auffüllen
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA; pH 7,5
Plasmid-Minipräparation (alkalische Lyse verändert nach Birnboim & Doly)	
alkalischer Lysepuffer	200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS
Neutralisationspuffer	3 M KAc; pH 5,5
TE-Puffer	150 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA; pH 8,0

2.1.7 Kits

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits sind in der Tabelle 2.8 zusammengefasst. Informationen zu den Zusammensetzungen der Puffer sowie Protokolle sind den entsprechenden Handbüchern zu entnehmen.

Tab. 2.8: Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Aufreinigung von Nukleinsäuren	
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen GmbH
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH
NucleoSpin [®] Extract II	Macherey-Nagel
Isolierung von DNA	
Qiagen Plasmid Midi-Kit	Qiagen GmbH
Qiagen Plasmid Mini-Kit	Qiagen GmbH
Isolierung von RNA	
RNAprotect [™] Bacteria Reagent	Qiagen GmbH
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH
real-Time PCR	
TAQurate Real-Time PCR Master Mix	Biozym Diagnostik GmbH
Sequenzierung	
Sequencer Kit	Applied Biosystems

2.1.8 Enzyme

In Tabelle 2.9 sind die verwendeten Enzyme aufgeführt.

Tab. 2.9: Enzyme.

Enzym	Hersteller
Expand™ High Fidelity Polymerase	Roche Diagnostics GmbH
Lysozym	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Phusion™ High Fidelity Polymerase	New England Biolabs GmbH
Proteinase K	Roche
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH bzw. Fermentas GmbH
RNase A	Qiagen GmbH
RNase-free DNase	Qiagen GmbH
RNase OUT	Invitrogen
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	Roche Diagnostics GmbH
Superscript II RNase H ⁻	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics GmbH bzw. New England Biolabs GmbH
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH

2.1.9 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in analytischem Reinheitsgrad bezogen und sind in Tabelle 2.10 aufgeführt.

Tab. 2.10: Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Agar-Agar granuliert	Merck KGaA
Agarose (Seakem® LE)	Biozym Diagnostik GmbH
Agarose Neeo (RNase frei)	Carl Roth GmbH
Agarose NuSieve 3:1	Biowhittaker Molecular Applications (BMA)
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Merck KGaA
Bacto Trypton	Becton Dickinson
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA
Chloroform	Carl Roth GmbH
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad Laboratories
dNTPs (100 mM Lithium-Salz-Lösungen)	Roche Diagnostics GmbH
Ethanol, absolut	Merck KGaA
Ethidiumbromid, 1%ige Lösung in H ₂ O	Merck KGaA
Ethylendiamin-Tetra-Acetat (EDTA)	Merck KGaA
Ficoll-400, 20 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Glukose-Monohydrat	Merck KGaA
Glycerin 87 %	Merck KGaA
Harnstoff	Bio-Rad Laboratories
Hefeextrakt granuliert	Merck KGaA
Hexadecyltrimethyl-Ammonium-Bromid (CTAB)	Merck KGaA
Isopropanol	Merck KGaA
Kaliumacetat	Merck KGaA

Tab. 2.10: Chemikalien (Fortsetzung).

Bezeichnung	Hersteller
Kaliumchlorid	Merck KGaA
Kaliumhydroxid	Merck KGaA
L-Arabinose	Merck KGaA
LiChrosolv-H ₂ O	Merck KGaA
Magnesiumchlorid	Merck KGaA
Methanol	Merck KGaA
MOPS	Sigma Aldrich Chemie GmbH
Natriumacetat	Merck KGaA
Natriumcarbonat	Merck KGaA
Natriumchlorid	Merck KGaA
Natriumdodecylsulfat (SDS), 10 %	Bio-Rad Laboratories
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth GmbH
Phenylalanyl-Arginyl- β -Naphthylamid	Sigma Aldrich Chemie GmbH
RNase AWAY	Invitrogen
Salzsäure, 37 %	Merck KGaA
Smart Ladder	Eurogentec
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris-Base)	Merck KGaA
Xylencyanol	Merck KGaA

2.1.10 Geräte und sonstige Materialien

Die im Rahmen der Untersuchungen verwendeten Geräte und sonstigen Materialien sind der Tabelle 2.11 zu entnehmen.

Tab. 2.11: Geräte und sonstige Materialien.

Gerät/ Material	Hersteller
Abimed Kolben-Hubpipetten, variabel	ABIMED Analysen-Technik GmbH
Brutschränke	Heraeus
DNA-Sequencer ABI-Prism 310	Applied Biosystems
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Merck KGaA
Elektrophorese Power Pac1000	Bio-Rad Laboratories
Elektrophorese Power Supply	Biozym Diagnostik GmbH
Elektroporationsgerät Genepulser II und Pulse Controller II	Bio-Rad Laboratories
Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand: 0,2 cm)	Bio-Rad Laboratories bzw. Eurogentec
Eppendorf-Gefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml)	Eppendorf AG
Falcon-Tubes (50 ml, 15 ml)	TPP
Filterspitzen, variabel	Biozym Diagnostik GmbH
Gelkammern Comphor Mini, Midi	Biozym Diagnostik GmbH
GeneAmp 5700 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Küvetten (Halbmikro)	Carl Roth GmbH & Co KG
MHK-Mikrotiterplatten	Merck KGaA
Multistep-Pipette (8-Kanal)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG
Petrischalen	Sahrstedt AG & Co
pH-Meter	WTW GmbH
Reinstwasseranlage (MilliQ)	Millipore GmbH
Schüttelinkubatoren: Schüttelinkubator (Serie 25) und Certomat R + H	New Brunswick Scientific & Co, Inc und Braun Biotech
Sicherheitswerkbank, Hera safe	Heraeus
Spektralphotometer (Cary 50)	Varian GmbH
Sterilfilter, 0,2 μ m, 7 bar	Sartorius AG
Sterilwerkbank, Hera gard	Heraeus

Tab. 2.11: Geräte und sonstige Materialien (Fortsetzung).

Gerät/ Material	Hersteller
Thermocycler T3, TGradient, TPersonal	Biometra GmbH
Thermopapier, Sony UPP-110HP	Biometra GmbH
Thermoprinter, Sony UP-D890	Biometra GmbH
Video-Dokumentationsanlage BioDoc	Biometra GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc.
Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH
Zentrifugen: Biofuge pico, Biofuge fresco, Biofuge stratos (Rotoren: #3331, #3332, #3335, #3046)	Heraeus

2.2. Methoden

2.2.1. Stammhaltung und Kryokonservierung

Zur Stammhaltung wurden die verwendeten Stämme auf LB-Agarplatten vereinzelt und nach einer Über-Nacht-Inkubation bei 37 °C für bis zu sechs Wochen bei 4 °C gelagert.

Um gegen den Verlust des jeweiligen Plasmids zu selektionieren, wurde in den entsprechenden Fällen in Anwesenheit von Antibiotikum gearbeitet.

Für eine dauerhafte Stamm-Konservierung wurden Gefrierkulturen angelegt. Hierzu wurden Kryoröhrchen mit 500 µl einer Standard-NI-Bouillon-Glycerin-Lösung (Verhältnis 1:1) sowie etwa 10 Glasperlen gefüllt und autoklaviert. Anschließend wurden von einer über Nacht inkubierten Agarplatte einige Einzelkolonien abgenommen und in dem Medium resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die NI-Glycerin-Lösung abgenommen und die Kultur bei -80 °C gelagert. Zum Ausimpfen der entsprechenden Kultur wurde dem Kryoröhrchen eine Glasperle entnommen, diese auf eine Agarplatte aufgebracht und ausgestrichen.

2.2.2. Stammanzucht und Zellernte

Submerskulturen wurden in der Regel mit Einzelkolonien von Agarplatten inokuliert. Bei kleinen Kulturvolumina (< 10 ml) erfolgte die Anzucht in Reagenzgläsern. Für größere Kulturvolumina (> 50 ml) wurden 250 - 500 ml-Erlenmeyerkolben benutzt. Die Anzucht erfolgte in Form einer Vorkultur, welche bei 37 °C und 100 - 180 rpm über Nacht schüttelnd inkubiert wurde. Sofern erforderlich erfolgte am nächsten Tag das 3 %ige Animpfen von Hauptkulturen. Unter den oben beschriebenen Bedingungen erfolgte die weitere Inkubation bis zum Erreichen der gewünschten OD. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 7 min bei 5500 rpm und 4 °C.

2.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl (KBE)

Zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KBE) wurde die zu untersuchende Bakteriensuspension in physiologischer (0,9 %) NaCl-Lösung sukzessive 1:10 verdünnt. Die Anzahl der Verdünnungsstufen richtete sich nach der optischen Dichte der Kultur bzw. der erwarteten Keimzahl. Von den letzten drei Verdünnungsstufen wurden jeweils 50 µl auf ein Viertel einer Agarplatte aufgebracht und ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Kolonien ausgezählt und die KBE/ml für die Ausgangssuspension berechnet.

2.2.4 Bestimmung der Generationszeit

Die Berechnung der Generationszeit basiert auf der Wachstumskurve des entsprechenden Stammes, die entweder mit Hilfe der OD (OD_{546nm} gegen die Zeit) oder der KBE (logKBE/ml gegen die Zeit) bestimmt wird. Präziser ist die Bestimmung der Wachstumskurve anhand der KBE, da dabei ausschließlich lebende Zellen berücksichtigt werden. Die Bestimmung mittels OD ist jedoch in der Regel hinreichend genau, da für die Berechnung der Generationszeit ausschließlich die exponentielle Wachstumsphase von Bedeutung ist, in der sich die Zellen mit maximaler Effizienz teilen. Zur Berechnung der Generationszeit (g) wird im Bereich des exponentiellen Wachstums eine Regressionsgerade bestimmt, deren Steigung (m) den wesentlichen Berechnungsparameter darstellt:

$$v = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2(t - t_0)} \Rightarrow v \lg 2 = \frac{\lg N - \lg N_0}{(t - t_0)}$$

$$\frac{\lg N - \lg N_0}{(t - t_0)} = m \Rightarrow v = \frac{m}{\lg 2} \Rightarrow g = \frac{1}{v}$$

v = Teilungsrate; t = Zeit; N = Zellzahl zum Zeitpunkt t ; N_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt 0; m = Steigung der Regressionsgeraden im Bereich der exponentiellen Wachstumsphase; g = Generationszeit.

Zur Bestimmung der Generationszeiten der verschiedenen Stämme wurden Über-Nacht-Kulturen 1:1000 in einem Gesamtvolumen von 50 ml LB-Bouillon verdünnt und bei 150 rpm und 37 °C inkubiert. Alle 20 min wurden Proben genommen und bei OD_{546nm} photometrisch vermessen. Ab einer OD_{546nm} von 0,3 wurden die Proben 1:10 in 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt. Zur Auswertung wurden die gemessenen OD-Werte gegen die Zeit aufgetragen. Für die Werte aus der exponentiellen Wachstumsphase wurde eine

Regressionsgerade bestimmt und aus deren Anstieg nach obiger Formel die Teilungsrate ν sowie die Generationszeit g ermittelt.

2.2.5 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) eines Antibiotikums ist definiert als diejenige Konzentration, die das sichtbare Wachstum von Bakterien deutlich hemmt. Die Bestimmungen der MHK-Werte (angegeben in $\mu\text{g/ml}$) im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Mikrodilutionsverfahren (206) durchgeführt. Dazu wurden die Kavitäten einer Mikrotiterplatte, die ausgehend von einer bestimmten Antibiotika-Konzentration serielle zweifache Verdünnungen enthielten, mit der zu untersuchenden Bakteriensuspension beschickt. Die Platten wurden für 18 h bei 37 °C inkubiert und anschließend ausgewertet. Zunächst wurde eine Stammlösung des zu testenden Antibiotikums (etwa 10 mg/ml) hergestellt und entsprechend der höchsten einzusetzenden Konzentration in Mueller-Hinton(MH)-Bouillon verdünnt. Aus dieser Antibiotika-Lösung wurde dann eine Verdünnungsreihe (1:2) hergestellt. Pro Kavität wurden anschließend je 50 μl Antibiotika-Lösung sowie 50 μl Bakteriensuspension eingesetzt, so dass das Chemotherapeutikum zunächst in doppelter Konzentration vorgelegt werden musste. Die Einstellung der Bakteriensuspension erfolgte nach dem McFarland Standard 0,5 (entspricht ca. 1×10^8 Zellen/ml). Dazu wurden von einer über Nacht bebrüteten Agarplatte Zellen des zu testenden Stammes abgenommen und in 0,9 %iger NaCl-Lösung resuspendiert bis der McFarland Standard erreicht wurde. Die Trübung wurde photometrisch überprüft, wobei eine $\text{OD}_{550\text{nm}}$ von 0,125 $\pm$ 0,02 erreicht werden sollte. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 1:100 in MH-Bouillon verdünnt, so dass die Keimzahl pro ml bei etwa 1×10^6 lag. Die Auswertung erfolgte in der Regel nach 18 h Inkubation visuell, im Vergleich zu der Wachstumskontrolle.

Modifikationen des Standardprotokolls:

1. Fielen die erwarteten MHK-Wert-Unterschiede zwischen den zu testenden Stämmen relativ gering aus, so wurden nicht die üblichen doppelten Verdünnungsstufen, sondern kleinere Abstufungen (z. B. 10 - 1 $\mu\text{g/ml}$), für die Antibiotika-Konzentrationen gewählt.
2. Um den Einfluss bestimmter Gene auf den Resistenzphänotyp zu ermitteln, wurden MHK-Werte in Anwesenheit von Überexpressionsplasmiden ermittelt. Um die Replikation des Vektors zu gewährleisten, wurde mit einem zusätzlichen Antibiotikum (zumeist Ampicillin) gearbeitet. Da die Überexpression in Minimalmedium effizienter ausfällt, wurden die Bestimmungen zudem in M9-Medium + Glukose bzw. Arabinose durchgeführt.

Die Auswertung wurde unter diesen Bedingungen standardmäßig nach 40 h vorgenommen.

3. Um den Einfluss von Effluxpumpen bei der Ausprägung der Antibiotikaempfindlichkeit zu ermitteln, wurde die MHK-Wert-Bestimmung in Anwesenheit eines Efflux-Pumpen-Inhibitors (EPI) durchgeführt. Sind die erhöhten MHK-Werte eines Stammes tatsächlich auf erhöhten Efflux zurück zu führen, so sinken die Werte in Anwesenheit eines EPI. Spielt Efflux keine Rolle, so bleiben die MHK-Werte unverändert. Der EPI wurde in doppelter Konzentration zu der Bakteriensuspension gegeben, um die Verdünnung durch die Antibiotika-Lösung auszugleichen. Verwendung fand die Substanz Phenylalanyl-Arginyl- β -Naphthylamid (64 $\mu\text{g/ml}$).

2.2.6 Isolierung von DNA

2.2.6.1 Isolierung chromosomaler DNA

2.2.6.1.1 Isolierung chromosomaler DNA nach der Kochmethode

Zur einfachen und schnellen Isolierung von chromosomaler DNA, die dann z. B. als PCR-Template eingesetzt wurde, fand die Kochmethode Verwendung. Diese Methode eignet sich sowohl für die Isolierung von DNA aus Zellen von *E. coli* als auch von *Salmonella* ssp. Dazu wurden ca. 3 Einzelkolonien des entsprechenden Bakterienstammes in 100 μl dH₂O resuspendiert und für 15 min bei 95 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe auf RT wurden die Zellreste durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min pelletiert. Die im Überstand befindliche DNA wurde in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt und je nach Bedarf bei -20 °C gelagert.

2.2.6.1.2 Isolierung chromosomaler DNA mittels CTAB und anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Präparation möglichst intakter genomischer DNA in hohem Reinheitsgrad und mit großer Ausbeute wurde die Isolierung mittels Hexadecyltrimethyl-Ammonium-Bromid (CTAB) durchgeführt (verändert nach (15)), welches Polysaccharide und Proteine komplexiert. Um Scherung der DNA zu vermeiden, wurde mit abgeschnittenen Spitzen beim Pipettieren gearbeitet. Zunächst wurde von dem entsprechenden Stamm eine 100 ml Über-Nacht-Kultur in Standard-NI-Bouillon angesetzt und bei 130 rpm und 37 °C inkubiert. Nach der Ernte bei 5500 rpm und 4 °C für 10 min, wurde das Pellet in 9,5 ml TE-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 500 μl 10 %iges SDS sowie 50 μl Proteinase K (20 mg/ml) zugesetzt. Nach gründlichem Mischen wurde die Probe für 1 h

bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 1,8 ml NaCl (5 M) zugesetzt und der Ansatz gut gemischt, um eine ausreichend hohe Salzkonzentration zu gewährleisten. Fällt die Salzkonzentration unter 0,5 M, so bildet sich mit dem später zugesetzten CTAB ein CTAB-DNA-Präzipitat. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,5 ml CTAB-NaCl-Lösung. Die Probe wurde gut durchmischt und bei 65 °C für 20 min inkubiert.

Im Anschluss wurde 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugesetzt, der Ansatz gut geschüttelt und bei 7000 rpm und RT für 10 min zentrifugiert. Der wässrige, viskose, die genomische DNA enthaltene Überstand wurde vorsichtig in ein sauberes Falcon-Tube überführt, bevor ein weiteres Mal mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt wurde. Anschließend wurde mit 1 Vol. Chloroform extrahiert, um Reste des Phenols zu eliminieren. Wieder wurde bei 7000 rpm und RT für 10 min zentrifugiert und der Überstand überführt. Anschließend wurde die chromosomale DNA durch Zugabe von 0,6 Vol. Isopropanol gefällt. Die DNA konnte dann mit einer gebogenen und versiegelten Pasteur-Pipette gefischt und zum Waschen in 70 %igen Ethanol (2 ml) überführt werden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm und RT für 5 min, bevor der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet bei 37 °C getrocknet wurde. Anschließend wurde die genomische DNA in 4 ml TE-Puffer aufgenommen und für ca. 1 h bei 60 °C gelöst. Die DNA wurde einer Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.8.1) unterzogen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Der Zellaufschluss sowie die Trennung von Plasmid- und chromosomaler DNA erfolgt bei allen Isolations-techniken nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dabei werden die unterschiedlichen DNA-Formen ausgenutzt. Nach Denaturierung der DNA durch Alkalibehandlung kann die chromosomale DNA durch eine anschließende Neutralisierung ausgefällt und mit Zelltrümmern und Proteinen abzentrifugiert werden, während die Plasmid-DNA renaturiert und im Überstand verbleibt.

2.2.6.2.1 Plasmid-Minipräparation verändert nach Birnboim & Doly

Dieses Verfahren der Plasmid-Minipräparation modifiziert nach Birnboim und Doly (31) dient der schnellen Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* bzw. *Salmonella* ssp.

1,5 ml einer über Nacht angewachsenen 3 ml LB-Kultur wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min geerntet, und das Zellpellet in 150 µl TE-Puffer (mit 100 µg/ml RNase) aufgenommen. Die alkalische Lyse wurde durch Zugabe von 150 µl frisch hergestelltem alkalischem Lyse-Puffer eingeleitet. Nach Inkubation für 5 min bei RT

erfolgte die Neutralisation durch Zugabe von 150 µl Neutralisationspuffer. Der Ansatz wurde sofort gemischt, und Zelltrümmer, Proteine sowie chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min abgetrennt. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und anschließende Zentrifugation bei 17000 rpm für 30 min präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, und nach erneuter Zentrifugation bei 17000 rpm für 5 min getrocknet (37 °C, 30 min). Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 30 µl dH₂O (sofortige Verwendung) oder EB-Puffer (Lagerung) aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.6.2.2 Plasmid-Minipräparation mittels Qiagen-Kits

Zur Isolation von Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad wurden Anionenaustauscher-Säulen eingesetzt. Das Verfahren basiert ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse, Neutralisation und Abtrennung des aus chromosomaler DNA und Proteinen bestehenden Präzipitats von der im Überstand befindlichen Plasmid-DNA. Die hohe Reinheit der DNA wird durch die Anionenaustauscher-Säule erreicht. Die plasmidäre DNA bindet an die Säulenmatrix, wohingegen Verunreinigungen durch Waschschriffe ausgeschwemmt werden. Die Plasmid-DNA kann dann mit dH₂O oder EB-Puffer von der Säule eluiert werden.

Zur Isolation von Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad in kleinem Maßstab wurde das Plasmid Mini-Kit der Firma Qiagen GmbH verwendet. Zweimal 1,5 ml einer über Nacht angezogenen 3 ml LB-Kultur wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß geerntet (5 min, 13000 rpm) und das Zellpellet nach Abnahme des Kulturüberstandes in 150 µl Puffer P1 (+ 20 µg/ml RNase) resuspendiert. Die alkalische Lyse wurde durch Zugabe von 150 µl Puffer P2 und sofortiges Invertieren des Reaktionsgefäßes eingeleitet. Nach Inkubation für 5 min bei RT erfolgte durch Zugabe von 150 µl eiskaltem Puffer P3 die Neutralisation. Der Ansatz wurde für 20 min bei RT inkubiert und anschließend für 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um die genomische DNA sowie Zelltrümmer zu pelletieren. Mit dem so erhaltenen Überstand wurde die Anionenaustauscher-Säule beladen. Nach Zentrifugation (1 min, 13000 rpm) folgte ein Waschschriff, indem die Säule mit 500 µl PW-Puffer beladen, für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und erneut zentrifugiert wurde. Zur quantitativen Entfernung des Waschpuffers wurde erneut zentrifugiert. Die Säule wurde in ein sauberes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die aufgereinigte DNA mit 30 bis 50 µl dH₂O oder EB-Puffer nach 2-minütiger Inkubation bei RT von der Säule eluiert (Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm).

2.2.6.2.3 Plasmid-Midipräparation mittels Qiagen-Kits

Zur präparativen Isolation von Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad in großem Maßstab wurde das Plasmid Midi-Kit der Firma Qiagen GmbH verwendet. RNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden in mehreren Waschschritten durch Puffer mit mittlerem Salzgehalt entfernt. Die an die Silica-Membran gebundene DNA wird anschließend mit einem Puffer mit hoher Salzkonzentration eluiert. Anschließend folgen die Fällung der DNA mit Isopropanol und das Entsalzen durch Waschen mit Ethanol.

Für die Plasmid-Midipräparation wurden 100 ml LB-Bouillon mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (15 min, 5500 rpm, 4 °C) geerntet und das Zellpellet anschließend in 4 ml Puffer P1 aufgenommen. Durch Zugabe von 4 ml Puffer P2 wurde die alkalische Lyse eingeleitet. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden zur Neutralisation 4 ml eiskalter Puffer P3 zugesetzt, das Reaktionsgefäß sofort invertiert und die Probe 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer und Proteine abzentrifugiert (30 min, 15000 rpm, 4 °C) und der Überstand auf eine zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibrierte Anionenaustauscher-Säule gegeben. Danach wurde die Säule zweimal mit jeweils 10 ml QC-Puffer gewaschen, bevor die plasmidäre DNA durch Zugabe von 5 ml QF-Puffer eluiert werden konnte. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol gefällt und zentrifugiert (30 min, 15000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit Ethanol (70 %) gewaschen (Zentrifugation für 10 min bei 15000 rpm). Anschließend wurde die Plasmid-DNA bei 37 °C für 30 min getrocknet und in 50 µl EB-Puffer gelöst. Es folgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.8.1). Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.7 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA

2.2.7.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Um Nukleinsäure-Lösungen von Verunreinigungen wie Proteinen, Polysacchariden und SDS zu befreien, werden diese Lösungen einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Durch die Phenolbehandlung werden die Proteine denaturiert, während Chloroform und Isoamylalkohol die Phasentrennung fördern. Nach Zentrifugation sammeln sich die Proteine in der unteren, organischen Phase an, wohingegen die DNA in der oberen, wässrigen Phase gelöst verbleibt.

Zur Durchführung der Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die wässrige DNA-Lösung in Form von 500 µl-Aliquots auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und mit 1 Vol. eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt. Nach gründlichem Mischen und Zentrifugation (5 min, 13000 rpm) war eine Trennung der Phasen erkennbar.

Die obere, wässrige Phase wurde erneut mit 1 Vol. des oben genannten Gemisches extrahiert. Nach Überführung der DNA-haltigen, wässrigen Phase in ein sauberes 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde zur Entfernung von Phenolresten zweimal mit jeweils 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Abschließend wurde die DNA aus der wässrigen Phase durch eine Alkoholpräzipitation (siehe 2.2.7.2) gefällt.

2.2.7.2 Alkoholpräzipitation

Nukleinsäuren verfügen in wässriger Lösung über eine Hydrathülle, welche durch die Zugabe von Alkoholen wie Isopropanol und/oder Salzen wie Lithiumchlorid entzogen wird, so dass es zur Präzipitation der DNA bzw. der RNA kommt. Auf diese Weise ist eine Reinigung und Aufkonzentrierung von Nukleinsäuren möglich.

Für eine Alkohol-Präzipitation wurden DNA-haltige Lösungen mit 1 Vol. Isopropanol versetzt, gemischt und durch Zentrifugation (30 min, 17000 rpm) präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde zur Entfernung von Salzen mit 200 µl Ethanol (70 %) überschichtet und erneut zentrifugiert (10 min, 17000 rpm). Anschließend folgte das Trocknen der DNA bei 37 °C für 30 min sowie die Aufnahme in 20 bis 40 µl EB-Puffer. Zur Verbesserung der Fällungseffizienz kann dem Isopropanol 1/50 Vol. LiCl-Lösung (4 M) zugesetzt werden.

2.2.7.3 Aufreinigung von PCR-Produkten mittels Silika-Säulen

Um die in einem PCR-Ansatz vorhandenen Nukleotide, Primer sowie die DNA-Polymerase zu entfernen oder einen Restriktionsansatz aufzureinigen, wurde das QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen GmbH verwendet.

Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 5 Vol. Bindepuffer (PB-Puffer) versetzt und auf eine QIAquick-Säule gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min bei 13000 rpm wurde der Durchfluß verworfen, die Säule mit 500 µl PE-Puffer gewaschen und erneut für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule ein weiteres Mal zentrifugiert, um störende Reste des Waschpuffers zu entfernen. Die Elution erfolgte nach Zugabe von 30 - 50 µl dH₂O oder EB-Puffer durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm.

2.2.7.4 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolation und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma Qiagen GmbH.

Zunächst wurde das entsprechende DNA-Fragment nach erfolgter Elektrophorese (siehe 2.2.9) mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel geschnitten und die Agarosestücke in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Pro 100 mg Agarose wurden 300 µl des Bindungspuffers

(QG-Puffer) zugesetzt und die Ansätze für 10 min bei 50 °C inkubiert. Während dieser Zeit wurde der Ansatz einige Male gründlich gevortext, um das Lösen zu erleichtern. Nachdem die Agarose vollständig gelöst war, wurde Isopropanol (1 Vol. des ursprünglichen Gelstücks) zugesetzt, und die Ansätze durch Inversion gemischt. Anschließend wurden die Proben in 800 µl-Aliquots auf eine in einem 2 ml-Auffanggefäß befindliche Spin-Säule gegeben, für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Betrug das Probenvolumen mehr als 800 µl, so wurde der letzte Schritt entsprechend oft wiederholt. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl QG-Puffer beladen und erneut zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Zum Waschen wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und es wurde erneut zentrifugiert (1 min, 13000 rpm). Um die Reste des Waschpuffers vollständig zu entfernen wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt. Abschließend wurde die Säule in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 30 - 50 µl dH₂O oder EB-Puffer wurde die DNA von der Säule eluiert (1 min, 13000 rpm).

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen

2.2.8.1 Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Zur genauen Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren wurde ein Aliquot der Probe ad 300 µl mit dH₂O aufgefüllt und die Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren), 280 nm (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren) und 310 nm (Grundabsorption von Nukleinsäuren) in einer Quarzglasküvette (Schichtdicke: 1 cm) bestimmt. Die Reinheit der Nukleinsäure-Lösung ergibt sich aus dem Quotienten A_{260}/A_{280} , jeweils abzüglich der Basalabsorption:

$$\text{Reinheit}_{\text{(Nukleinsäuren)}} = \frac{(A_{260} - A_{310})}{(A_{280} - A_{310})}$$

Bei einer sauberen Präparation liegt das Verhältnis zwischen 1,9 und 2,1. Niedrigere Werte sind auf Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Phenol zurückzuführen. Bezüglich der Konzentration gilt für eine saubere Präparation der folgende Zusammenhang: ein A_{260} -Wert von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Die Konzentration von DNA-Proben wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$c \text{ (in } \mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260} \text{ nm} - A_{310} \text{ nm}) \cdot 0,05 \cdot \text{VF}$$

c = Konzentration der DNA-Probe; A_{260} = Absorption bei 260 nm; A_{310} = Absorption bei 310 nm; 0,05 = Extinktionskoeffizient von DNA; VF = Verdünnungsfaktor.

Zur Messung von RNA-Proben wurde die RNA-Lösung in RNase-freiem TE-Puffer (pH 7,5) verdünnt, da das Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} durch den pH-Wert beeinflusst wird (305) und reines H_2O nicht gepuffert ist. Nur bei Werten $>1,9$ wurde die RNA für weitere Untersuchungen verwendet.

Zur Berechnung der Konzentration von RNA-Proben wurde der spezifische Extinktionskoeffizient von RNA (0,4) eingesetzt.

2.2.8.2 Abschätzung der Konzentration im Agarosegel

Für einige Arbeitsschritte (wie z. B. Restriktion, Ligation etc.) genügt es, die Konzentration der Nukleinsäuren im Agarosegel (siehe 2.2.9.) abzuschätzen. Dazu wurde nach erfolgter Gelelektrophorese die DNA-Konzentration durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von Probe und Molekulargewichtsmarker (Smart Ladder, Eurogentec) abgeschätzt.

2.2.9. Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um eine Standardmethode zur Trennung und Identifizierung von Nukleinsäure-Fragmenten entsprechend ihrer Größe. Dieses biochemische Trennverfahren nutzt die Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld aus. Da Nukleinsäuren aufgrund des Zucker-Phosphat-Rückgrats über eine negative Ladung verfügen, wandern sie in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Geschwindigkeit hängt dabei sowohl von der Ladung (abhängig von der Molekülgröße) als auch von der Form der Moleküle ab.

Bei der Elektrophorese von Nukleinsäuren werden in der Regel Agarosegele in Form von horizontalen Platten-Gelen eingesetzt. Bei Agarose handelt es sich um ein dreidimensional vernetztes Algenpolysaccharid, welches als Molekularsieb fungiert. Große Moleküle werden stärker zurückgehalten und wandern dementsprechend langsamer als kleine Moleküle. Innerhalb eines bestimmten Größenbereichs (0,1 – 10 kb) verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit linearer, doppelsträngiger Nukleinsäure-Moleküle umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare (113). Durch Variation der Agarose-Konzentration (0,5 – 2,5 % (w/v)) lässt sich die Porengröße und damit die Auflösung des Gels verändern (176). Eine definierte Auftrennung ist im Bereich von 0,1 kb bis 20 kb möglich. Für größere Fragmente sind spezielle Elektrophoresetechniken (z. B. Pulsfeldgelelektrophorese) erforderlich. DNA-

Moleküle, die kleiner als 1000 bp sind, lassen sich effizienter in Polyacrylamid-Gelen auftrennen.

Zur Größenbestimmung der Nukleinsäure-Moleküle wird zusätzlich ein Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen. Die Größe eines unbekannten Fragments kann dann anhand eines Vergleichs mit den Markerbanden abgeschätzt bzw. durch die Bestimmung einer Eichgeraden rechnerisch ermittelt werden.

Durch das Anfärben der Gele mit Ethidiumbromid werden die DNA-Fragmente visualisiert. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der zwischen einzelne Basenpaare des Nukleinsäure-Moleküls interkaliert. Bei Anregung mit UV-Licht (302 nm) zeigt dieser Farbstoff eine charakteristische, orange Fluoreszenz (590 nm), wobei die Intensität proportional zu der Menge gebundener Nukleinsäure ist.

Es wurde mit 0,7 - 2,0 %igen (w/v) Agarosegelen gearbeitet, wobei die Agarose in TAE-Puffer (0,5 x) durch Aufkochen gelöst wurde. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt und die Lösung konnte auf einen Gelträger gegossen werden. Die Elektrophoresen wurden in horizontalen, mit TAE-Puffer (0,5 x) gefüllten Gelkammern durchgeführt. Vor dem Auftragen in die Probentaschen des erstarrten Gels wurden die DNA-Proben mit 1/5 Vol. Gelladepuffer (5 x) versetzt. Dieser enthält die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol anhand derer die Laufweite der Elektrophorese überprüft werden kann. Die Elektrophorese wurde bei Feldstärken zwischen 3 -10 V/cm durchgeführt. Nach dem Lauf konnte das Gel auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302 nm ausgewertet sowie photographisch erfasst werden.

2.2.10 In-vitro-Amplifikation von DNA

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein In-vitro-Verfahren zur selektiven Anreicherung von DNA-Bereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von DNA-Molekülen (132). Als Matrize (Template-DNA) dient ein Abschnitt doppelsträngiger DNA, dessen Sequenz in den Randbereichen bekannt ist. Der DNA-Doppelstrang wird durch Hitzebehandlung denaturiert, und die entstehenden Einzelstränge werden mit zwei kurzen Oligonukleotiden (Primern), welche die gewünschte DNA-Sequenz einschließen, hybridisiert. Ausgehend von den Primern, die strangspezifisch und antiparallel zueinander binden, wird die Template-DNA amplifiziert. Entscheidend für die Stringenz der Primer-Bindung ist u. a. die Basenzusammensetzung der Primer, wovon wiederum deren Hybridisierungstemperatur (T_A) abhängt. Letztere berechnet sich nach folgender Formel: $[(\text{Anzahl der Basen A} + \text{T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{Anzahl der Basen G} + \text{C}) \times 4^\circ\text{C}] - 5^\circ\text{C} = T_A$ (133). Üblicherweise werden Primer mit einer Länge von 20 bis 25 Nukleotiden verwendet, da mit zunehmender Länge die

Hybridisierungszeit zunimmt. Die Mindestlänge ergibt sich dadurch, dass die Primer-Sequenz möglichst nur einmal im gesamten Genom auftreten sollte (167). Nach Hybridisierung der Oligonukleotide an die Template-DNA, dienen die freien 3'-OH-Enden der Primer als Startpunkte für die DNA-Polymerase, die den Doppelstrang vervollständigt. Die für dieses Verfahren verwendeten hitzestabilen Enzyme stammen z. B. aus den thermophilen Bakterien *Thermus aquaticus* (*Taq*-DNA-Polymerase), *Pyrococcus woessii* (*Pwo*-DNA-Polymerase), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-DNA-Polymerase) oder aus *Thermococcus litoralis* (*Vent*-DNA-Polymerase). Solche Enzyme sind für begrenzte Zeit auch bei Temperaturen von bis zu 98 °C stabil, so dass der PCR-Zyklus aus 1. Denaturierung des DNA-Doppelstranges, 2. Hybridisierung der Primer und 3. DNA-Synthese ohne erneute Zugabe der DNA-Polymerase wiederholt werden kann. Auf diese Weise kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des DNA-Templates, so dass die Molekülanzahl nach 25 - 30 Zyklen auf das bis zu 10⁶-fache angestiegen sein kann (217). Die verschiedenen DNA-Polymerasen unterscheiden sich teilweise in ihren Eigenschaften. So besitzen die *Pwo*-, die *Pfu*- sowie die *Vent*-Polymerase eine höhere Temperaturstabilität als die *Taq*-DNA-Polymerase, sowie eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die eine Fehlerkorrektur (*proof reading*) erlaubt. Die *Taq*-DNA-Polymerase generiert hingegen Produkte, die einen Poly(A)-Basenüberhang besitzen, so dass eine *blunt end*-Klonierung nur sehr ineffektiv verläuft. Ein entscheidender Vorteil der *Taq*-DNA-Polymerase ist die hohe Syntheseleistung (ca. 1000 bp pro min), während die *Pwo*- sowie die *Pfu*-DNA-Polymerase beispielsweise nur eine Leistung von etwa 550 bp pro Minute erreichen (203). Ein 25 µl-Reaktionsansatz für eine *hot start*-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

DNA-Polymerase-Puffer (10 x)	2,5 µl
dNTP-Lösung (2 mM)	2,5 µl
3'- Primer (10 µM)	1 µl
5'- Primer (10 µM)	1 µl
Template-DNA (0,05 - 0,2 µg/µl)	1 µl
dH ₂ O	ad 24,5 µl

Je nach MgCl₂-Konzentration des Polymerase-Puffers wurde dem Ansatz zusätzlich MgCl₂ zugefügt (Endkonzentration von 0,5 - 4 mM). Optional wurde, z. B. bei der Amplifikation von Plasmiden, DMSO zur Erleichterung der Denaturierung zugegeben. Nach dem *hot start*, wurde den Ansätzen 0,5 µl (5 U/µl) der entsprechenden DNA-Polymerase zugesetzt.

Mit Ausnahme des für die Sequenzierungsreaktionen verwendeten Programms (siehe 2.2.13), folgten alle verwendeten PCR-Programme einem einheitlichen Grundaufbau, wobei die Schritte 2 bis 4 wiederholt wurden (25 - 30 x).

- | | |
|----------------------------------|--|
| 1. <u>Initiale Denaturierung</u> | 4 min bei 95 °C (anschließend <i>hot start</i> zur Vermeidung unspezifischer Primer-Bindung) |
| 2. <u>Denaturierung</u> | 30 s bei 94 °C |
| 3. <u>Hybridisierung</u> | 30 s bei T _A (je nach Primer-Paar) |
| 4. <u>Elongation</u> | X min (je nach DNA-Polymerase und erwarteter Amplifikatlänge) bei 72 °C |
| 5. <u>Terminale Elongation</u> | 5 min bei 72 °C |
| 6. <u>Kühlen der Proben</u> | ∞ bei 4 °C |

2.2.11 Modifizierung von DNA

2.2.11.1 Restriktion von DNA

Sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen sind für Klonierungsreaktionen unerlässlich, da mit ihrer Hilfe spezifische DNA-Fragmente hergestellt werden können, die sich später wieder zusammenfügen lassen (siehe 2.2.11.3 Ligation). Ursprünglich schützen sich Bakterien mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen vor dem Eindringen fremder DNA. Artfremde DNA wird abgebaut, während die eigene DNA durch Modifikationen vor der Restriktion geschützt ist. Es werden drei Klassen von Restriktionsendonukleasen unterschieden, wobei die Enzyme der Klassen I und III in der Molekularbiologie nur von untergeordneter Bedeutung sind. Die Restriktionsendonukleasen vom Typ II hydrolysieren den DNA-Doppelstrang, unter Nutzung von Mg²⁺-Ionen als Cofaktor, an spezifischen Erkennungssequenzen, wobei es sich zumeist um Palindrome, d. h. tetra- bis octamere Sequenzen mit zweizähliger Symmetrieachse handelt. Je nach verwendetem Enzym können glatte (*blunt ends*) oder bei einer versetzten Spaltung überhängende DNA-Enden (*sticky ends*) entstehen. Die Enzymmenge für eine vollständige DNA-Spaltung ist abhängig von der Größe und Menge der DNA, der Anzahl der vorhandenen Schnittstellen sowie der Inkubationsdauer. Die Berechnung erfolgt nach der folgenden Formel:

$$Enzym(U) = \frac{\mu g x (5 \times 10^4) x S_V}{bp DNA x S_\lambda x h}$$

S_V = Schnittstellen in der zu spaltenden DNA; S_λ = Schnittstellen in λ-DNA; h = Inkubationszeit

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sowie die entsprechenden Puffer wurden von der Firma New England Biolabs GmbH bzw. Fermentas GmbH bezogen.

Neben der DNA, dem entsprechenden Restriktionspuffer, sowie dem Enzym wurde je nach Angabe des Herstellers 1/10 Vol. BSA (10 x) zugesetzt. In der Regel wurde mit 20 µl-Ansätzen gearbeitet, die dann mit dH₂O aufgefüllt wurden. Die Reaktionsansätze wurden je nach Enzym für 1 - 4 h in der Regel bei 37 °C inkubiert (Ausnahmen wie *Sma*I benötigen 25 °C). Sofern notwendig wurden die Reaktionen durch Hitzeinaktivierung (20 min, 65 °C) der Enzyme abgestoppt. Für Doppelrestriktionen mit zwei Enzymen wurde der laut Hersteller beste Puffer für beide Enzyme ausgewählt. Bei unvollständiger Restriktionsspaltung wurden die Reaktionen nacheinander durchgeführt, wobei der Ansatz zwischendurch aufgereinigt wurde (siehe 2.2.7.3).

2.2.11.2 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Durch die Dephosphorylierung der 5'-DNA-Phosphat-Enden kann eine unerwünschte Religation einer vorher durch Restriktionsspaltung linearisierten Vektor-DNA verhindert werden, da die Phosphatreste an den 5'-DNA-Enden von DNA-Fragmenten für die Ligation unerlässlich sind (siehe 2.2.11.3). Wird ein PCR-Produkt als Insert-DNA eingesetzt, ist ein solches Verfahren unangebracht, da das Amplifikat selbst über keine phosphorylierten 5'-DNA-Enden verfügt. Üblicherweise wird zur Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden entweder die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestine alkaline phosphatase*, CIP) oder die alkalische Phosphatase aus Shrimps (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) eingesetzt. Letztere hat im Gegenteil zu der CIP den praktischen Vorteil mittels Hitzeinaktivierung denaturiert werden zu können.

Die entsprechende Menge an Vektor-DNA wurde mit 1/10 Vol. Dephosphorylierungspuffer (10 x) sowie 1 U Phosphatase versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung (15 min, 65 °C) der SAP, konnte der Ansatz direkt für eine anschließende Ligation eingesetzt werden.

2.2.11.3 Ligation von DNA

Für Ligationen von Vektor- und Insert-DNA wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 eingesetzt, welche die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA-Moleküle katalysiert. Die T4-DNA-Ligase ist Mg²⁺- sowie ATP-abhängig und in der Lage sowohl glatte Enden (*blunt ends*) als auch überhängende Enden (*sticky ends*) zu verknüpfen. Das molare Verhältnis

von Vektor- zu Insert-DNA sollte zwischen 1:5 (bei überhängenden Enden) und 1:10 (bei glatten Enden) liegen.

In der Regel wurde die sogenannte Schnell-Ligation angewandt, bei der neben der Vektor- sowie der Insert-DNA, 1 - 2 U T4-Ligase und dem eigens hergestellten Ligationspuffer (siehe Tab. 2.7) 10 mM Hexamincobalttrichlorid zugesetzt wird, welches die Reaktion beschleunigt. Durch Zugabe von 80 mM KCl wurde die Reaktion, nach 10 min bei der Verknüpfung kohäsiver Enden bzw. nach 60 min bei der Verknüpfung glatter Enden (Inkubation bei RT), abgestoppt. Der Ansatz konnte bei -20 °C gelagert oder direkt zur Transformation eingesetzt werden. Wurde der Ligationsansatz mittels Elektroporation transformiert, wurden die vorhandenen Salze zuvor mittels Ethanolfällung (siehe 2.2.7.2) eliminiert.

2.2.12 Herstellung kompetenter Bakterienzellen und Transformation

Unter Transformation wird die Aufnahme frei vorliegender DNA in eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle verstanden (307). Da Bakterien DNA in der Regel nur mit relativ geringer Effizienz aus der Umgebung aufnehmen (natürliche Kompetenz), werden die Zellen zur Steigerung der Transformationseffizienz einer physikalischen und/oder chemischen Behandlung unterzogen (Herstellung kompetenter Zellen).

2.2.12.1 Herstellung kompetenter Bakterien nach der CaCl_2 -Methode

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen werden die Zellen nach der Ernte in einer eiskalten CaCl_2 -Lösung inkubiert (175). Die Behandlung mit bivalenten Kationen sowie die anschließende Aufbewahrung in der Kälte führen zu einer Veränderung der Zelloberfläche, wodurch die DNA-Aufnahme ermöglicht wird (30).

Zunächst wurde aus einer 3 ml Über-Nacht-Kultur des zu transformierenden Stammes ein 50 ml LB-Kolben 1 %ig angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{546\text{nm}}$ von 0,4 - 0,6 kultiviert (30 °C bzw. 37 °C, 130 rpm). Nach Erreichen der gewünschten OD wurde die Zellsuspension für etwa 10 min auf Eis gelagert, bevor die Zellen durch Zentrifugation (7 min, 5500 rpm, 4 °C) geerntet wurden, der Überstand verworfen und das Pellet auf Eis gelagert wurde.

Herstellung kompetenter Zellen zur sofortigen Verwendung: Die geernteten Zellen wurden in 10 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung (100 mM) resuspendiert und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (7 min, 5500 rpm, 4 °C) wurden die Zellen in 1 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung (100 mM) aufgenommen (kompetente Zellen) und bei 4 °C aufbewahrt.

In der Regel wurden die kompetenten Zellen direkt zur Transformation eingesetzt. Eine längere Lagerung auf Eis (einige Stunden oder auch über Nacht) kann unter Umständen die Kompetenz des Stammes erhöhen. Findet die Transformation jedoch erst nach 24 h oder später statt, sinkt die Transformationseffizienz deutlich unter die üblichen Raten von 10^6 bis 10^7 Kolonien pro μg transformierter DNA (58).

Herstellung gefrierkompetenter Zellen: Nach Ernte der Zellen wurde das Pellet in 10 ml eiskaltem TBF1-Puffer resuspendiert und nach 10-minütiger Inkubation bei 4 °C erneut zentrifugiert (7 min, 5500 rpm, 4 °C). Anschließend wurde das Pellet in 2 ml TBF2-Puffer aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und schließlich in 200 μl -Aliquots bei -80 °C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut.

2.2.12.2 Transformation nach der Methode von Hanahan

Zur Transformation nach Hanahan (103) wurden jeweils 100 μl der kompetenten Zellen (siehe 2.2.12.1) mit 100 - 200 ng Plasmid-DNA bzw. mit dem Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. In dieser Zeit lagert sich die freie DNA an die Zelle an. Anschließend wurde der Ansatz für 90 s bei 42 °C inkubiert und die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt. Durch den Hitzeschritt und das Abkühlen wird die Membrandurchlässigkeit erhöht, so dass der DNA-Transfer stattfinden kann (260). Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml SOC-Medium und Inkubation bei 130 rpm und der entsprechenden Wachstumstemperatur (30 °C bzw. 37 °C) für 1 h regeneriert. Zur Selektion positiver Transformanten wurden die regenerierten Zellen in verschiedenen Aliquots (20 - 200 μl) auf entsprechenden Selektivnährböden ausplattiert und bei der entsprechenden Wachstumstemperatur über Nacht inkubiert.

Sofern notwendig, diente ein 200 μl -Aliquot, versetzt mit 200 ng des Vektors pBR322 als Positivkontrolle bzw. ein 200 μl -Aliquot ohne DNA als Negativkontrolle.

2.2.12.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Als Alternative zur Transformation chemisch kompetenter Zellen bietet sich die Möglichkeit der Verwendung elektrokompetenter Zellen. Dabei erhöht ein, durch eine angelegte Spannung erzeugtes, elektrisches Feld die Membranpermeabilität (67). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Stämme von *Salmonella* spec. mittels Elektroporation transformiert, da mit der CaCl_2 -Methode keine ausreichenden Ergebnisse erzielt werden konnten und die durch Elektroporation erreichte Transformationseffizienz deutlich höher lag.

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde aus einer Über-Nacht-Kultur in SOB-Medium eine 1:100 Verdünnung in 50 ml SOB hergestellt und bei 30 °C bzw. 37 °C und 130 rpm bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,6 kultiviert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 30 min auf Eis gelagert und dann durch Zentrifugation (12 min, 5500 rpm, 4 °C) geerntet. Das Pellet wurde dann zweimal in eiskaltem dH_2O gewaschen, wozu die Zellen jeweils in 5 ml dH_2O aufgenommen und anschließend zentrifugiert (12 min, 5500 rpm, 4 °C) wurden. Abschließend wurden die kompetenten Zellen in 500 μ l eiskaltem dH_2O aufgenommen und direkt für die Elektroporation eingesetzt. Alternativ konnten die Zellen auch in 10 %iger Glycerinlösung gewaschen und zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden. Höhere Transformationseffizienzen ließen sich jedoch durch Waschen in dH_2O und sofortige Verwendung erreichen.

2.2.12.4 Elektroporation

Pro Ansatz wurden 50 μ l der elektrokompetenten Zellen (siehe 2.2.12.3) mit der zu transformierenden DNA versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und in eine ebenfalls auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 0,2 cm) gegeben. In salzhaltiger Lösung verliegende Nukleinsäuren wurden vor der Elektroporation einer Alkoholpräzipitation (siehe 2.2.7.2) unterzogen und anschließend in dH_2O aufgenommen, um einen Kurzschluß zu vermeiden.

Der elektrische Puls (Spannung: 2,5 kV; Kapazität: 25 μ F; Widerstand: 200 Ω) erfolgte im GenePulser der Firma Biorad Laboratories. Anschließend wurden die gepulsten Zellen regeneriert, indem zügig 1 ml SOC-Medium mit einer sterilen Pasteurpipette in die Küvette gegeben wurde, der gesamte Ansatz dann in ein steriles Reagenzglas überführt und schließlich für 1 h bei 130 rpm und der entsprechenden Wachstumstemperatur inkubiert wurde. Zur Selektion positiver Transformanten wurden die regenerierten Zellen in verschiedenen Aliquots (20 - 200 μ l) auf antibiotikahaltigem TYE-Nährboden ausplattiert und bei der entsprechenden Wachstumstemperatur über Nacht inkubiert. Zur erneuten Verwendung der Elektroporationsküvetten (maximal dreimal insgesamt) wurden diese mit 0,1 %iger HCl-Lösung gespült, über Nacht in Ethanol gelagert und anschließend getrocknet.

2.2.13 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit Hilfe des DNA-Sequenzers ABI PRISM™ 310 und dem Sequencer Kit der Firma Applied Biosystems nach einer modifizierten, nicht-radioaktiven Form der Kettenabbruchmethode (270). Grundlage des automatischen Verfahrens ist das *Cycle Sequencing*, wobei das DNA-Template mit nur einem Primer

amplifiziert wird. Dem Ansatz werden neben den vier dNTPs geringe Mengen von 2'-3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphaten (ddNTPs) mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen zugesetzt. Nach Einbau eines ddNTPs kommt es aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am C3-Atom der Desoxyribose zum Kettenabbruch. Auf diese Weise entsteht ein statistisch verteiltes Gemisch von Fragmenten unterschiedlicher Kettenlänge und je nach Base entsprechender Farbmarkierung. Dieses Fragmentgemisch wird dann im DNA-Sequencer mittels Kapillarelektrophorese nach der Größe aufgetrennt. Mittels Laser werden die unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen der ddNTPs detektiert, so dass sich die Sequenz der untersuchten DNA aus der Abfolge der auftretenden basenspezifischen Farbsignale ergibt. Mit Hilfe einer Software (ABI-CE, Version 3.0, Perkin Elmer Corporation) werden die Farbsignale schließlich in die entsprechende Basenreihenfolge übersetzt.

Zunächst wurde das zu sequenzierende Fragment zunächst über eine Standard-PCR (siehe 2.2.10) amplifiziert. Dieses Fragment wurde anschließend mittels PCR-Purifikation Kit der Firma Qiagen GmbH aufgereinigt (siehe 2.2.7.3) und die Konzentration wurde im Agarosegel abgeschätzt (siehe 2.2.8.2). Anschließend folgte das *Cycle Sequencing*. Der Standardansatz von 20 µl enthielt die DNA, den Sequenzierungspuffer, den *Big Dye* (Mix aus Polymerase und ddNTPs) sowie den Sequenzier-Primer (10 pmol/µl). Bei der Sequenzierung von Plasmiden wurde zudem DMSO zugesetzt und ohne *Big Dye* für 5 min bei 96 °C vorinkubiert, um eine vollständige Denaturierung zu erreichen. Das verwendete PCR-Programm für das *Cycle Sequencing* beinhaltete die folgenden Schritte, wobei die Schritte 2 - 4 wiederholt wurden (25 x).

- | | |
|----------------------------------|------------------|
| 1. <u>Initiale Denaturierung</u> | 2 min bei 96 °C |
| 2. <u>Denaturierung</u> | 10 min bei 96 °C |
| 3. <u>Hybridisierung</u> | 5 s bei 60 °C |
| 4. <u>Synthese</u> | 4 min bei 60 °C |

Nach dem *Cycle Sequencing* erfolgte eine Aufreinigung der PCR-Ansätze mittels Alkoholpräzipitation. Zu jedem Ansatz wurden 80 µl dH₂O, 10 µl 3 M Natriumacetat sowie 250 µl 100 %iger Ethanol (p. A.) gegeben, bevor die Proben für 25 min bei 17000 rpm (RT) zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 400 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (25 min, 17000 rpm, RT) wurde die DNA für 30 min bei 37 °C lichtgeschützt getrocknet. Anschließend wurden die DNA-Pellets in 20 µl HiDi (Formamid) aufgenommen. Nach der automatischen Sequenzierung wurden die Basensequenzen mittels der Software Vector NTI ausgewertet.

2.2.14 Gendisruption nach Datsenko & Wanner

Neben der Verwendung des zelleigenen RecABC-Systems (197) kann das Rekombinationssystem des Phagen λ zur In-vitro-Mutagenese mittels homologer Rekombination genutzt werden (200, 201, 240, 241). Das λ -Red-System ermöglicht die Integration kleiner DNA-Fragmente mittels sequenzspezifischer Rekombination in das Bakterienchromosom. Normalerweise werden kurze DNA-Fragmente von zelleigenen Exonukleasen abgebaut, welche bei dieser Methode jedoch durch das Phagenprotein Gamma inhibiert werden. Die Phagenproteine Beta (ssDNA *annealing protein*) und Exo (5'-3'-Exonuklease) interagieren mit der transformierten DNA und führen die sequenzspezifische Rekombination durch.

Court et al. (73, 318) sowie Datsenko & Wanner (59) erhöhten die Expression des λ -Red-Systems durch Klonierung der Phagengene hinter regulierbare Promotoren. Während Court et al. den temperatursensitiven $\text{cl}857$ Repressor sowie λ P_L - und P_R -Promotoren verwendeten, nutzten Datsenko & Wanner den Promotor des Arabinose-Operons (pARA) inklusive des bifunktionalen Regulators AraC, wobei die Genexpression durch Zugabe von L-Arabinose induziert wird. Datsenko & Wanner konstruierten das Helferplasmid pKD46 (siehe Abb. 2.1), welches zusätzlich zu dem Arabinose-Promotor und den λ -Red-Genen über einen temperatursensitiven Replikationsursprung sowie eine Ampicillinresistenz-Kassette verfügt.

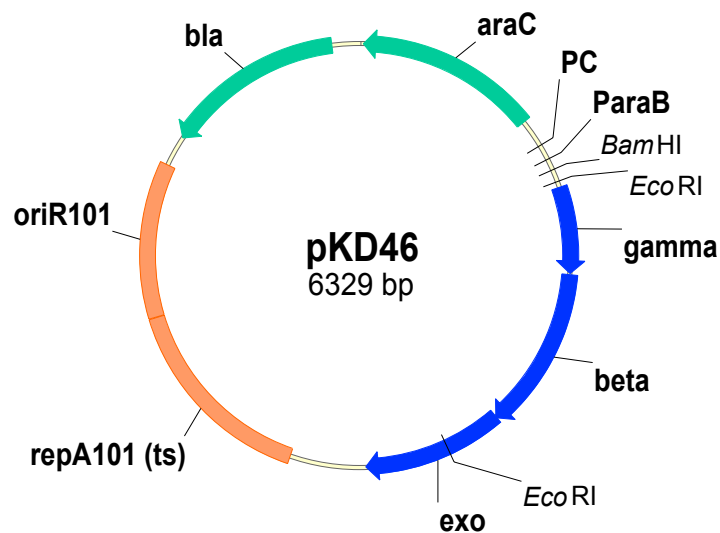


Abb. 2.1: λ -Red-Rekombinase-Vektor pKD46 (59). *bla* = Ampicillinresistenz- Kassette; *araC* = bifunktionaler Regulator; *ParaB/C* = Promotor des Arabinose-Operons; *gamma/ beta/ exo* = Phagengene; *oriR101/ repA101ts* = temperatursensitiver Replikationsursprung.

Zunächst wurde das Helferplasmid pKD46 mittels Elektroporation (siehe 2.2.12.3 und 2.2.12.4) in die *Salmonella* Hadar-Zellen gebracht und die Transformanten auf TYE-Agarplatten + Ampicillin (100 µg/ml) bei 30 °C selektiert. Anschließend wurden die das Helferplasmid tragenden Zellen mit einem zuvor mittels PCR (siehe 2.2.10) hergestellten DNA-Fragment transformiert. Als Matrize diente das Template-Plasmid pKD4 (59), welches über eine von *FRT*-sites flankierte Kanamycinresistenz-Kassette verfügt (siehe Abb. 2.2). Bei den *FRT*-sites (*FLP recognition target*) handelt es sich um Erkennungssequenzen der FLP-Rekombinase, einer sequenzspezifischen Integrase (12), die an spezifischen Positionen schneidet und religiert. Auf diese Weise kann die Kanamycinresistenz-Kassette wieder eliminiert werden, wobei nur eine wenige Basenpaare große Narbensequenz zurück bleibt.

Für die PCR des DNA-Fragmentes aus pKD4 wurden Primer gewählt, die im 5'-Bereich die Sequenzen tragen, die die zu deletierende genomische Region einschließen und im 3'-Bereich Basenabfolgen, die mit den sogenannten *priming sites* des Template-Plasmids hybridisieren. Kommt es dann zur homologen Rekombination zwischen dem Genom und dem eingebrachten DNA-Fragment, so ist der genomische Bereich, der sich zwischen den homologen Flanken befand durch die Kanamycinresistenz-Kassette ersetzt und somit deletiert.

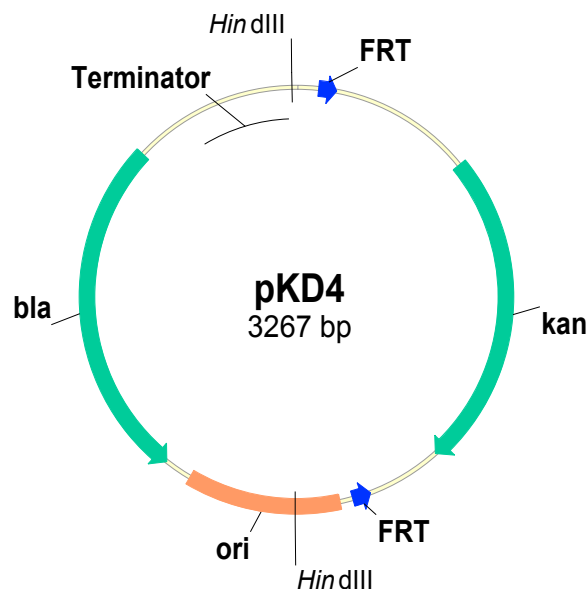


Abb. 2.2: Template-Plasmid pKD4 (59). bla = Ampicillinresistenz-Kassette; kan = Kanamycinresistenz-Kassette; ori = Replikationsursprung; FRT = FLP recognition target.

Praktisch wurden die das Helferplasmid pKD46 tragenden Zellen elektrokompent gemacht. Die Zellsuspension wurde bei einer OD_{600nm} von 0,4, zur Induktion der Phagengene, mit 1 mM L-Arabinose versetzt, dann weiter schüttelnd inkubiert, bei einer

OD_{600nm} von 0,7 einem 15-minütigen Hitzeschock (42 °C) unterzogen, für 10 min auf Eis inkubiert und schließlich geerntet. Die weiteren Schritte zur Herstellung der kompetenten Zellen wurden wie beschrieben (siehe 2.2.12.3) durchgeführt. Anschließend wurde das PCR-Produkt mittels Elektroporation (siehe 2.2.12.4) transformiert und die Zellen bei 37 °C regeneriert. Die homologe Rekombination findet unmittelbar nach Eintritt des DNA-Fragments in die Zelle statt, so dass das Helferplasmid schon während der Regeneration aufgrund des Temperatur-Shiftes auf 37 °C eliminiert wird. Zur Selektion positiver Transformanten wurden die Zellen auf TYE-Agarplatten + Kanamycin (25 µg/ml) aufgebracht. Positive Klone wurden auf Ampicillin-haltigem Nährmedium auf den Verlust des Helferplasids pKD46 überprüft. Anschließend wurde die Integration der Kanamycinresistenz-Kassette mittels PCR (siehe 2.2.10) verifiziert. Die dazu verwendeten Primer sind in dem entsprechenden Ergebnisteil (3.5.1) aufgeführt.

Schließlich wurden die Integranten mit dem Helferplasmid pCP20 (47), welches die FLP-Rekombinase exprimiert, transformiert. pCP20 verfügt über eine Ampicillinresistenz- sowie eine Chloramphenicolresistenz-Kassette und einen temperatursensitiven Replikationsursprung. Zur Selektion positiver Transformanten wurden die Zellen auf TYE-Agarplatten + Ampicillin (100 µg/ml) aufgebracht und zunächst bei 30 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die positiven Transformanten auf TYE-Platten ohne Antibiotikum gepickt und über Nacht bei 43 °C inkubiert. Bei dieser Temperatur wird die FLP-Rekombinase exprimiert und gleichzeitig das Helferplasmid aus der Zelle eliminiert. Anschließend wurden die Klone phänotypisch auf den Verlust der Ampicillin- sowie der Kanamycinresistenz überprüft. Mittels PCR (siehe 2.2.10) wurde die Excision der Kanamycinresistenz-Kassette verifiziert.

2.2.15 Herstellung und Ausstempeln einer chromosomalen Genbank

Mittels Erstellung einer chromosomalen Genbank sollten Effluxpumpen bzw. positive Regulatoren identifiziert werden. Positive Klone, d. h. Klone die ein *shotgun*-Fragment tragen, welches für die Akkumulation von Antibiotika von Bedeutung ist, konnten phänotypisch über eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika identifiziert werden. Anschließend wurden die Plasmide aus den Zellen isoliert, die entsprechenden Inserts sequenziert und in den genomischen Kontext eingeordnet. Um zu ermitteln wie viele Klone erhalten werden müssen, damit mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit jedes Gen in der Genbank vertreten ist, wurde unter Einbeziehung von Fragment- und Genomgröße die folgende Formel verwendet (51, 307):

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-f)}$$

N = Anzahl der Klone; p = Wahrscheinlichkeit mit der ein bestimmtes Gen in der Genbank vorkommen soll; f = Größenverhältnis der Insertion zum Gesamtgenom.

Zunächst wurde die chromosomale DNA des Stammes isoliert, von dessen Genom eine Genbank angelegt werden sollte. Dazu wurde die Isolierung mittels Hexadecyltrimethyl-Ammonium-Bromid (CTAB) (siehe 2.2.6.1.2) durchgeführt, um möglichst reine DNA mit großer Ausbeute zu erhalten. Anschließend wurde die Nukleinsäure mit *Sau3A* partiell verdaut. Die Restriktion wurde dahingehend optimiert, dass etwa 30 % der chromosomalen DNA ungespalten blieb. Dazu wurden diverse Ansätze mit konstanten Mengen an DNA und Enzym unterschiedlich lange inkubiert, bis die Zeit ermittelt war, nach der das optimale Verhältnis von verdauter zu unverdauter DNA vorlag. Für die Erstellung der Genbank wurde die partiell verdaute DNA aus mehreren Ansätzen vereinigt. Nach erfolgter Gelelektrophorese (siehe 2.2.9) wurden die 4 - 5 kb großen Fragmente aus dem Gel isoliert und aufgereinigt (siehe 2.2.7.4). Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in einer großen Gelkammer durchgeführt, um die gewünschten Fragmente nach längerer Auftrennung gezielter ausschneiden zu können.

Als Vektor wurde pBR322 gewählt, der über eine singuläre *Bam*HI-Schnittstelle verfügt, die der Klonierung der kompatiblen *Sau3A*-Fragmente diene. Die *Bam*HI-Erkennungssequenz liegt in einer Tetracyclinresistenz-Kassette, so dass die ein Insert tragenden Klone über den Verlust der Tetracyclinresistenz selektiert werden konnten. Des Weiteren verfügt pBR322 über eine Ampicillinresistenz-Kassette und einen Replikationsursprung, der eine Vermehrung sowohl in *E. coli* als auch in *Salmonella* erlaubt. Mit knapp 4,4 kb besitzt pBR322 eine vergleichsweise geringe Größe, wodurch sich die Möglichkeit ergab, Fragmente von 4 - 5 kb als Inserts zu klonieren. Je größer die Inserts sind, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit ein intaktes Gen inklusive Promotorbereich zu klonieren, desto schwieriger ist es aber auch die erforderliche Anzahl Transformanten zu erhalten, die bekanntlich mit zunehmender Größe der transformierten Plasmide abnimmt. Die Transformationseffizienz ist demnach der limitierende Faktor bei der Auswahl der Fragmentgröße.

Nach der Restriktion von pBR322 mit *Bam*HI wurde der Vektor dephosphoryliert (siehe 2.2.11.2) und die Religationsrate bestimmt. Eine Religationsrate von wenigen Prozent ist tolerierbar, bedeutet aber, dass sich die Anzahl der Transformanten um diesen Prozentsatz erhöht. Anschließend wurde in diversen Testligationen das Verhältnis von Vektor zu Insert ermittelt, bei dem sich die erforderliche Anzahl an Transformanten ergab. War das Verhältnis optimiert, erfolgte nach Ligation die Transformation der Klone

(siehe Abb. 2.3) in den Empfänger-Stamm mittels Elektroporation (siehe 2.2.12.4). Der Ansatz wurde auf Selektionsmedium (TYE-Agar + Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

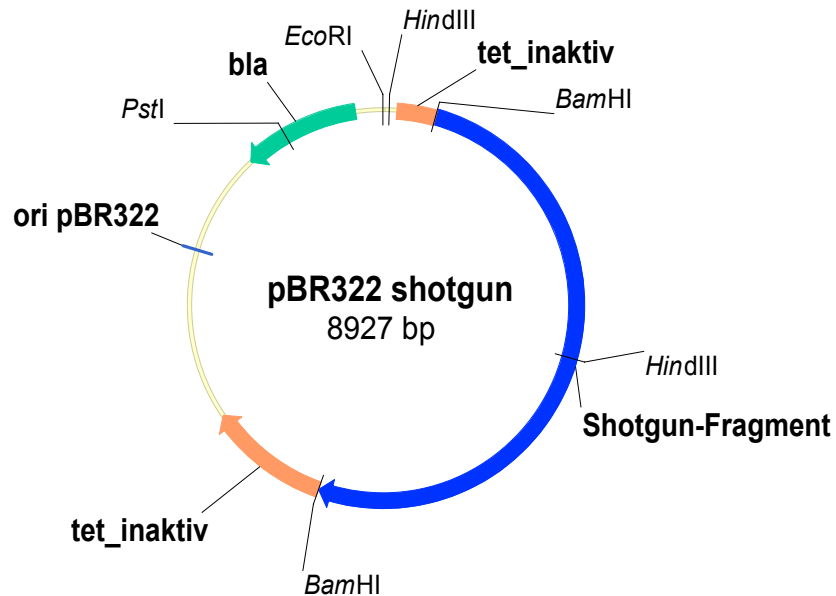


Abb. 2.3: *shotgun*-Klon auf der Basis von pBR322. Kloniert wurde in die *Bam*HI-Schnittstelle. *bla* = Ampicillinresistenz-Kassette; *tet_inaktiv* = durch die Klonierung inaktivierte Tetracyclinresistenz-Kassette; *ori pBR322* = Replikationsursprung.

Anschließend wurden die *shotgun*-Klone zur Konservierung einzeln in die Kavitäten von Mikrotiterplatten gepickt, die jeweils mit 50 µl LB-Bouillon + Ampicillin (100 µg/ml) gefüllt waren. Nach Über-Nacht-Inkubation bei 37 °C wurden die Mikrotiterplatten mit 50 µl LB-Bouillon + Glycerin (30 % $\Rightarrow$ eine Endkonzentration von 15 %) versehen, mit Klebefolie verschlossen und bei -80 °C gelagert.

Zur Analyse der Genbank wurden die *shotgun*-Klone in einer 1:100 Verdünnung in 0,9 %iger NaCl-Lösung auf Selektionsplatten ausgestempelt. Dazu wurde mit einem abgeflamten Replikastempel aus einer angelegten Mikrotiterplatte (etwa 5×10^8 Zellen aus der Über-Nacht-Inkubation) eine weitere Platte beimpft, deren Kavitäten mit 100 µl 0,9 %iger NaCl-Lösung gefüllt waren, (entspricht dann etwa 5×10^6 Zellen, da beim Stempeln circa 1 µl übertragen wird). Aus dieser „Verdünnungsplatte“ wurde dann wiederum auf Selektions-Agarplatten gestempelt (dann etwa 5×10^4 Zellen), welche a) Ciprofloxacin, b) Chloramphenicol und c) Chloramphenicol + den Effluxpumpeninhibitor Phenylalanyl-Arginyl- β -Naphthylamid (64 µg/ml) enthielten. Die Konzentration der Antibiotika betrug 1,5 x die MHK des Empfängerstammes. Die Klone, die nach Über-Nacht-Inkubation Wachstum zeigten, wurden erneut auf Selektionsmedium überimpft. Anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.2.6.2.1), sofern Mischklone

vorlagen durch Retransformation in *E. coli* DH5 α separiert, und sequenziert (siehe 2.2.13). Durch Sequenzvergleich mit dem Genom des klonierten Organismus konnte dann der genomische Kontext des klonierten Fragmentes des entsprechenden *shotgun*-Klons ermittelt werden.

2.2.16 Allgemeines Arbeiten mit RNA

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen und der daraus resultierenden Degradation der RNA, wurden alle Arbeiten mit puderfreien Einmalhandschuhen sowie einem separaten Pipettensatz mit RNase-freien Filterspitzen durchgeführt. Die Arbeiten erfolgten zudem an einem separaten RNase-freien Platz.

Alle Puffer und Lösungen wurden mit RNase-freiem H₂O angesetzt, das durch Zugabe von 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC), kräftiges Schütteln, Inkubation über Nacht bei 37 °C sowie anschließendes Autoklavieren hergestellt wurde. DEPC bildet mit primären und sekundären Aminen kovalente Bindungen, wodurch die RNasen zerstört werden.

Zudem wurden RNase-freie Reaktionsgefäße verwendet bzw. Glasgeräte durch Spülen mit 0,5 %igem SDS und anschließendem Spülen mit RNase-freiem H₂O oder durch Inkubation für 4 h bei 210 °C dekontaminiert.

2.2.17 Isolierung von Gesamt-RNA mit DNase-Behandlung

Die Anzucht des entsprechenden Stammes erfolgte bis zur mittleren log-Phase, die zuvor anhand einer Wachstumskurve bestimmt wurde. In der log-Phase weisen die Bakterienzellen die stärkste Stoffwechselaktivität auf, so dass sich dieser Bereich am Besten zum Vergleich von Genexpressionsmustern eignet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen bei einer OD_{600nm} von 0,7 geerntet.

Um eine Degradation der RNA durch zelluläre RNasen und eine Veränderung der Genexpression während der Präparation zu vermeiden, wurde die zelluläre RNA zunächst stabilisiert. Dazu wurde 1 Vol. Zellsuspension zu 2 Vol. RNeasy Protect™ Bacteria Reagent (Qiagen GmbH) gegeben. Wurde mit 1,5 ml Eppendorfgefäßen gearbeitet, wurden 490 μ l Zellsuspension zu 980 μ l Stabilisierungsreagenz gegeben. Im Folgenden beziehen sich die Angaben der Volumina auf diesen Maßstab. Der Ansatz wurde durch Vortexen gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend folgte die Ernte der Zellen bei 10000 rpm für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde sehr sorgfältig abgenommen und das Pellet entweder zur sofortigen RNA-Isolierung eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

Der Zellaufschluß sowie die RNA-Isolierung erfolgten gemäß dem Protokoll des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen. Das Zellpellet wurde in 100 μ l TE-Puffer + 2 μ l Lysozym (20 mg/ml in H₂O für gramnegative Bakterien, 50 mg/ml in H₂O für grampositive

Bakterien) durch Vortexen resuspendiert. Die anschließende Inkubationszeit von 3 - 5 min (bei RT) konnte abhängig von dem eingesetzten Stamm variieren. Dann folgte die Zugabe von 350 µl RLT-Puffer + 1 % β -Mercaptoethanol, der Ansatz wurde durch Vortexen gemischt und für 2 min inkubiert. Der RLT-Lysispuffer enthält das stark denaturierende Guanidin-Isothiocyanat, welches RNasen sofort denaturiert. Anschließend wurden dem Lysat 250 µl EtOH (abs.) zugefügt, der Ansatz durch Pipettieren gemischt und auf die RNeasy-Säule gegeben. Die Säule verfügt über eine Silicagel-Membran, an welche die RNA absorbiert. Nach der Zentrifugation (15 s bei 10000 rpm) wurde der Durchfluß entfernt und die Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen (erneute Zentrifugation für 15 s bei 10000 rpm). In diesem Schritt wird ein großer Teil der DNA entfernt. Um für nachfolgende Schritte wie reverse Transkription (siehe 2.2.19.1) und real-time PCR (siehe 2.2.19.2) die gesamte DNA zu eliminieren, wurde zusätzlich eine DNase-Behandlung direkt auf der Säule durchgeführt (RNase-Free DNase Set, Qiagen GmbH). Dazu wurden 10 µl DNase I zu 70 µl RDD-Puffer gegeben, vorsichtig gemischt, auf die Säule pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden zum Waschen 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben. Nach Zentrifugation für 15 s bei 10000 rpm wurde der Durchfluß entfernt und die Säule in ein RNase-freies Eppendorf-Gefäß überführt. Im Anschluss wurde die Säule noch zweimal mit jeweils 500 µl RPE-Puffer gewaschen (Zentrifugation wieder für 15 s bei 10000 rpm). Nachdem die Membran trocken zentrifugiert wurde, erfolgte die Elution der RNA in ein RNase-freies Eppendorf-Gefäß. Dazu wurden 30 - 50 µl RNase-freies H₂O auf die Säule pipettiert, für 2 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (1 min bei 10000 rpm). Die RNA wurde dann einer Konzentrationsbestimmung (siehe 2.2.8.1) sowie einer Qualitätsprüfung (siehe 2.2.18) unterzogen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.18 Qualitätsprüfung von RNA

Die Qualität der präparierten Gesamt-RNA wurde durch Gelelektrophorese in einem 1 %igen TAE-Agarosegel anhand der rRNA-Banden überprüft. Intakte, nicht degradierte RNA zeichnet sich durch zwei distinkte rRNA-Banden aus, wobei das Verhältnis von 23S rRNA zu 16S rRNA etwa 2:1 beträgt. Da die 23S rRNA aufgrund ihrer Größe instabiler ist als die 16S rRNA, ist auch ein Verhältnis von 1 - 1,5:1 akzeptabel. Wichtig ist jedoch, dass sich in dem Bereich zwischen den Banden sowie darunter keine abgebaute RNA befindet. Dann ist die RNA intakt und kann für nachfolgende Reaktionen, wie reverse Transkription (siehe 2.2.19.1), eingesetzt werden.

Zur Auflösung von Sekundärstrukturen wurde die RNA vor dem Auftragen auf das Gel in einem EtBr-haltigen denaturierenden 5 x RNA-Ladepuffer bei 75 °C für 10 min

inkubiert (215) und auf Eis abgekühlt. Um Kontaminationen mit RNasen zu verhindern, wurde die Elektrophoresekammer, das Gelrack sowie der Kamm mit 0,5 %iger SDS-Lösung gereinigt und anschließend mit RNase-freiem H₂O (aus der Millipor-Anlage) gespült.

2.2.19 Quantitative real-time PCR

Zur Quantifizierung der Expression bestimmter Gene, wird die isolierte mRNA (siehe 2.2.17) zunächst in einer reversen Transkriptase-Reaktion (RT) in cDNA umgeschrieben. Anschließend findet die quantitative real-time PCR statt.

Die verwendeten genspezifischen Primer (siehe Tab. 2.4) wurden mit dem Programm Primer ExpressTM (PE Applied Biosystems) berechnet. Mittels BLAST-Search wurden Primer mit unspezifischen Bindestellen im *Salmonella* Typhimurium LT2-Genom ausgeschlossen.

2.2.19.1 cDNA-Synthese

Für die Umschreibung von prokaryotischer mRNA in cDNA mittels retroviraler DNA-Polymerase (reverse Transkription) können entweder *random* Hexamere oder genspezifische Primer (GSP) verwendet werden. Mit den *random* Primern wird versucht, alle Gene möglichst repräsentativ zu erfassen. Dabei bleibt jedoch unberücksichtigt, dass bestimmte Sequenzen mit größerer Effizienz transkribiert werden als andere. Interessiert man sich nur für bestimmte Gene, ist es daher ratsam, GSP zu verwenden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bis zu 8 GSP pro Reaktion eingesetzt. Für die reverse Transkription wird üblicherweise ein Primer verwendet, der nahe des 3'-Endes des entsprechenden Genes bindet, um zu vermeiden, dass abgebrochene Transkripte mit erfasst werden. Wird die cDNA generiert, um später in einer real-time PCR eingesetzt zu werden, kann der 3'-Primer des real-time PCR Primer-Paares verwendet werden.

Die reverse Transkriptase (Superscript II) sowie der RNase-Inhibitor (RNase OUT) wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Für einen 20 µl-RT-Ansatz wurden folgende Komponenten auf Eis zusammen pipettiert:

Ansatz 1

RNA	150 ng
GSP (je 2,5 µM)	je 0,8 µl
H ₂ O (RNase-frei)	ad 8,9 µl

Ansatz 2

5 x RT-Puffer	4 µl		
0,1 M DTT	2 µl		
dNTPs (je 2,5 mM)	4 µl	⇒	mischen
RNase OUT (40 U/µl)	0,5 µl		
Superscript II (200 U/µl)	0,6 µl	⇒	vorsichtig mischen durch Pipettieren

Zunächst wurde der Ansatz 1 bei 65 °C für 5 min im Thermocycler denaturiert. Nach einem Temperatur-Shift auf 45 °C wurde der für 2 min auf 45 °C vorgewärmte Ansatz 2 zugefügt, durch Pipettieren gemischt und für 60 min bei 45 °C inkubiert (Anlagerung der Primer und cDNA-Synthese). Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurde der Ansatz anschließend für 15 min bei 70 °C inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Ansatz auf Eis gelagert oder bei -20 °C eingefroren.

Als Kontrolle wurde eine sogenannte *no amplification control* (NAC) mitgeführt, in der die reverse Transkriptase durch RNase-freies H₂O ersetzt wurde, um in der nachfolgenden real-time PCR-Reaktion (siehe 2.2.19.2) eine Kontamination mit genomischer DNA ausschließen zu können.

2.2.19.2 real-time PCR

Die von Higuchi et al. (120, 121) entwickelte real-time PCR ermöglicht die Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels Fluoreszenzmessung. Während bei der herkömmlichen PCR die Bestimmung der Endprodukte nur semiquantitativ erfolgt, findet die Messung der DNA-Menge bei der real-time PCR im Verlauf der Synthese statt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green gearbeitet, der während der Reaktion in die kleine Furche der neu gebildeten doppelsträngigen DNA interkaliert (196) und nach Anregung durch eine Halogenlampe fluoresziert (272). Da die emittierte Fluoreszenz linear zu der Konzentration der gebildeten dsDNA-Moleküle ist, kann mit Hilfe einer Standardkurve auf die Startkopienzahl zurückgeschlossen werden. Je größer die Anzahl der in die Reaktion eingebrachten Startkopien ist, desto früher wird ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Entscheidender Parameter für die Ermittlung der Startkopienzahl ist der sogenannte C_T-Wert (*threshold cycle*), der diejenige

Zykluszahl angibt, bei der die Fluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert (in dieser Arbeit 0,1) überschreitet. Der gewählte Schwellenwert sollte über der Hintergrundfluoreszenz (*baseline*) und innerhalb der exponentiellen Vermehrungsphase der Reaktion liegen.

Da der SYBR-Green-Farbstoff unspezifisch in jede ds-DNA interkaliert, verursachen auch unspezifische Produkte, wie z. B. Primer-Dimere, einen Anstieg in der Fluoreszenz. Zur Überprüfung unspezifischer Produkte erfolgte deshalb nach abgeschlossener real-time PCR eine Schmelzpunktanalyse im Thermocycler sowie das Auftrennen der Fragmente in einem 4 % NuSieve 3:1 Agarose-Gel (siehe 2.2.9). Für die Schmelzpunktanalyse wurden die PCR-Produkte von 60 - 95 °C erhitzt, so dass die DNA-Fragmente entsprechend ihres Schmelzpunktes bei unterschiedlichen Temperaturen einzelsträngig vorlagen. Diese spezifische Temperatur konnte aufgrund der Abnahme der Fluoreszenz bestimmt werden. Auf diese Weise konnte zwischen kurzen, bei niedriger Temperatur schmelzenden Primer-Dimeren und den längeren spezifischen PCR-Produkten unterschieden werden. Amplifikation sowie Detektion erfolgten mittels des GeneAmp® 5700 Sequence Detection System von der Firma Applied Biosystems und der zugehörigen GeneAmp® 5700 SDS-Software, Version 1.3.

Für jedes Primer-Paar wurden zunächst Primer-Konzentrationen (50 - 900 nM) sowie $MgCl_2$ -Konzentrationen (3 - 4,5 μM) optimiert, um die Bedingungen für eine optimale PCR-Effizienz zu ermitteln. Die Effizienz der PCR-Reaktionen konnte als Verhältnis von C_T -Wert zu dem Logarithmus der relativen Startkopienzahl anhand einer Regressionsgeraden bestimmt werden.

Um möglichst repräsentative Ergebnisse zu erhalten, wurden alle Reaktionen dreifach durchgeführt. Verglichen wurden zwei verschiedene Transkriptmuster (z. B. Wildtyp/ Mutante oder nicht induziert/ nach Induktion mit einem Antibiotikum). Um die Schwankungsbreite der PCR-Reaktionen möglichst gering zu halten, wurde mit Mastermixen gearbeitet.

Der TAQurate Real-time PCR Master Mix, welcher den SYBR-Green-Farbstoff, einen Enzymmix aus thermostabilen Polymerasen, Puffer, $MgCl_2$ sowie dNTPs enthält, wurde von der Firma Biozym Diagnostik GmbH bezogen. Ebenfalls mitgeliefert wurde der Referenzfarbstoff Rox (*Rox passive reference dye*), gegen den die gemessene Fluoreszenz normalisiert wird, um Schwankungen aufgrund von Volumen und Konzentration ausgleichen zu können.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf ein Gesamtvolumen von 10 µl:

TAQurate Real-time PCR Master Mix	5 µl
Rox <i>passive reference dye</i> (1:50 verdünnt in TE)	0,1 µl
5'-Primer	50 - 900 nM
3'-Primer	50 - 900 nM
MgCl ₂ (25 mM)	3 - 4,5 µM
cDNA (1:10 aus der RT verdünnt)	1 µl (= 0,75 ng RNA)
H ₂ O	ad 10 µl

Sowohl für die Quantifizierung des Templates als auch für die Ermittlung der PCR-Effizienz wurden Standardkurven mitgeführt. Dafür empfohlen sich in der Regel die folgenden cDNA-Verdünnungen: 1/10, 1/50, 1/100 sowie 1/250.

Als Negativkontrollen wurden eine *no amplification control* (NAC), bei der die reverse Transkription nicht stattgefunden hat (siehe 2.2.19.1), sowie eine *no template control* (NTC), um eventuelle Kreuzkontaminationen nachweisen zu können, mitgeführt.

Alle real-time PCR-Reaktionen erfolgten mit nachstehendem Temperaturprofil, wobei die Schritte 2 - 4 wiederholt wurden (40 x).

1. <u>Initiale Denaturierung</u>	2 min bei 95 °C
2. <u>Denaturierung</u>	30 s bei 95 °C
3. <u>Annealing</u>	30 s bei 58 °C
4. <u>Elongation</u>	15 s bei 70 °C
5. <u>Schmelzpunktanalyse</u>	60 - 95 °C

2.2.19.3 Bestimmung der Genexpression

Zur Quantifizierung der Transkriptmenge gibt es verschiedene Ansätze (168), von denen vor allem a) die absolute Standardkurven-Methode und b) die relative Standardkurven-Methode verwendet werden. Der Ansatz a) basiert auf der Erstellung einer Standardkurve mittels RNA bekannter Konzentration, anhand derer dann die genaue Kopienzahl der eingesetzten Probe bestimmt werden kann. Wird im Rahmen einer Arbeit eine Vielzahl von Genen hinsichtlich ihrer Expression untersucht, ist dieser Ansatz nicht praktikabel, da jedes Gen für die Erstellung der Standardkurve zunächst kloniert, cDNA hergestellt und diese dann gereinigt werden muss. Im Fokus dieser Arbeit stand zudem die Bestimmung der Veränderung der Genexpression unter bestimmten Bedingungen bzw. die Ermittlung von Unterschieden in der Genexpression zwischen Wildtyp und Mutante. Die Ermittlung absoluter Transkriptmengen ist in diesem Zusammenhang von untergeordneter

Bedeutung. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die relative Standardkurven-Methode (Ansatz b)) verwendet. Dabei wird diejenige cDNA-Probe, die als Referenz dient, z. B. der Wildtyp oder die nicht-behandelte Probe, in verschiedenen Verdünnungsstufen zur Erstellung einer Standardkurve eingesetzt. Anhand der gemessenen C_T -Werte und der Standardkurve wird dann die Transkriptmenge der unbekannten Probe als x-fache Expressionsänderung im Verhältnis zu der Referenz ermittelt.

Der Ermittlung der Genexpression lagen drei unabhängige Messungen zu Grunde. Aus drei unabhängigen Anzuchten der zu untersuchenden Stämme wurde RNA isoliert (siehe 2.2.17) und diese in cDNA umgeschrieben (siehe 2.2.19.1). Damit erfolgte im Anschluss jeweils eine dreifache Bestimmung in der real-time PCR.

Die ermittelten C_T -Werte sollten < 30 sein. Höhere Werte deuten auf ungenügende Templatmenge oder -qualität hin. Für die Normalisierung der ermittelten C_T -Werte diente eine konstante Menge der in die RT-Reaktion eingesetzten Gesamt-RNA (41) von 150 ng bzw. das entsprechende cDNA-Äquivalent von 1/200 Vol. des Gesamt-RT-Ansatzes.

Die Signifikanz der ermittelten Transkriptmengen wurde mit Hilfe des t-Testes (zweiseitig, $\alpha = 0,05$), dem Vergleich der Mittelwerte, berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Einführung

Im Rahmen eines früheren Experimentes (104) wurden drei verschiedene epidemiologisch bedeutsame Serovaren und Lysotypen von *Salmonella enterica* ssp. *enterica* auf unterschiedlichen Fluorchinolonen selektiert, um Häufigkeit und Art Chinolonresistenz-vermittelnder Mutationen in *Salmonella* zu bestimmen. Die für die Selektionsexperimente genutzten Stämme *Salmonella* Typhimurium DT 204c (B), *Salmonella* Typhimurium DT 104 (C) sowie *Salmonella* Hadar (D) wurden auch im Rahmen dieser Arbeit, zur Untersuchung der Beteiligung von Efflux an der Resistenzentwicklung verwendet.

Abbildung 3.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Fluorchinolone, die eingesetzten Selektionskonzentrationen sowie die Bezeichnung der entstandenen Erstschrift- und Zweitschrift-Mutanten, welche eine verringerte Fluorchinoloneempfindlichkeit aufwiesen.

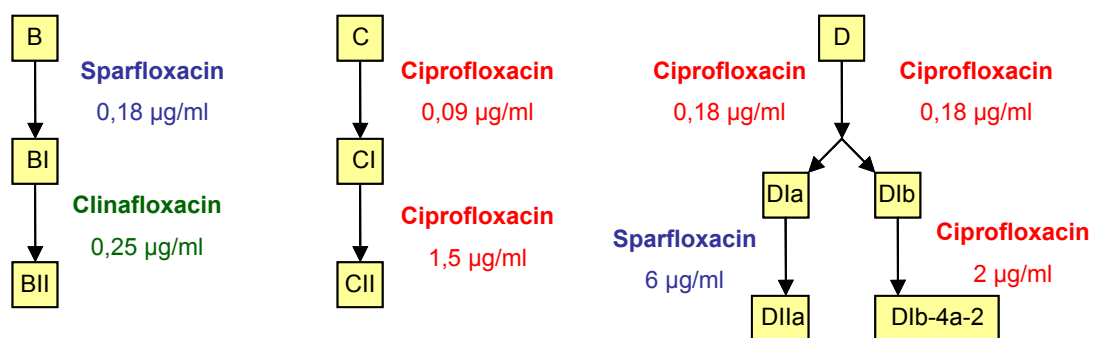


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Selektionsexperimente. Farblich unterschiedlich gekennzeichnet sind die verwendeten Fluorchinolone, sowie die eingesetzten Konzentrationen. B = *S. Typhimurium* DT 204c; C = *S. Typhimurium* DT104; D = *S. Hadar*; BI/ CI /DI = entsprechende Erstschrift- Mutanten; BII/ CII /DIa/ DIb-4a-2 = entsprechende Zweitschrift-Mutanten.

Die MHK-Werte der Wildtypstämme sowie der Erstschrift- und Zweitschrift-Mutanten für Ciprofloxacin und Chloramphenicol sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tab. 3.1: MHK-Werte für Ciprofloxacin (Cip) und Chloramphenicol (Clm) der Wildtyp- und Mutantenstämme aus den Selektionsexperimenten. B = *S. Typhimurium* DT 204c; C = *S. Typhimurium* DT104; D = *S. Hadar*; BI/ CI /DIa = entsprechende Erstschrift-Mutanten; BII/ CII /DIIa/ DIb-4a-2 = entsprechende Zweitschrift-Mutanten.

Stamm	Cip [$\mu\text{g/ml}$]	Clm [$\mu\text{g/ml}$]
B	0,015	4
BI	0,5	4
BII	4	16
C	0,015	4
CI	0,5	4
CII	4	16
D	0,015	4
DIa	1	4
DIb	0,5	2
DIIa	4	16
DIb-4a-2	4	16

Zur Untersuchung der molekularen Ursachen der verringerten Antibiotikaempfindlichkeit der Erstschrift- und Zweitschrift-Mutanten wurden zunächst die Fluorchinolon-Targetgene *gyrA*, *gyrB* und *parC*, welche für Untereinheiten der Topoisomerasen II und IV kodieren (siehe 1.3.1), sowie das Gen *marR*, welches für den lokalen Repressor des *marRAB*-Operons (siehe 1.5.2.1) kodiert, sequenziert (104). In den Erstschrift-Mutanten traten nur Veränderungen in *gyrA* an den Aminosäurepositionen Ser83 sowie Asp87 auf. Die Zweitschrift-Mutanten erwarben im Vergleich zu den Erstschrift-Mutanten keine weiteren Mutationen in den untersuchten Genen (siehe Tab. 3.2), obwohl sie eine weiter verringerte Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen zeigten (siehe Tab. 3.1).

Tab. 3.2: Ergebnisse der Sequenzierungen der Targetgene sowie von *marR*. B = *S. Typhimurium* DT 204c; C = *S. Typhimurium* DT104; D = *S. Hadar*; BI/ CI /DIa = entsprechende Erstschrift- Mutanten; BII/ CII /DIIa/ DIb-4a-2 = entsprechende Zweitschrift-Mutanten.

Stamm	Selektions-schritt	Mutationen in <i>gyrA</i>	Mutationen in <i>gyrB</i>	Mutationen in <i>parC</i>	Mutationen in <i>marR</i>
B	-	-	-	-	-
BI	1	S83F	-	-	-
BII	2	S83F	-	-	-
C	-	-	-	-	-
CI	1	S83Y	-	-	-
CII	2	S83Y	-	-	-
D	-	-	-	-	-
DIa	1	S83F	-	-	-
DIb	1	D87Y	-	-	-
DIIa	2	S83F	-	-	-
DIb-4a-2	2	D87Y	-	-	-

3.2 Charakterisierung der In-vitro-Mutanten aus den Selektionsexperimenten

Zur Charakterisierung der aus den Selektionsexperimenten erhaltenen Stämme wurden Empfindlichkeitsbestimmungen gegenüber verschiedenen Antibiotika in An- und Abwesenheit eines Effluxpumpeninhibitors (EPI) durchgeführt (siehe 3.2.1). Zudem wurden verschiedene weitere Gene sequenziert, die für die Veränderung der Antibiotikaempfindlichkeit von Bedeutung sein könnten (siehe 3.2.2). Weiterhin wurden die Generationszeiten der Wildtyp- und Mutantenstämme bestimmt (siehe 3.2.3).

3.2.1 Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika in An- und Abwesenheit eines Effluxpumpeninhibitors

Zur Ermittlung der Antibiotikaempfindlichkeit der Wildtyp- und Mutantenstämme aus den Selektionsexperimenten wurden die minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) gegenüber Antibiotika unterschiedlicher Klassen mittels Mikrobouillon-Dilutionsmethode (siehe 2.2.5) bestimmt. Die MHK-Werte von Ciprofloxacin sowie von Chloramphenicol wurden zudem in Anwesenheit des EPIs Phenylalanyl-Arginyl- β -Naphthylamid durchgeführt (siehe Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Ergebnisse der MHK-Wert-Bestimmung für die Wildtyp- und Mutantenstämme aus dem Selektionsexperiment. B = *S. Typhimurium* DT 204c; C = *S. Typhimurium* DT104; D = *S. Hadar*; BI/ CI /DIa = entsprechende Erstschrift-Mutanten; BII/ CII /DIIa/ DIb-4a-2 = entsprechende Zweitschrift-Mutanten; n.b. = nicht bestimmt; Cip = Ciprofloxacin; Spar = Sparfloxacin; Clif = Clinafloxacin; Nor = Norfloxacin; Clm = Chloramphenicol; Novo = Novobiocin; Ery = Erythromycin; rot dargestellt sind die MHK-Werte der Zweitschrift-Mutanten für Cip und Clm in An- und Abwesenheit des EPIs.

Stamm	Cip [$\mu\text{g/ml}$]		Spar [$\mu\text{g/ml}$]	Clif [$\mu\text{g/ml}$]	Nor [$\mu\text{g/ml}$]	Clm [$\mu\text{g/ml}$]		Novo [$\mu\text{g/ml}$]	Ery [$\mu\text{g/ml}$]
		+EPI					+EPI		
B	0,015	0,015	0,015	0,0075	0,25	4	4	n.b.	n.b.
BI	0,5	0,24	0,24	0,06	2	4	2	n.b.	n.b.
BII	4	0,24	8	0,5	64	16	2	n.b.	n.b.
C	0,015	0,015	0,015	0,015	0,5	4	4	n.b.	n.b.
CI	0,5	0,24	0,24	0,06	2	4	4	n.b.	n.b.
CII	4	0,24	4	0,5	64	16	1	n.b.	n.b.
D	0,015	0,015	0,015	0,015	0,12	4	2	512	64
DIa	1	0,5	1	0,125	2	4	2	512	128
DIb	0,5	0,24	0,5	0,125	2	2	1	1024	128
DIIa	4	0,5	16	1	8	16	2	1024	256
DIb-4a-2	4	0,5	4	0,5	8	16	1	2048	256

Die MHK-Werte der Fluorchinolone liegen für die Erstschrift-Mutanten überwiegend drei bis fünf Verdünnungsstufen über denen der entsprechenden Wildtypstämme. Die MHK-

Werte von Chloramphenicol dagegen sind nicht erhöht. Ähnliche Erhöhungen (3 – 5 Verdünnungsstufen) weisen die Fluorchinolon-MHK-Werte der Zweitschritt- im Vergleich zu denen der Erstschrift-Mutanten auf. Die MHK-Werte von Chloramphenicol zeigen in den Zweitschritt-Mutanten eine Erhöhung von zwei bis drei Verdünnungsstufen. Besonders auffällig sind die MHK-Werte der Zweitschritt-Mutanten (rot dargestellt), die in Anwesenheit des EPIs deutlich (3 - 4 Verdünnungsstufen) absinken.

Diese Ergebnisse begründeten die Hypothese, dass aktiver Efflux, der durch die Zugabe eines EPIs gehemmt werden kann, für die Verringerung der Empfindlichkeit der Zweitschritt-Mutanten verantwortlich ist.

3.2.2 Sequenzierung möglicher, für die Verringerung der Empfindlichkeit verantwortlicher Gene

Um der Frage nachzugehen, welche genetischen Ursachen der verstärkte Efflux in den Zweitschritt-Mutanten haben könnte, wurden zunächst, in Anlehnung an *E. coli*, Bereiche des *acrRAB*-Operons sequenziert. Bei der Effluxpumpe AcrAB-TolC handelt es sich um eine überaus wichtige Effluxpumpe in *E. coli* (216). Wie groß ihr Einfluß hinsichtlich der *multidrug* Efflux-vermittelten Resistenz in *Salmonella* ist, konnte noch nicht abschließend geklärt werden. Beobachtet wurde jedoch, in *E. coli* (303) wie in *Salmonella* (218), der Zusammenhang zwischen einer inaktivierenden Mutation in *acrR*, dem lokalen Repressor von *acrAB*, und der verstärkten Expression der Effluxpumpe, welche wiederum zu verringerter Sensibilität gegenüber bestimmten Antibiotika führt.

Zudem ist bei den Effluxpumpen AcrAB-TolC (138) sowie AcrEF-TolC (219) bekannt, dass im Bereich des Promotors integrierte Insertionselemente die Expression der Pumpe erhöhen können.

Daher wurden *acrR* sowie die intergenischen Bereiche *acrR/A* und *acrA/B* sequenziert. Verwendet wurden die Primer *acr_Seq1* - 4 sowie *acrR_for* und *acrR_rev* (siehe Tab. 2.4). Sowohl die Zweitschritt- als auch die Erstschrift-Mutanten unterscheiden sich hinsichtlich dieser Sequenzen jedoch nicht vom Wildtyp.

Zudem wurde *soxR*, welches für den lokalen Regulator von SoxS kodiert, bei dem es sich ebenfalls um einen globalen Regulator von Effluxpumpen handelt (siehe 1.5.2.2) sequenziert, da bekannt ist, dass Mutationen in *soxR* zu einer verstärkten Expression von *soxS* und somit einer Verringerung der Antibiotika-Empfindlichkeit führen (148). Hier fanden die Primer *soxR_for* und *soxR_rev* (siehe Tab. 2.4) Verwendung. Auch in *soxR* wurde jedoch keine Veränderung in den Mutanten im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen detektiert.

Anschließend wurde *rma* inklusive der Promotorregion mit den Primern *rma_for* und *rma_rev* (siehe Tab. 2.4) sequenziert. Auch bei Rma handelt es sich um einen globalen

Regulator von Effluxpumpen (siehe 1.5.2.4), über dessen Regulation jedoch noch nichts bekannt ist. Eine verstärkte Expression des homologen Gens *ramA* in *Klebsiella pneumoniae* führt jedoch zu einer erhöhten Expression von *acrAB* (273). Die Untersuchung von *rma* ergab jedoch auch keine Sequenzunterschiede zwischen den Mutanten und den entsprechenden Wildtypstämmen.

3.2.3 Bestimmung von Generationszeiten

Um die mögliche Ursache für die verringerte Antibiotika-Empfindlichkeit der Zweitschritt-Mutanten einzugrenzen, wurden die Generationszeiten der Wildtyp- sowie der Mutantenstämme bestimmt (siehe 2.2.4). Die Wachstumsgeschwindigkeit wird als Maß für die Fitness der Stämme angesehen. Bestimmte resistenzvermittelnde Mutationen können sich auf die Wachstumseigenschaften der Bakterien auswirken und so deren Fitness und Konkurrenzfähigkeit in der Umwelt beeinflussen.

Für jeden Stamm wurde eine Dreifachbestimmung der Generationszeit durchgeführt. Dazu wurde die OD_{546nm} gegen die Zeit aufgetragen und aus einer angelegten Regressionsgeraden die Generationszeit berechnet (siehe Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Generationszeit der untersuchten Stämme in Minuten. Angegeben ist zudem die relative Standardabweichung.

Stamm	Generationszeit [min] (Mittelwert)	Standardabweichung [%]
B	19,5	3,4
BI	23	5,1
BII	13,8	6,9
C	17,9	4,3
CI	18,4	5,7
CII	20,5	3,3
D	16,5	5,2
Dla	16,2	2,8
DIIa	14,8	4,7
DIIb	18,2	6,1
DIIb-4a-2	16,6	3,9

Die Generationszeiten der Wildtypstämmen unterscheiden sich geringfügig. Die Erstschritt-Mutanten BI, CI sowie DIIb weisen im Vergleich zu den Wildtypstämmen leicht verlängerte Generationszeiten auf, die in den Zweitschritt-Mutanten, mit Ausnahme von CII, kompensiert sind. Die genetischen Veränderungen, die sich im zweiten Selektionsschritt bei BII, DIIa und DIIb-4a-2 ereignet haben, führen demnach zu einem Vorteil hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit.

3.3 Erstellung einer chromosomalen Genbank

Durch die Erstellung einer chromosomalen Genbank sollten Effluxpumpen bzw. positive Regulatoren, die möglicherweise in der *S. Hadar* Zweitschritt-Mutante Dlb-4a-2 zu dem erhöhten Resistenzphänotyp beitragen, identifiziert werden. Klone, die ein entsprechendes *shotgun*-Fragment tragen, konnten phänotypisch über eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber den Antibiotika Ciprofloxacin und Chloramphenicol identifiziert werden. Anschließend wurden die entsprechenden Inserts sequenziert und in den genomischen Kontext eingeordnet.

Die Erstellung der Genbank erfolgte wie unter 2.2.15 beschrieben. Dazu wurde zunächst mit Hilfe der angegebenen Formel (51, 307) die Anzahl der notwendigen Klone berechnet, die nach der Transformation erreicht werden muss, damit mit möglichst hoher Wahrscheinlichkeit jedes Gen in der Genbank vertreten ist. Unter Einbeziehung der gewünschten Fragmentgröße (4,5 kb) sowie der Genomgröße von *S. Typhimurium* LT2 (ca. 4857 kb) (190) wurde berechnet, dass 4968 Klone notwendig sind, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % jedes Gen vertreten zu haben (3232 Klone sind bei einer Wahrscheinlichkeit von 95 % notwendig).

Zunächst wurde die chromosomale DNA von Dlb-4a-2 unter Verwendung von CTAB isoliert (siehe 2.2.6.1.2) und einer partiellen *Sau3A*-Spaltung unterzogen (etwa 30 % blieben ungespalten). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Gelextraktion der 4-5 kb großen Fragmente wurde die Ligation mit dem mit *Bam*HI restringierten und dephosphorylierten Vektor pBR322 durchgeführt.

Ligationsansatz und anschließende Transformation in den *S. Hadar* Wildtypstamm wurden dahingehend optimiert, dass etwa 4000 *shotgun*-Klone erhalten wurden. Dies entspricht einer Wahrscheinlichkeit von ca. 97,5 % mit der jedes Gen in der Genbank vertreten ist.

Die erhaltenen *shotgun*-Klone wurden für die spätere Verwendung in die mit LB-Bouillon befüllten Kavitäten von Mikrotiterplatten überführt und nach Über-Nacht-Inkubation sowie Zugabe von Glycerin (Endkonzentration 15 %) bei -80 °C gelagert.

Zur Kontrolle, ob die uninduzierte Expression einer Effluxpumpe von pBR322 stark genug ist, um einen phänotypischen Effekt zu bewirken, wurde der *S. Hadar* Wildtypstamm mit pPHB861 (siehe Abb. 3.23) einer MHK-Wert-Bestimmung unterzogen. Bei dem für die Klonierung verwendeten Vektor pBAD18 handelt es sich um ein pBR322-Derivat, von dem angenommen wird, dass es in ähnlicher Kopienzahl wie pBR322 vorliegt. Da *acrAB* auch im Rahmen eines anderen Experimentes (siehe 3.6.7) überexprimiert werden sollte, wurde als Klonierungsvektor der Arabinose-induzierbare pBAD18 verwendet. Bei der Kontrolle zu der *shotgun*-Klonierung wurde dann jedoch in M9-Medium gearbeitet und nicht mit Arabinose induziert, so dass die Vergleichbarkeit von pBR322 (in der *shotgun*-

Klonierung verwendet) und des Derivates pBAD18 gegeben ist. Tabelle 3.5 zeigt die MHK-Werte von *S. Hadar* mit pPHB861 im Vergleich zu dem plasmidlosen Referenzstamm.

Tab. 3.5: Ergebnisse der MHK-Wert-Bestimmung von *S. Hadar* ohne und mit pPHB861 (*acrAB*-Überexpressionsplasmid).

Stamm	Cip [µg/ml]	CIm [µg/ml]
D	0,015	4
D/pPHB861	0,06	8

Auch ohne Induktion ist aufgrund der erhöhten *acrAB*-Expression ein leichter Anstieg der MHK-Werte, vor allem für Ciprofloxacin, zu beobachten.

Da die *shotgun*-Klone auf 1,5 x der MHK von *S. Hadar* gestempelt wurden, sollte die Expression eines positiven Regulators bzw. einer Effluxpumpe, auch von pBR322, ausreichend hoch sein, um einen phänotypischen Effekt zu verursachen.

3.3.1 Analyse der *shotgun*-Klone

Zur Analyse der Genbank wurden die *shotgun*-Klone in einer 1:100 Verdünnung in 0,9 %iger NaCl-Lösung auf Selektionsplatten (MH-Agar) mit den Antibiotika Ciprofloxacin bzw. Chloramphenicol ausgestempelt. Als Selektionskonzentration wurde 1,5 x die MHK von *S. Hadar* eingesetzt (0,045 µg/ml Ciprofloxacin; 6 µg/ml Chloramphenicol). Zudem wurde in eine weitere Mikrotiterplatte, die 1,5 µg/ml Chloramphenicol sowie 64 µg/ml des EPIs Phenylalanyl-Arginyl-β-Naphthylamid enthielt, gestempelt. Die MHK von Chloramphenicol für den *S. Hadar* Wildtypstamm wird in Anwesenheit des EPIs von 4 auf 1 µg/ml gesenkt.

Nach Stempeln der 4000 Klone zeigten 4 Klone Wachstum sowohl auf Ciprofloxacin als auch auf Chloramphenicol. Die DNA dieser Klone wurde isoliert (siehe 2.2.6.2.1), durch Retransformation separiert, um Mischklone auszuschließen, und mit den Primern pBR322-Tet_for und pBR322_427_3' (siehe Tab. 2.4) ansequenziert.

Die erhaltenen Basensequenzen des *shotgun*-Inserts konnten, mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), mit dem Genom von *S. Typhimurium* LT2 verglichen und auf diese Weise der genomische Kontext ermittelt werden. So konnte untersucht werden, ob das entsprechende *shotgun*-Fragment für einen möglichen, für die erhöhte Resistenz verantwortlichen, positiven Regulator oder für eine Effluxpumpe kodiert. Ein interessantes Insert trägt jedoch nur einer der untersuchten Klone (im Folgenden als *shotgun*-Klon 1 bezeichnet). Die Abbildung 3.2 zeigt den genomischen Kontext des *shotgun*-Klons 1.

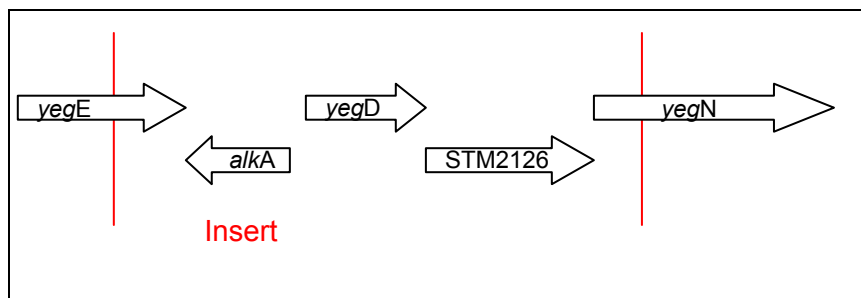


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des genomischen Kontextes des *shotgun*-Klons 1. Begrenzt von roten, senkrechten Strichen ist das Insert dargestellt. *yegE*: putative Diguanylat-Cyclase/Phosphodiesterase; *alkA*: 3-Methyl-Adenin DNA Glycosylase II; *yegD*: putatives Hitzeschockprotein; STM2126: putatives Membranprotein (HlyD-Familie); *yegN*: *outer membrane*-Rezeptor.

Interessant ist möglicherweise das Gen STM2126, welches für ein putatives Membranprotein der HlyD-Familie kodiert. Die Bezeichnung STM steht hier für *Salmonella* Typhimurium, da die interessanten *shotgun*-Klone bei der BLAST-Suche mit dem Genom von *S. Typhimurium* LT2 verglichen wurden.

3.3.2 Subklonierung eines möglichen die Empfindlichkeit verringenden Gens

Um zu ermitteln, ob das STM2126-Genprodukt für die reduzierte Antibiotikaempfindlichkeit des entsprechenden *shotgun*-Klons verantwortlich ist, wurde dieses Gen in pBAD18 (102) subkloniert. Das Plasmid pBAD18 verfügt über einen Arabinose-induzierbaren Promotor. Die Zugabe von L-Arabinose (hier 15 mM) führt zur Expression der Gene, die sich unter der Kontrolle des Arabinose-Promotors befinden, während die Anwesenheit von D-Glukose (hier 15 mM) zur Katabolitrepression und somit zu einer sehr effektiven Blockade der Expression führt.

Zur Klonierung des Gens STM2126 hinter den induzierbaren Arabinose-Promotor pBAD wurde das Plasmid pBAD18 (102) mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Hind*III gespalten (siehe 2.2.11.1). Die In-vitro-Amplifikation (siehe 2.2.10) von STM2126 erfolgte mittels der Primer STM2126_for(oe) und STM2126_rev(oe) (siehe Tab. 2.4), welche ihrerseits über Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Hind*III verfügten. Nach Aufreinigung des STM2126-PCR-Fragmentes (siehe 2.2.7.3), Restriktion mit den genannten Enzymen und erneuter Aufreinigung, wurden der Vektor und das PCR-Fragment ligiert (siehe 2.2.11.3). Nach Transformation (siehe 2.2.12.2) von *E. coli* DH5α erfolgte eine Mini-Präparation der Plasmide (siehe 2.2.6.2.1). Im Anschluss wurden die konstruierten Plasmide mittels Restriktionsanalyse (siehe 2.2.11.1) und Sequenzierung (siehe 2.2.13) der Übergangsbereiche zwischen Vektor und Insert mit den Primern pBAD18_for(seq) und pBAD18_rev(seq) (siehe Tab. 2.4) überprüft.

Nach Transformation des *S. Hadar* Wildtypstammes mit dem Konstrukt pPHB865 (siehe Abb. 3.3) mittels Elektroporation (siehe 2.2.12.4), wurden die minimalen Hemmkonzentrationen von diversen Antibiotika unter induzierenden und reprimierenden Bedingungen in M9-Medium, da die von dem pBAD-Promotor ausgehende Expression in Minimalmedium effektiver ausfällt (102), bestimmt (siehe Tab. 3.6). Der Induktor L-Arabinose bzw. der Repressor D-Glukose wurde in einer Endkonzentration von 15 mM zugesetzt. Außerdem wurde Ampicillin (50 µg/ml) zugegeben, um zu verhindern, dass sich der Vektor in der Zelle ohne Selektionsdruck nicht mehr repliziert.

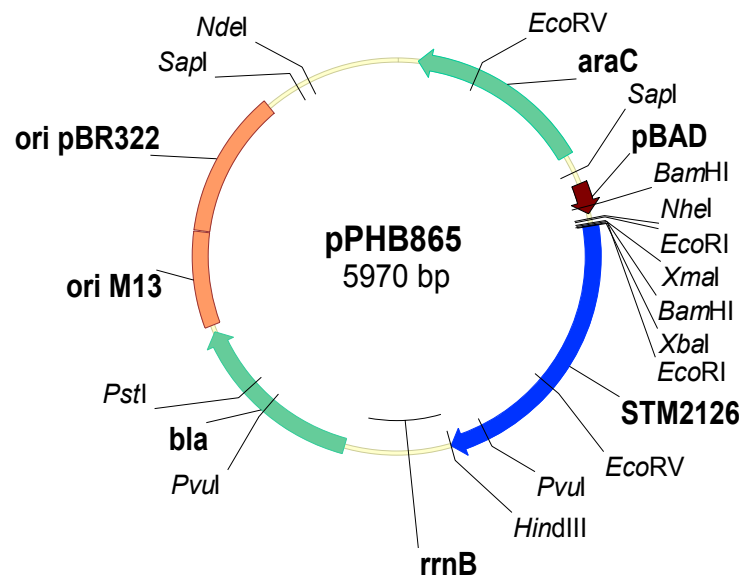


Abb. 3.3: Darstellung von pPHB865, das zur Überexpression von STM2126 eingesetzt wurde. bla = Ampicillinresistenz-Kassette; ori M13 = Replikationsursprung zur Vermehrung in Phagen; ori pBR322 = Replikationsursprung zur Vermehrung in *E. coli* *Salmonella*; araC = bifunktionaler Regulator; pBAD = Promotor des Arabinose-Operons; STM2126 = kodiert für das Gen STM2126; rrnB = Terminator.

Tab. 3.6: Ergebnisse der MHK-Wert-Bestimmung von *S. Hadar* ohne und mit pPHB865 (STM2126-Überexpressionsplasmid) unter induzierenden (+ Arabinose) und reprimierenden (+ Glukose) Bedingungen in M9-Medium. Cip = Ciprofloxacin; Clm = Chloramphenicol; Spar = Sparfloxacin; Nal = Nalidixinsäure.

Stamm	Cip [µg/ml]	Clm [µg/ml]	Spar [µg/ml]	Nal [µg/ml]
D + Glukose (15 mM)	0,03	4	0,015	4
D + Arabinose (15 mM)	0,03	4	0,015	4
D/pPHB865 + Glukose (15 mM)	0,03	8	0,015	4
D/pPHB865 + Arabinose (15 mM)	0,03	4	0,015	4

Die MHK-Werte von Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Sparfloxacin und Nalidixinsäure zeigen keine Veränderung nach Induktion der Expression des Gens STM2126.

3.4 Aminosäuresequenz-Alignments zur Identifizierung unbekannter Effluxpumpen

Zur Identifizierung unbekannter Effluxpumpen wurden Aminosäuresequenz-Alignments durchgeführt. Dazu wurden Aminosäuresequenzen bekannter Effluxpumpen aus verschiedenen Spezies (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Klebsiella aerogenes*) mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mit dem Proteom von *S. Typhimurium* LT2 verglichen und die Identität in Prozent (%) ausgedrückt (siehe Tab. 3.7). Es wurden gezielt Komponenten (Transporter, Membranfusionsproteine (MFPs) und Proteine der äußeren Membran (OMPs)) von Effluxpumpen verschiedener Familien ausgewählt, die Fluorchinolone als Substrate besitzen.

Tab. 3.7: Ergebnisse der BLAST-Suche. Verglichen wurden Komponenten verschiedener Effluxpumpen-Familien unterschiedlicher Organismen mit dem Proteom von *S. Typhimurium* LT2. Die Identität ist in % ausgedrückt.

	Identität [%]	entsprechende Sequenz aus <i>S. Typhimurium</i> LT2
Transporter (RND-Familie)		
AcrB (<i>E. coli</i>)	89	AcrB
	77	AcrF
	63	AcrD
	40	putatives Kation-Efflux-Protein
	27	YegO
	21	YegN
MexB (<i>P. aeruginosa</i>)	69	AcrB
	66	AcrF
	61	AcrD
	41	ähnlich einem Transmembranprotein (<i>E. coli</i>); Acridin-Resistenz
	29	YegO
	28	YegN
	23	SecF
MexD (<i>P. aeruginosa</i>)	47	AcrF
	46	AcrD
	44	ähnlich einem Transmembranprotein (<i>E. coli</i>); Acridin-Resistenz
	38	YegN
	24	YegO
	23	AcrB
	18	YgfZ
MtrD (<i>N. gonorrhoeae</i>)	41	AcrF
	40	AcrD
	39	ähnlich einem Transmembranprotein (<i>E. coli</i>); Acridin-Resistenz
	33	YegO
	22	ArgB
	20	AcrB
	20	YegN

Tab. 3.7: Ergebnisse der BLAST-Suche (Fortsetzung).

	Identität [%]	entsprechende Sequenz aus <i>S. Typhimurium</i> LT2
YhiV (<i>E. coli</i>)	65	AcrD
	64	AcrB
	55	YegN
	37	YegO
	21	StbD
	18	AcrF
Membranfusionsproteine (RND-Familie)		
AcrA (<i>E. coli</i>)	81	AcrA
	61	AcrE
	27	ähnlich einer Acridin-Efflux-Pumpe (<i>E. coli</i>)
	25	ähnlich einem Membranprotein (<i>E. coli</i>)
	20	YbjY
	20	YdhJ
	18	YhcQ
MexA (<i>P. aeruginosa</i>)	57	AcrA
	54	AcrE
	32	ähnlich einer Acridin-Efflux-Pumpe (<i>E. coli</i>)
	27	ähnlich einem Membranprotein (<i>E. coli</i>)
	26	YdhJ
	25	YbjY
	25	YhcQ
MtrC (<i>N. gonorrhoeae</i>)	45	AcrE
	42	AcrA
	29	ähnlich einem Membranprotein (<i>E. coli</i>)
	28	ähnlich einer Acridin-Efflux-Pumpe (<i>E. coli</i>)
	27	YbjY
	26	YhcQ
	22	YdhJ
YhiU (<i>E. coli</i>)	53	AcrA
	50	AcrE
	38	YdhJ
	30	ähnlich einer Acridin-Efflux-Pumpe (<i>E. coli</i>)
	29	ähnlich einem Membranprotein (<i>E. coli</i>)
	23	YhcQ
	22	YbjY
	21	ähnlich einem Membranprotein (<i>E. coli</i>)
Proteine der äußeren Membran (OMPs) (RND-Familie)		
TolC (<i>E. coli</i>)	83	ToIC
	21	ähnlich einem Resistenz vermittelnden Protein (<i>E. coli</i>)
	20	ähnlich einem Resistenz vermittelnden Protein (<i>E. coli</i>)
OprM (<i>P. aeruginosa</i>)	48	ähnlich einem Resistenz vermittelnden Protein (<i>E. coli</i>)
	29	ähnlich einem Transmembranprotein (<i>E. coli</i>); Acridin-Resistenz
	24	YohG
	19	ToIC
	16	ähnlich einer ABC-Exporter <i>outer membrane</i> Komponente
MtrE (<i>N. gonorrhoeae</i>)	36	ähnlich einem Resistenz vermittelnden Protein (<i>E. coli</i>)
	26	HisD
	22	ähnlich einem Resistenz vermittelnden Protein (<i>E. coli</i>)
	21	ToIC
	21	YohG

Tab. 3.7: Ergebnisse der BLAST-Suche (Fortsetzung).

	Identität [%]	entsprechende Sequenz aus <i>S. Typhimurium</i> LT2
Transporter (MFS-Familie)		
EmrB (<i>E. coli</i>)	89	EmrB
	30	YieO
	30	ähnlich einer membranständigen Translokase; MDR
	25	(<i>E. coli</i>)
	24	YegB
	23	SmvA
		ähnlich einem Transportprotein (<i>E. coli</i>)
Membranfusionsproteine (MFS-Familie)		
EmrA (<i>E. coli</i>)	87	EmrA
	27	YdhJ
	25	YhcQ
	25	ähnlich einem Membranprotein (<i>E. coli</i>)
	25	ähnlich einem Membranprotein (<i>E. coli</i>)
	25	ähnlich einer Acridin-Efflux-Pumpe (<i>E. coli</i>)
	24	AcrE
	22	YbjY
	20	Yhil
Transporter (SMR-Familie)		
EmrE (<i>E. coli</i>)	59	ähnlich einem Resistenz gegen Methylviologen
		vermittelnden Protein (<i>E. coli</i>)
	42	ähnlich einem Transportprotein (<i>E. coli</i>)
	36	YdgE
	34	SugE
	31	YdgF
MdfA (<i>E. coli</i>)	96	MdfA
QacE (<i>K. aerogenes</i>)	55	ähnlich einem Resistenz gegen Methylviologen
		vermittelnden Protein (<i>E. coli</i>)
	38	SugE
	36	ähnlich einem Chaperon (<i>E. coli</i>)
	30	YdgF
QacΔ1E (<i>K. aerogenes</i>)	54	ähnlich einem Resistenz gegen Methylviologen
		vermittelnden Protein (<i>E. coli</i>)
	36	SugE
	35	YdgE
	29	YdgF

Die höchsten prozentualen Übereinstimmungen treten bei dem Vergleich von *E. coli*-Proteinen mit dem *S. Typhimurium*-Proteom auf. Die Effluxpumpen AcrAB-TolC (RND-Familie), EmrAB (MFS-Familie) sowie MdfA (SMR-Familie) sind sowohl in *E. coli* als auch in *Salmonella* beschrieben (siehe 1.4.1).

Auf Grundlage dieser Alignments wurden einige der Gene für Effluxpumpen-Komponenten ausgewählt (**fett** gekennzeichnet), deren Expressionsmuster im weiteren Verlaufe der Arbeit mittels real-time PCR (siehe 3.6) untersucht wurden. Gewählt wurden Gene, die für Effluxpumpen kodieren, welche Fluorchinolone als Substrate besitzen. Diese Genexpressionsstudien sollten Ergebnisse liefern zu möglichen Veränderungen in der Expression von Effluxpumpen, als Ursache für die verringerte Fluorchinoloneempfindlichkeit der Zweitschritt-Mutanten aus den Selektionsexperimenten.

3.5 Herstellung von *marR*-Deletionsmutanten zur Identifizierung MarA-regulierter Effluxpumpen

Zur Identifizierung ausschließlich über den globalen Regulator MarA regulierter Effluxpumpen mittels real-time PCRs sollten *marR*-defiziente *S. Hadar*-Mutanten hergestellt werden. Die Gendisruption wurde mittels homologer Rekombination nach Datsenko und Wanner (59) durchgeführt (siehe 2.2.14).

3.5.1 Konstruktion der *marR*-Deletionsmutanten

Die *S. Hadar*-Zellen wurden, wie unter 2.2.12.3 beschrieben, elektrokompent gemacht und mit dem Rekombinationshelferplasmid pKD46 (siehe Abb. 2.1) transformiert. Zur Herstellung des zu integrierenden PCR-Produktes wurden das Template-Plasmid pKD4 (siehe Abb. 2.2) sowie die Primer *dmarR_for* und *dmarR_rev* (siehe Tab. 2.4) verwendet. Die Primer tragen im 5'-Bereich Sequenzen, welche die zu deletierende genomische Region einschließen und im 3'-Bereich Basenabfolgen, die mit den *priming-sites* des Template-Plasmids pKD4 hybridisieren. Auf diese Weise entsteht ein PCR-Produkt, das eine von *FRT-sites*, *priming-sites* sowie *marR*-Sequenzen flankierte Kanamycinresistenz-Kassette trägt (siehe Abb. 3.4). Nach Transformation mit dem hergestellten PCR-Produkt sowie homologer Rekombination zwischen dem Genom und dem eingebrachten Fragment, ist der genomische Bereich, der sich zwischen den homologen Flanken befand durch die Kanamycinresistenz-Kassette ersetzt und somit deletiert (siehe Abb. 3.4).

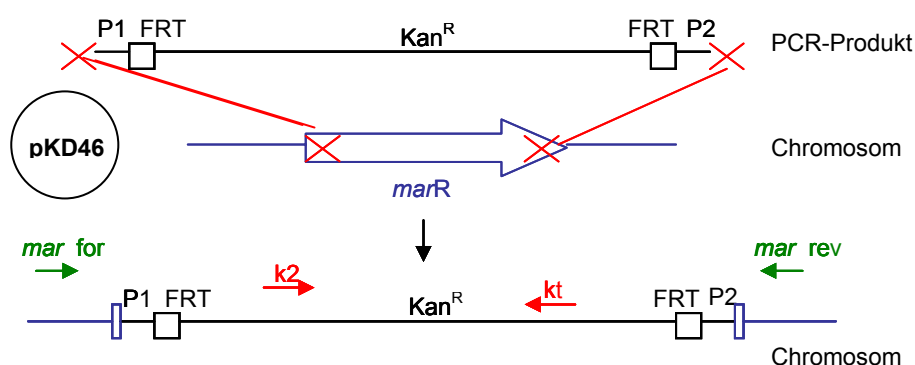


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der chromosomalen *marR*-Deletion durch homologe Rekombination mittels pKD46 (λ -Gen-Expressionsplasmid). P1/2 = *priming site*; *FRT* = *FLP recognition target*; *Kan^R* = Kanamycinresistenz-Kassette; *mar_for*/ *mar_rev*/ *k2*/ *kt* = Primer, die zum Nachweis der Integration der Kanamycinresistenz-Kassette eingesetzt wurden.

Eine genotypische Überprüfung der Kanamycin-resistenten Klone erfolgte durch PCR mit Hilfe der Primer *mar_for*, *mar_rev*, *k2* sowie *kt* (siehe Tab. 2.4 und Abb. 3.4). Eine PCR

mit dem Primer-Paar *mar_for* und *mar_rev* ergab nach Integration der Kanamycinresistenz-Kassette ein Fragment der Größe 1893 bp im Vergleich zur Wildtyp-Situation, wo ein Fragment der Größe 718 bp zu erwarten ist. Um zu überprüfen, ob die Integration der Kanamycinresistenz-Kassette Locus-spezifisch stattgefunden hat, wurden zusätzlich die Primer-Paare *mar_for* und *kt* (nach Integration der Kassette ergibt sich ein Fragment von 1327 bp) sowie *k2* und *mar_rev* (nach Integration der Kassette entsteht ein Fragment von 1037 bp) verwendet. Beide Primer-Paare ergeben kein PCR-Produkt bei Integration der Resistenz-Kassette an einem anderen als dem gewünschten *marR*-Locus. Der Nachweis der Kanamycinresistenz-Kassette alleine mit dem Primer-Paar *k2* und *kt* ergab ein Fragment der Größe 417 bp (siehe Abb. 3.5).

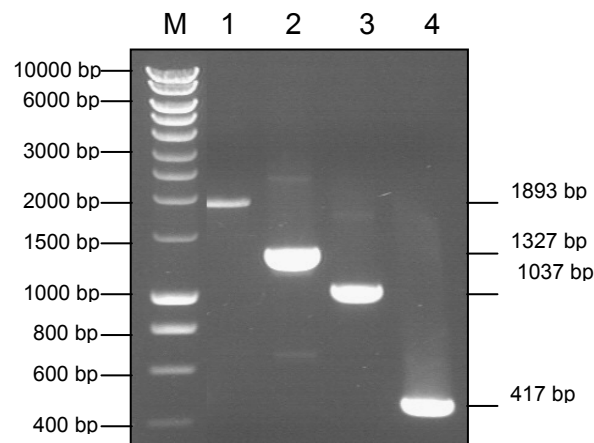


Abb. 3.5: Analytische PCR zur Überprüfung der Integration der Kanamycinresistenz-Kassette im Rahmen der *marR*-Deletion in *S. Hadar*. M = Smart-Ladder; Spur 1 = Nachweis-PCR mit den Primern *mar_for* und *mar_rev*; Spur 2 = Nachweis-PCR mit den Primern *mar_for* und *kt*; Spur 3 = Nachweis-PCR mit den Primern *k2* und *mar_rev*; Spur 4 = Nachweis-PCR mit den Primern *k2* und *kt*.

Zur Excision der Kanamycinresistenz-Kassette wurden die *S. Hadar*-Integrianten-Zellen, wie unter 2.2.14 beschrieben, mit dem Helferplasmid pCP20 (siehe Abb. 2.2), welches die FLP-Rekombinase exprimiert, transformiert.

Die positiven Transformanten wurden anschließend auf TYE-Platten ohne Antibiotikum gepickt und zur Expression der Rekombinase über Nacht bei 43 °C inkubiert. Nach Excision der Kanamycinresistenz-Kassette blieb nur eine wenige Basenpaare große Narbensequenz zurück (siehe Abb. 3.6).

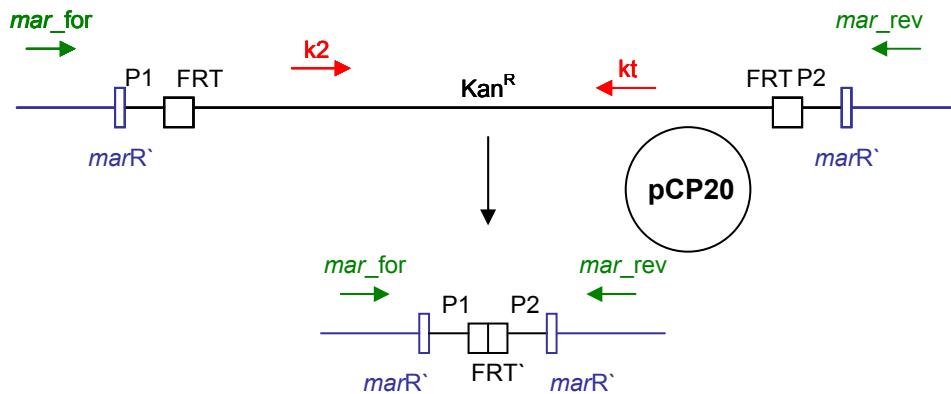


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der Excision der Kanamycinresistenz-Kassette mittels pCP20 (FLP-Rekombinase-Expressionsplasmid). P1/2 = *priming site*; FRT = *FLP recognition target*; Kan^R = Kanamycinresistenz-Kassette; *marR*' = *marR*-Fragment; FRT' = FRT-Fragment; *mar_for*/*mar_rev* = Primer, die zum Nachweis der Excision der Kanamycinresistenz-Kassette eingesetzt wurden.

Die Klone wurden phänotypisch auf den Verlust der Kanamycinresistenz überprüft. Mittels PCR wurde die Excision der Kanamycinresistenz-Kassette verifiziert. Eine PCR mit dem Primer-Paar *mar_for* und *mar_rev* ergab nach Excision der Kanamycinresistenz-Kassette ein Fragment der Größe 425 bp (siehe Abb. 3.7). PCRs mit den Primer-Paaren *mar_for* und *kt*, *k2* und *mar_rev* sowie *k2* und *kt* ergaben keine PCR-Produkte.

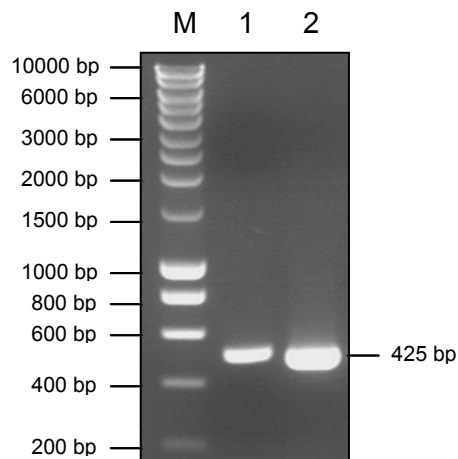


Abb. 3.7: Analytische PCR zur Überprüfung der Excision der Kanamycinresistenz-Kassette im Rahmen der *marR*-Deletion in *S. Hadar*. M = Smart-Ladder; Spur 1 = Nachweis-PCR mit den Primern *mar_for* und *mar_rev*, Klon 1; Spur 2 = Nachweis-PCR mit den Primern *mar_for* und *mar_rev*, Klon 2.

Es wurden *marR*-Deletionsmutanten des *S. Hadar*-Wildtypstammes (D) sowie der Erstschrift-Mutante D1a und der Zweitschrift-Mutante D11a hergestellt. Im Folgenden werden die *marR*-Deletionsmutanten als *DΔmarR*, *D1aΔmarR* sowie *D11aΔmarR* bezeichnet.

3.5.2 Charakterisierung der *marR*-Deletionsmutanten

Zur phänotypischen Charakterisierung der Auswirkungen der *marR*-Deletion wurden die Antibiotika-Empfindlichkeiten (siehe 2.2.5) der *marR*-Deletionsmutanten im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypstämmen ermittelt. Bestimmt wurden die MHK-Werte der Antibiotika Ciprofloxacin sowie Chloramphenicol jeweils in An- und Abwesenheit des EPIs Phenylalanyl-Arginyl- β -Naphthylamid (64 $\mu\text{g/ml}$) (siehe Tab. 3.8).

Tab. 3.8: Ergebnisse der MHK-Wert-Bestimmung der *marR*-Deletionsmutanten im Vergleich zu dem entsprechenden Wildtypstamm in An- und Abwesenheit des Effluxpumpeninhibitors Phenylalanyl-Arginyl- β -Naphthylamid (64 $\mu\text{g/ml}$). D = S. Hadar; Dia = Erstschrift-Mutante; DIIa = Zweitschrift-Mutante; $\Delta marR$ = *marR*-Deletion; Cip = Ciprofloxacin; Clm = Chloramphenicol.

Stamm	CIP [$\mu\text{g/ml}$]	CIP [$\mu\text{g/ml}$] + EPI	Clm [$\mu\text{g/ml}$]	Clm [$\mu\text{g/ml}$] + EPI
D	0,03	0,015	4	1
D $\Delta marR$	0,03	0,015	4	1
Dia	0,5	0,24	4	1
Dia $\Delta marR$	0,015	0,015	4	1
DIIa	2	0,5	16	2
DIIa $\Delta marR$	0,015	0,0075	4	1

Die MHK-Wert-Bestimmungen ergeben für D und D $\Delta marR$ identische Werte. Die MHK-Werte der *marR*-Deletionsmutanten der Erst- und Zweitschrift-Mutanten liegen für Ciprofloxacin 5 - 7 Verdünnungsstufen unter denen der entsprechenden Wildtypstämme. Für Chloramphenicol liegt der Wert von DIIa $\Delta marR$ 2 Verdünnungsstufen unter dem Wert von DIIa. In Anwesenheit des EPIs sinken die Werte der Erst- und Zweitschrift-Mutanten deutlich stärker als die Werte für die entsprechenden Deletionsmutanten.

Die *marR*-Deletionsmutanten verhalten sich hinsichtlich der MHK-Werte nicht wie erwartet (siehe Diskussion 4.5). Bei Deletion von *marR* wäre durch Überexpression von *marA* eine verstärkte Expression von Effluxpumpen und eine dadurch bedingte Verringerung der Empfindlichkeit zu erwarten gewesen. Die MHK-Werte in Anwesenheit des EPIs lassen vermuten, dass Efflux bei den Deletionsmutanten keine besondere Bedeutung mehr hat, *marA* demnach nicht mehr exprimiert wird.

Um auszuschließen, dass Sekundärstrukturen, die möglicherweise nur in den $\Delta marR$ -Stämmen auftreten, für die mangelnde Expression von *marA* verantwortlich sind, wurde eine MHK-Wert-Bestimmung der Deletionsmutanten vor Excision der Kanamycinresistenz-Kassette (Integrianten) durchgeführt, die identische Ergebnisse lieferte.

Die Deletion wurde anschließend mit einem weiteren Primer-Paar (*dmarR_for2* und *dmarR_rev2*, siehe Tab. 2.4) wiederholt, um auszuschließen, dass die fehlende Expression von *marA* sequenzspezifische Ursachen hat. Allerdings zeigten die mit dem

zweiten Primerpaar erzeugten *marR*-Deletionsmutanten ein ähnliches MHK-Wert-Profil, wie die zuvor konstruierten Mutanten.

Zur Überprüfung der Expression von *marA* in den Deletionsmutanten wurden mittels real-time PCR (siehe 2.2.19.2) die Transkriptmengen von *marA* (mit den Primern *marA_for*(rt) und *marA_rev*(rt), siehe Tab. 2.4) in D und in $D\Delta marR$ verglichen. In $D\Delta marR$ wurde eine 6,3-fache Aufregulation von *marA* bestimmt. Da die Deletion von *marR* demnach zu einer verstärkten Expression von *marA* führt, scheint die mangelnde Funktionalität von MarA eher ein Problem auf Ebene der Translation zu sein.

Die *marR*-Deletion sollte der Identifizierung exklusiv über MarA regulierter Effluxpumpen dienen. Die Identifizierung der auf diese Weise regulierten Pumpen wurde alternativ mittels Salicylsäure-Induktion erreicht (siehe 3.6.5.1). Durch die Bindung von Salicylsäure an den Repressor MarR erfolgt ebenfalls eine verstärkte Expression von *marA*. Ein geringfügiger Nachteil an dieser Strategie, gegenüber der *marR*-Deletion, ist jedoch die Unkenntnis darüber, was Salicylsäure, neben der Inaktivierung von MarR, möglicherweise außerdem in der Zelle bewirkt.

3.6 Untersuchungen zur Expression von Effluxpumpen und Regulatoren

Zur Untersuchung der Expression von Effluxpumpen und Regulatoren in den In-vitro-selektierten Stämmen wurden quantitative real-time (qrt) PCR-Experimente durchgeführt. Bestimmt wurde einerseits die Expression bestimmter Gene der Zweitschritt-Mutanten von *S. Typhimurium* (BII, CII) und *S. Hadar* (Dlb-4a-2, DIIa) im Vergleich zu der Genexpression der entsprechenden Wildtyp-Stämme bzw. andererseits die Expression bestimmter Effluxpumpen- und Regulatorgene nach Induktion oder Überexpression im Vergleich zu der Expression im nicht-induzierten Referenzstamm.

Für jedes Experiment wurden drei biologische Proben (drei verschiedene Anzuchten) verwendet. Aus jeder Probe wurde unabhängig voneinander die Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.2.17). Mit den 3'-Primern des real-time PCR Primer-Paares wurde die reverse Transkription (siehe 2.2.19.1) durchgeführt und die Proben wurden im Anschluss in einer Dreifachbestimmung der qrt-PCR (siehe 2.2.19.2) unterzogen. Die verwendeten Primer sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen (Benennung: Genname_for bzw. rev(rt)). Anschließend wurden die Mittelwerte der zu vergleichenden Proben, wie z. B. Wildtyp und Mutante, ins Verhältnis gesetzt. Die Signifikanz aller Werte wurde mit Hilfe des t-Testes (zweiseitig, $\alpha = 0,05$), dem Vergleich der Mittelwerte, berechnet. Die daraus resultierenden p-Werte lagen alle unter 0,05.

3.6.1 Auswahl geeigneter Kontrollgene

Ein *housekeeping gene* im eigentlichen Sinne, wie es von qrt-PCR-Experimenten eukaryotischer Gene bekannt ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet. Da sich im Laufe der Anzucht einer Bakterienkultur kontinuierlich das Expressionsmuster der Gene verändert, ist es nicht möglich Gene zu finden (wie beispielsweise das für die eukaryotische GAP-DH kodierende Gen), die während jeglicher Kulturbedingungen konstant exprimiert werden. Aus diesem Grunde wurde die zur reversen Transkription eingesetzte Gesamt-RNA-Menge konstant gehalten (41), anstatt die ermittelte Genexpression auf die Expression eines unabhängigen, konstant exprimierten Kontrollgenes zu beziehen.

Um ausschließen zu können, dass bestimmte (induzierende) Bedingungen die Genexpression insgesamt erhöhen, wurden die Gene *rpoE* (kodiert für den σ -Faktor der RNA-Polymerase der extremen Hitzeschockgene) sowie *rpoN* (kodiert für den σ -Faktor der RNA-Polymerase von Genen des Stickstoff-Stoffwechsels) mitgeführt, die unter allen Versuchsbedingungen in den zu vergleichenden Stämmen einheitlich exprimiert wurden.

3.6.2 Untersuchungen zur Induktion von Effluxpumpen und Regulatoren durch Fluorchinolone und Chloramphenicol

Es ist bekannt, dass die Regulation von Effluxpumpen einem komplizierten Netzwerk aus lokalen (siehe 1.5.1) sowie globalen (siehe 1.5.2) Regulatoren unterliegt. Um der Frage nachzugehen, ob möglicherweise eine direkte Induktion von Pumpen und/ oder Regulatoren durch Substrate stattfindet oder ob Fluorchinolone möglicherweise indirekt über eine Veränderung des Superspiralisierungsgrades Einfluß auf die Regulation nehmen, wurden Induktionsexperimente mit diversen Fluorchinolonen sowie mit Chloramphenicol durchgeführt.

Der *S. Hadar*-Wildtypstamm (D) und die Zweitschritt-Mutante (DIIa) wurden in Anwesenheit der entsprechenden Fluorchinolone bzw. von Chloramphenicol in LB-Bouillon kultiviert. Als Referenz dienten dieselben Stämme nicht-induziert. Induziert wurde mit einer Konzentration von 0,5 x MHK zu Beginn der Kultivierung. Die Zugabe von Ciprofloxacin erfolgte zusätzlich in höheren Konzentrationen (5 x MHK, 50 x MHK) sowie für kürzere Zeiten (15 min, 30 min, 60 min). Mittels quantitativer real-time PCR wurde die Expression der Gene *acrA* (repräsentiert die Effluxpumpe AcrAB-TolC) sowie *marA* (kodiert für den globalen Regulator MarA) bestimmt. Abbildung 3.8 zeigt die x-fache Expressionsänderung der beiden Gene in *S. Hadar* nach Induktion mit diversen Fluorchinolonen sowie mit Chloramphenicol.

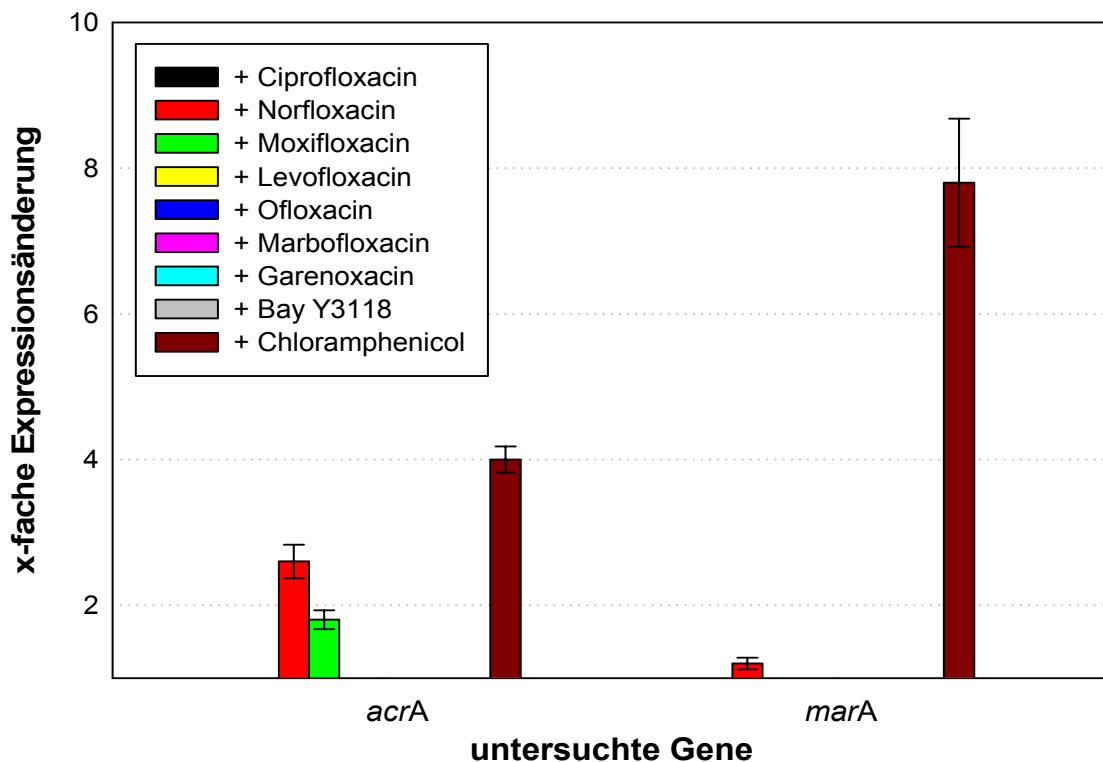


Abb. 3.8: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung von *acrA* sowie *marA* in *S. Hadar* (D) nach Induktion mit diversen Fluorchinolonen und Chloramphenicol (0,5 x MHK).

Tabelle 3.9 gibt einen Überblick über die genauen Werte der in Abb. 3.8 dargestellten Expressionsänderungen. Aufgeführt sind zudem die Induktionsexperimente mit höheren Ciprofloxacin-Konzentrationen und kürzeren Induktionszeiten sowie die Werte für die Zweitschritt-Mutante DIIa.

Tab. 3.9: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung [%] von *acrA* sowie *marA* in *S. Hadar*-WT (D) sowie der Zweitschritt-Mutante (DIIa) nach Induktion mit diversen Fluorchinolonen und Chloramphenicol. In Klammern angegeben sind die Konzentration [x MHK] des jeweiligen Induktors sowie die Induktionszeit [min]. Fehlt die Konzentrationsangabe, so wurde mit 0,5 x MHK gearbeitet. Fehlt die Zeitangabe, so wurde der Induktor mit Beginn der Kultivierung zugesetzt.

Stamm	Induktor (Konzentration, Induktionszeit)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standard- abweichung [%]
D	Ciprofloxacin	<i>acrA</i>	1	0
		<i>marA</i>	1	0
	Ciprofloxacin (5 x MHK, 15 min)	<i>acrA</i>	1	0
		<i>marA</i>	1	0
	Ciprofloxacin (50 x MHK, 15 min)	<i>acrA</i>	1	0
		<i>marA</i>	1	0
	Ciprofloxacin (50 x MHK, 30 min)	<i>acrA</i>	1	0
		<i>marA</i>	1	0
	Ciprofloxacin (50 x MHK, 60 min)	<i>acrA</i>	1	0
		<i>marA</i>	1	0

Tab. 3.9: Fortsetzung.

Stamm	Induktor (Konzentration, Induktionszeit)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standard- abweichung [%]
D	Norfloxacin	<i>acrA</i>	2,6	8,8
		<i>marA</i>	1,2	6,9
	Moxifloxacin	<i>acrA</i>	1,8	7,1
		<i>marA</i>	1	0
	Levofloxacin	<i>acrA</i>	1	0
		<i>marA</i>	1	0
	Ofloxacin	<i>acrA</i>	1	0
		<i>marA</i>	1	0
	Marbofloxacin	<i>acrA</i>	1	0
		<i>marA</i>	1	0
	Garenoxacin	<i>acrA</i>	1	0
		<i>marA</i>	1	0
D	Chloramphenicol	<i>acrA</i>	4	4,5
		<i>marA</i>	7,8	11,3
DIIa	Ciprofloxacin	<i>acrA</i>	1	0
		<i>marA</i>	1	0

Die Zugabe von Ciprofloxacin führt in keiner Konzentration (0,5 x MHK, 5 x MHK, 50 x MHK) und nach keiner Induktionszeit (15 min, 30 min, 60 min, von Beginn der Kultivierung an) zu einer Expressionsänderung des Effluxpumpengens *acrA* oder des Regulatorgens *marA*. Von den übrigen Fluorchinolonen, die in einer Konzentration von 0,5 x MHK zu Beginn der Kultivierung eingesetzt wurden, bewirkt Norfloxacin eine geringe Aufregulation von *acrA* (2,6 x) und *marA* (1,2 x) sowie Moxifloxacin eine geringe Aufregulation von *acrA* (1,8 x). Die Zugabe von Chloramphenicol führt zu einer höheren Expressionssteigerung der untersuchten Gene (*acrA*: 4 x; *marA*: 7,8 x).

3.6.3 Vergleich der Expression von Effluxpumpen in Wildtyp- und Mutantenstämmen

Zur Beantwortung der Frage welche Effluxpumpen in welchem Maße durch verstärkte Expression zu dem Resistenzphänotyp der Zweitschritt-Mutanten beitragen, wurden die Transkriptmuster diverser Gene für *mdr* Effluxpumpen untersucht.

Ausgewählt wurden Effluxpumpen aus allen bekannten Familien, die bei gramnegativen Bakterien von Bedeutung sind (siehe 1.4.1). Gewählt wurden die RND-Pumpen AcrAB-TolC, AcrEF-TolC sowie YegMNO(MdtABC)-TolC. Sind die Gene in einem Operon organisiert, wie z. B. *acrA* (kodiert für das Membranfusionsprotein) und *acrB* (kodiert für den Transporter in der Cytoplasmamembran), wurde stellvertretend nur die Transkriptmenge eines Gens ermittelt (hier die von *acrA*). Als Kandidat der MFS-Pumpen

wurde EmrAB und aus der Gruppe der MATE-Pumpen wurde YdhE (209) gewählt. Aus der SMR-Familie wurden die Pumpen YdgE, YdgF sowie MdfA mitgeführt, die sich jedoch hinsichtlich der Transkriptmengen in den untersuchten Mutanten- und Wildtypstämmen nicht unterschieden (siehe zur Auswahl der Effluxpumpen-Gene auch 3.4). Die Anzucht der Stämme erfolgte in LB-Bouillon.

Abbildung 3.9 sowie Tabelle 3.10 zeigen die veränderte Genexpression verschiedener Effluxpumpen in den Zweitschritt-Mutanten BII, CII, DIIa sowie DIb-4a-2 im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypstämmen (B, C und D).

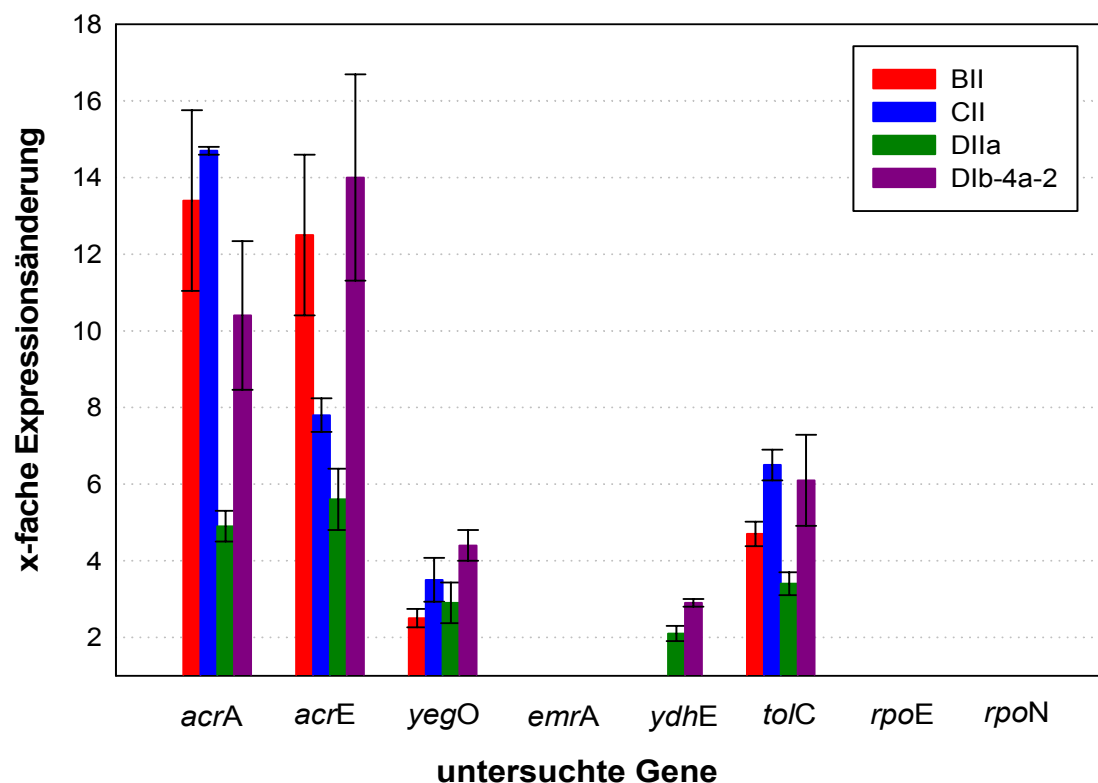


Abb. 3.9: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung der untersuchten Effluxpumpengene sowie der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* in den Zweitschritt-Mutanten BII, CII, DIIa und DIb-4a-2 im Vergleich zu den Wildtypstämmen (B, C, D).

Tab. 3.10: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung der untersuchten Effluxpumpengene sowie der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* in den Zweitschritt-Mutanten BII, CII, DIIa und DIb-4a-2 im Vergleich zu den Wildtypstämmen (B, C, D).

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
BII (B)	<i>acrA</i>	13,4	17,6
	<i>acrE</i>	12,5	16,8
	<i>yegO</i>	2,5	9,5
	<i>emrA</i>	1	0
	<i>ydhE</i>	1	0
	<i>tolC</i>	4,7	6,8

Tab. 3.10: Fortsetzung.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0
CII (C)	<i>acrA</i>	14,7	6,8
	<i>acrE</i>	7,8	5,6
	<i>yegO</i>	3,5	16,4
	<i>emrA</i>	1	0
	<i>ydhE</i>	1	0
	<i>tolC</i>	6,5	6,2
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0
DIIa (D)	<i>acrA</i>	4,9	8,2
	<i>acrE</i>	5,6	14,3
	<i>yegO</i>	2,9	18,2
	<i>emrA</i>	1	0
	<i>ydhE</i>	2,1	9,5
	<i>tolC</i>	3,4	8,8
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0
DIIb-4a-2 (D)	<i>acrA</i>	10,4	18,7
	<i>acrE</i>	14,0	19,2
	<i>yegO</i>	4,4	9,1
	<i>emrA</i>	1	0
	<i>ydhE</i>	2,9	3,4
	<i>tolC</i>	6,1	19,5
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0

Eine deutlich erhöhte Expression zeigen vor allem die Effluxpumpengene *acrA* und *acrE*, wobei Stamm-spezifische Unterschiede deutlich werden. In DIIa beträgt die Aufregulation nur etwa 5-fach, wohingegen die Expressionssteigerung in den übrigen Stämmen, mit Ausnahme von *acrE* bei CII, >10-fach beträgt. Bezüglich der Expression von *yegO* lässt sich in den In-vitro-Mutanten eine Steigerung von etwa 2 - 4-fach, hinsichtlich der von *tolC* eine Steigerung von etwa 4 - 6-fach beobachten. Die Expression von *ydhE* zeigt nur in den S. Hadar-Mutanten eine geringe Steigerung (2 - 3-fach). Unverändert sind die Transkriptmuster des Effluxpumpengens *emrA* sowie die der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN*.

3.6.4 Vergleich der Expression von Regulatoren in Wildtyp- und Mutantenstämmen

Zur Beantwortung der Frage, welche Regulatoren durch verstärkte Expression in welchem Maße zu dem Resistenzphänotyp der Zweitschritt-Mutanten beitragen, wurden die Transkriptmuster der Gene, die für die globalen Regulatoren MarA, SoxS, Rob und Rma kodieren (siehe 1.5.2), untersucht. Die Anzucht der Stämme erfolgte in LB-Bouillon.

Abbildung 3.10 sowie Tabelle 3.11 zeigen die veränderte Genexpression der Regulatoren in den Zweitschritt-Mutanten BII, CII, DIIa sowie DIb-4a-2 im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypstämmen (B, C und D).

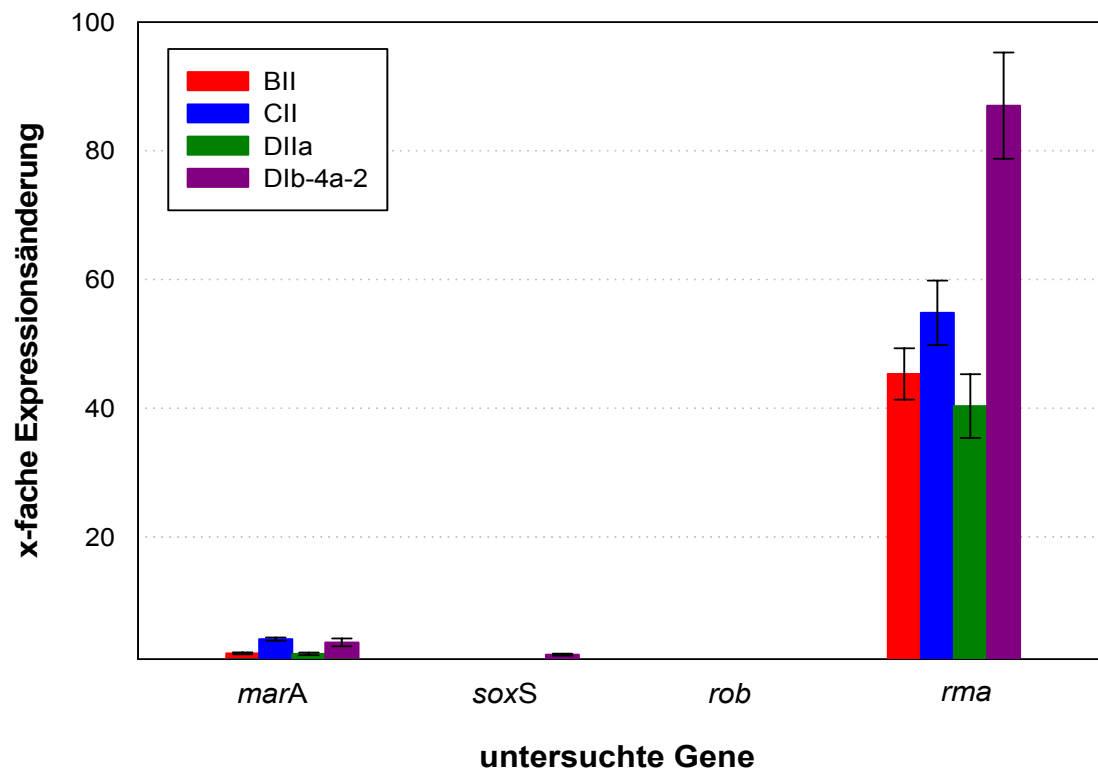


Abb. 3.10: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung der untersuchten Regulatorengene in den Zweitschritt-Mutanten BII, CII, DIIa und DIb-4a-2 im Vergleich zu den Wildtypstämmen (B, C, D).

Tab. 3.11: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung der untersuchten Regulatorengene in den Zweitschritt-Mutanten BII, CII, DIIa und DIb-4a-2 im Vergleich zu den Wildtypstämmen (B, C, D).

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
BII (B)	<i>marA</i>	1,9	12,3
	<i>soxS</i>	1	0
	<i>rob</i>	1	0
	<i>rma</i>	45,3	8,8
CII (C)	<i>marA</i>	4,1	6,2
	<i>soxS</i>	1	0
	<i>rob</i>	1	0
	<i>rma</i>	54,8	9,3
DIIa (D)	<i>marA</i>	1,8	11,4
	<i>soxS</i>	1	0
	<i>rob</i>	1	0
	<i>rma</i>	40,3	12,3
DIb-4a-2 (D)	<i>marA</i>	3,6	16,7
	<i>soxS</i>	1,7	8,4
	<i>rob</i>	1	0
	<i>rma</i>	87,0	9,5

Eine deutliche Expressionssteigerung, von >80-fach in der Zweitschritt-Mutante Dlb-4a-2 und von etwa 40 - 50-fach in den übrigen untersuchten In-vitro-Mutanten, zeigt das Regulatorgen *rma*. Eine vergleichsweise geringfügig erhöhte Expression wird bei *marA* beobachtet (etwa 2 - 4-fach). Die Expression von *soxS* ist nur in Dlb-4a-2 geringfügig erhöht (1,7-fach). Unverändert ist das Transkriptmuster von *rob*.

3.6.5 Vergleich der Expression von Effluxpumpen und Regulatoren nach Induktion verschiedener Regulatoren

Um der Frage nachzugehen, welche Effluxpumpen von welchen globalen Regulatoren angesprochen werden und in welchem Maße Regulationskaskaden über mehrere Regulatoren stattfinden, wurden Induktionsexperimente durchgeführt.

3.6.5.1 Induktion von *marA* mittels Salicylsäure

Die Expression von *marA* kann in *E. coli* durch Zugabe von Salicylsäure erhöht werden (55). Der Induktor Salicylsäure bindet an den lokalen Repressor MarR und führt zu dessen Inaktivierung, woraufhin die ungehinderte Expression des globalen Regulatorgens *marA* stattfinden kann.

Die Anzucht der Kulturen erfolgte in LB-Bouillon. Der Induktor Salicylsäure wurde in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml (entspricht 0,5 x MHK) zu Beginn der Anzucht zugesetzt. Abbildung 3.11 sowie Tabelle 3.12 zeigen die Veränderungen in der Genexpression der Regulatoren in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit Salicylsäure. Das Gen *sodA* kodiert für die von SoxS angesprochene Superoxid-Dismutase (76) und wurde als Kontrolle mitgeführt.

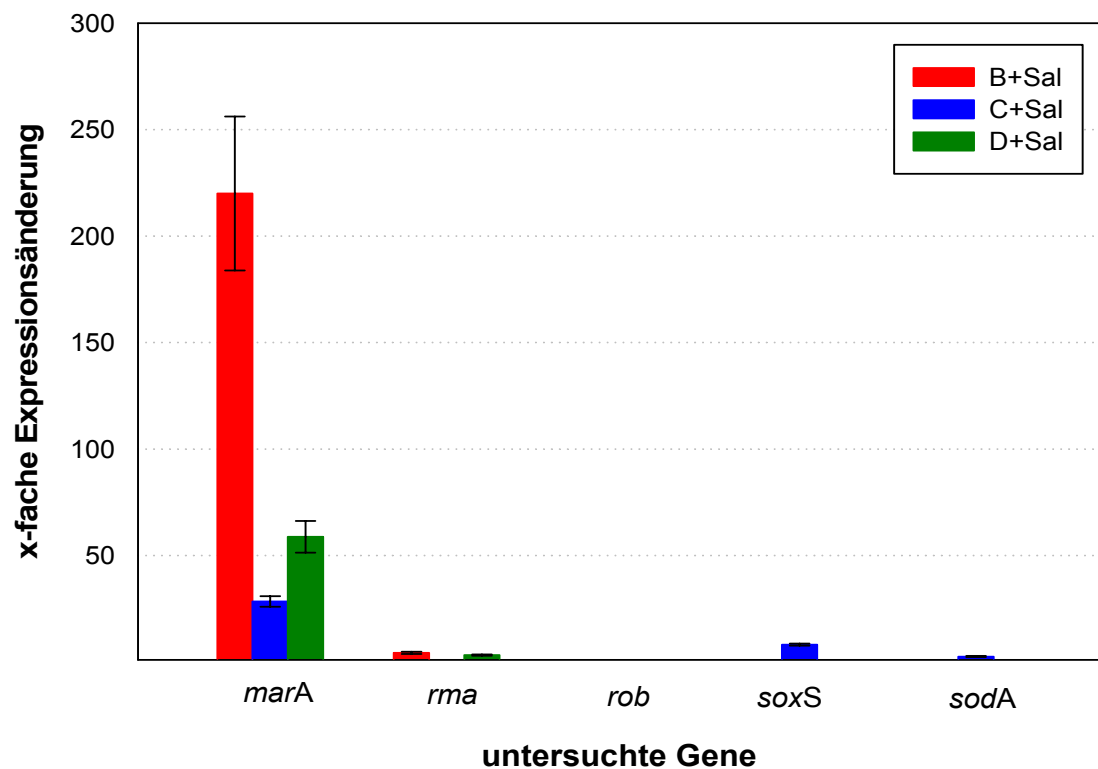


Abb. 3.11: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung der untersuchten Regulatorengene sowie von *sodA* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit Salicylsäure (0,5 mg/ml) im Vergleich zu den nicht-induzierten Wildtypstämmen.

Tab. 3.12: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung der untersuchten Regulatorengene sowie von *sodA* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit Salicylsäure (0,5 mg/ml) im Vergleich zu den nicht-induzierten Wildtypstämmen.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
B + Salicylsäure [0,5 mg/ml] (B)	<i>marA</i>	220,0	16,4
	<i>rma</i>	4,3	12,3
	<i>rob</i>	1	0
	<i>soxS</i>	1	0
	<i>sodA</i>	1	0
C + Salicylsäure [0,5 mg/ml] (C)	<i>marA</i>	28,4	8,7
	<i>rma</i>	1	0
	<i>rob</i>	1	0
	<i>soxS</i>	8,1	6,3
	<i>sodA</i>	2,5	11,9
D + Salicylsäure [0,5 mg/ml] (D)	<i>marA</i>	58,8	12,6
	<i>rma</i>	3,2	9,4
	<i>rob</i>	1	0
	<i>soxS</i>	1	0
	<i>sodA</i>	1	0

Nach Zugabe des Induktors Salicylsäure ist in allen untersuchten Stämmen eine deutliche Aufregulation der Expression von *marA* zu beobachten. Bei den Stämmen B und D findet zudem eine leichte Expressionssteigerung (etwa 3 - 4-fach) des Regulatorgens *rma* statt. Zudem sind bei C eine etwa 8-fache Expressionssteigerung von *soxS* sowie eine 2,5-fache Steigerung von *sodA* zu beobachten.

Der Abbildung 3.12 sowie der Tabelle 3.13 ist die veränderte Genexpression der Effluxpumpen in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit Salicylsäure zu entnehmen.

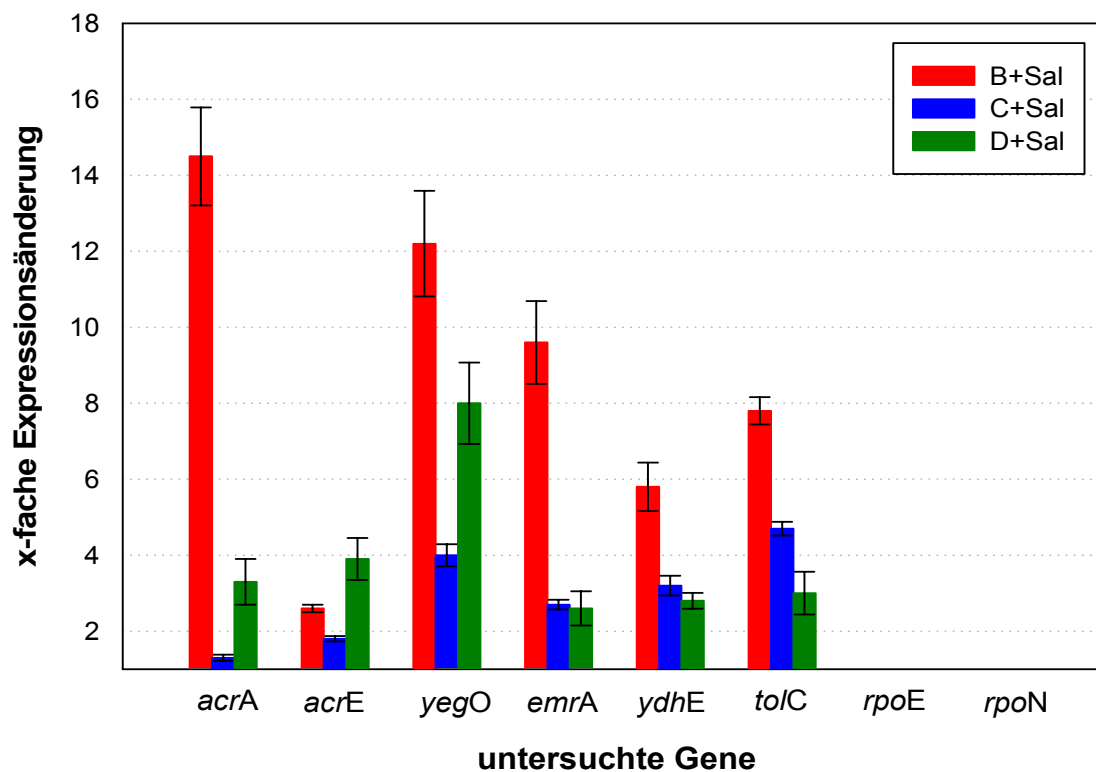


Abb. 3.12: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung der untersuchten Effluxpumpengene sowie der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit Salicylsäure (0,5 mg/ml) im Vergleich zu den nicht-induzierten Wildtypstämmen.

Tab. 3.13: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung der untersuchten Effluxpumpengene sowie der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit Salicylsäure (0,5 mg/ml) im Vergleich zu den nicht-induzierten Wildtypstämmen.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
B + Salicylsäure [0,5 mg/ml] (B)	<i>acrA</i>	14,5	8,9
	<i>acrE</i>	2,6	4,2
	<i>yegO</i>	12,2	12,8
	<i>emrA</i>	9,6	11,4

Tab. 3.13: Fortsetzung.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
	<i>ydhE</i>	5,8	11,4
	<i>tolC</i>	7,8	4,6
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0
C+ Salicylsäure [0,5 mg/ml] (C)	<i>acrA</i>	1,3	6,4
	<i>acrE</i>	1,8	5,7
	<i>yegO</i>	4	7,2
	<i>emrA</i>	2,7	4,8
	<i>ydhE</i>	3,2	8,1
	<i>tolC</i>	4,7	3,9
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0
D + Salicylsäure [0,5 mg/ml] (D)	<i>acrA</i>	3,3	18,2
	<i>acrE</i>	3,9	14,2
	<i>yegO</i>	8	13,4
	<i>emrA</i>	2,6	17,3
	<i>ydhE</i>	2,8	7,6
	<i>tolC</i>	3	18,6
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0

Nach Induktion mit Salicylsäure zeigen alle untersuchten Gene für *mdr* Effluxpumpen bei allen Stämmen eine erhöhte Expression. Auffällig ist die jeweils stärkste Expressionssteigerung im Stamm B, von etwa 14-fach bei *acrA*, etwa 12-fach bei *yegO* und etwa 10-fach bei *emrA*. Die Steigerungen der Expression der Gene für *mdr* Effluxpumpen in den Stämmen C und D liegen, mit Ausnahme von *acrA* (1,3-fach) und *acrE* (1,8-fach) bei C sowie von *yegO* (8-fach) bei D, im Bereich von 2 – 5-fach. Unverändert sind die Transkriptmuster der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN*.

3.6.5.1.1 Phänotypische Auswirkungen der verstärkten Expression von *marA*

Zur Beurteilung, inwiefern die durch Induktion von *marA* hervorgerufene Expressionssteigerung der Effluxpumpen die Sensibilität der untersuchten *Salmonella*-Stämme beeinflusst, wurden Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) durchgeführt. Unter Zugabe des Induktors Salicylsäure wurden, wie unter 2.2.5 beschrieben, die Empfindlichkeiten gegenüber Ciprofloxacin und Chloramphenicol bestimmt.

Zur Induktion des globalen Regulators *marA* wurden den Bakteriensuspensionen (auf McFarland 0,5 eingestellt) nach Verdünnung in MH-Bouillon 0,5 mg/ml Salicylsäure (0,5 x MHK) zugesetzt. Da die erwarteten Unterschiede der MHK-Werte zwischen dem

induzierten Stamm und dem Referenzstamm relativ gering ausfielen, wurden für die Antibiotika-Konzentrationen nicht die üblichen doppelten Verdünnungsstufen, sondern kleinere Abstufungen gewählt. Tabelle 3.14 zeigt die Werte der MHK-Bestimmung für *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) und für *S. Hadar* (D) sowie für die entsprechenden Zweitschritt-Mutanten.

Tab. 3.14: MHK-Wert-Bestimmung für *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) und *S. Hadar* (D) sowie für die entsprechenden Zweitschritt-Mutanten nach Induktion mit Salicylsäure (0,5 mg/ml). Cip = Ciprofloxacin; Clm = Chloramphenicol.

Stamm	Cip [$\mu\text{g/ml}$]	Clm [$\mu\text{g/ml}$]
B	0,02	4
B + Salicylsäure (0,5 mg/ml)	0,05	6
BII	4	14
BII + Salicylsäure (0,5 mg/ml)	6	32
C	0,025	5
C+ Salicylsäure (0,5 mg/ml)	0,055	8
CII	5	26
CII + Salicylsäure (0,5 mg/ml)	5	32
D	0,02	4
D + Salicylsäure (0,5 mg/ml)	0,045	7
DIIa	3	12
DIIa + Salicylsäure (0,5 mg/ml)	5	22
DIIb-4a-2	1	8
DIIb-4a-2 + Salicylsäure (0,5 mg/ml)	2	10

Mit Ausnahme der Zweitschritt-Mutante CII gegenüber Ciprofloxacin zeigen alle untersuchten Stämme leichte MHK-Wert-Erhöhungen.

3.6.5.2 Induktion von *soxS* mittels Paraquat

Die Expression von *soxS* kann durch Zugabe von Paraquat erhöht werden. Das aktive Fe-S-Zentrum des lokalen Regulators *soxR* wird durch die entstehenden reaktiven Sauerstoff-Spezies oxidiert (86) und aktiviert in dieser Form die Expression von *soxS*.

Die Anzucht der Kulturen erfolgte in LB-Bouillon. Der Induktor Paraquat wurde in einer Endkonzentration von 1 mM (entspricht 0,5 x MHK) zu Beginn der Anzucht zugesetzt. Abbildung 3.13 sowie Tabelle 3.15 zeigen die veränderte Genexpression der Regulatoren sowie von *sodA* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit Paraquat.

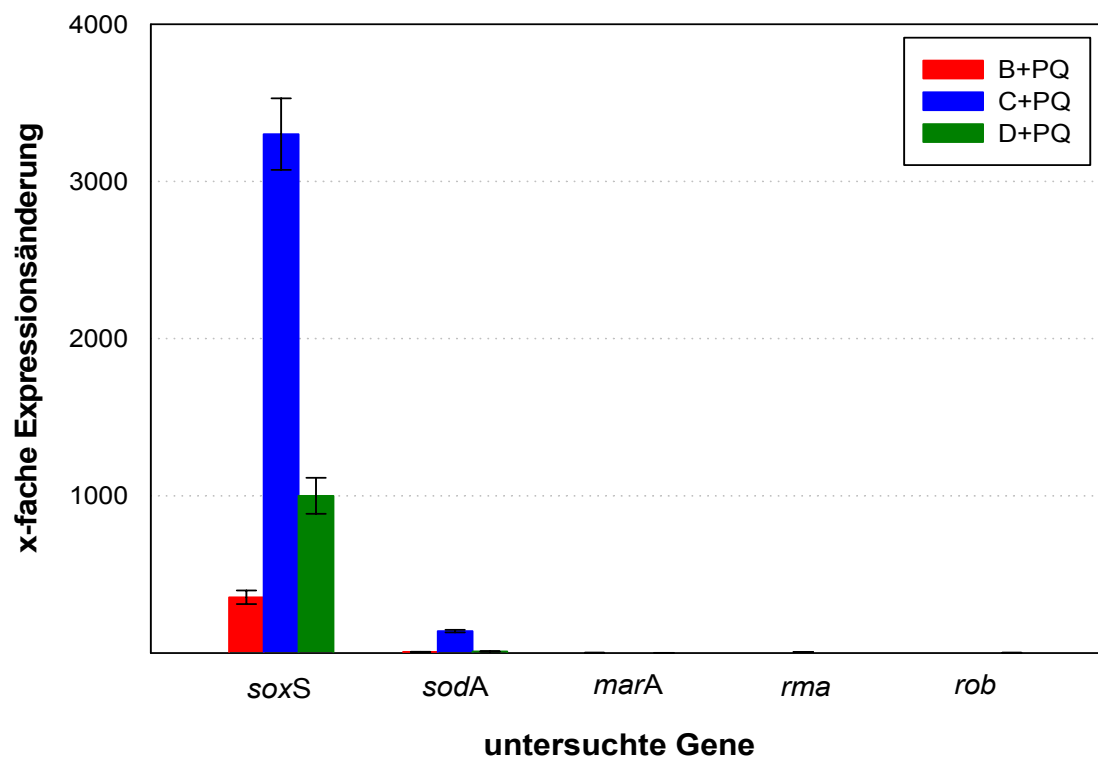


Abb. 3.13: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung der untersuchten Regulatorengene sowie von *sodA* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit Paraquat (1 mM) im Vergleich zu den nicht-induzierten Wildtypstämmen.

Tab. 3.15: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung der untersuchten Regulatorengene sowie von *sodA* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit Paraquat (1 mM) im Vergleich zu den nicht-induzierten Wildtypstämmen.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
B+ Paraquat [1 mM] (B)	<i>soxS</i>	355,0	12,2
	<i>sodA</i>	7,6	9,8
	<i>marA</i>	2,8	6,7
	<i>rma</i>	1	0
	<i>rob</i>	1	0
C+ Paraquat [1 mM] (C)	<i>soxS</i>	3300	6,9
	<i>sodA</i>	140,0	5,6
	<i>marA</i>	1	0
	<i>rma</i>	6,7	3,2
	<i>rob</i>	1	0
D + Paraquat [1 mM] (D)	<i>soxS</i>	1000	11,4
	<i>sodA</i>	10,5	7,8
	<i>marA</i>	1,8	5,1
	<i>rma</i>	1	0
	<i>rob</i>	2,9	6,2

Nach Zugabe von Paraquat findet in allen Stämmen eine starke Expressionssteigerung des Regulatorgens *soxS* (etwa 3300-fach bei C), sowie eine entsprechend schwächere Steigerung von *sodA* (etwa 140-fach bei C) statt. Eine geringe Aufregulation der Transkriptmengen der Effluxpumpengene *marA*, *rma* und *rob* ist Stamm-spezifisch zu beobachten.

Abbildung 3.14 sowie Tabelle 3.16 zeigen die veränderte Genexpression der Effluxpumpen in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit Paraquat (1 mM).

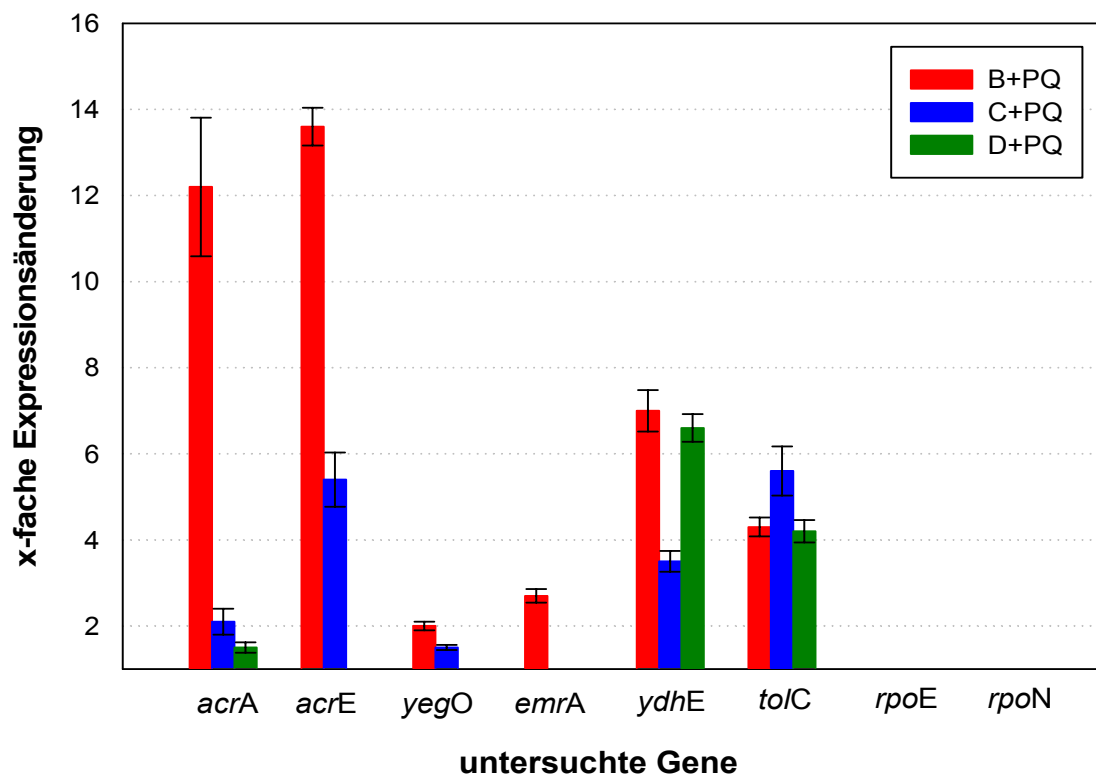


Abb. 3.14: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung der untersuchten Effluxpumpengene sowie der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit Paraquat (1 mM) im Vergleich zu den nicht-induzierten Wildtypstämmen.

Tab. 3.16: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung der untersuchten Effluxpumpengene sowie der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit Paraquat (1 mM) im Vergleich zu den nicht-induzierten Wildtypstämmen.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
B+ Paraquat [1 mM] (B)	<i>acrA</i>	12,2	13,2
	<i>acrE</i>	13,6	3,2
	<i>yegO</i>	2,0	4,8
	<i>emrA</i>	2,7	6,1

Tab. 3.16: Fortsetzung.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
	<i>ydhE</i>	7,0	6,8
	<i>tolC</i>	4,3	5,1
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0
C+ Paraquat [1 mM] (C)	<i>acrA</i>	2,1	14,1
	<i>acrE</i>	5,4	11,7
	<i>yegO</i>	1,5	3,9
	<i>emrA</i>	1	0
	<i>ydhE</i>	3,5	6,8
	<i>tolC</i>	5,6	10,2
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0
D + Paraquat [1 mM] (D)	<i>acrA</i>	1,5	7,7
	<i>acrE</i>	1	0
	<i>yegO</i>	1	0
	<i>emrA</i>	1	0
	<i>ydhE</i>	6,6	4,8
	<i>tolC</i>	4,2	6,2
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0

Deutlich ist die Aufregulation der Expression von *acrA*, *acrE* sowie *ydhE* in dem Stamm B. Die Expression der übrigen untersuchten Gene liegt, mit Ausnahmen von *yegO* bei C (1,5-fach) und *ydhE* (6,6-fach) sowie *acrA* (1,5-fach) bei D, bei allen Stämmen im Bereich von 2 - 6-fach. Unverändert sind die Transkriptmuster von *acrE* und *yegO* bei D, von *emrA* bei C und D sowie die der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN*.

3.6.5.2.1 Phänotypische Auswirkungen der verstärkten Expression von *soxS*

Zur Beurteilung, inwiefern die durch Induktion von *soxS* hervorgerufene Expressionssteigerung der Effluxpumpen die Sensibilität der untersuchten *Salmonella*-Stämme beeinflusst, wurden Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) durchgeführt. Unter Zugabe des Induktors Paraquat wurden die Empfindlichkeiten gegenüber Ciprofloxacin und Chloramphenicol bestimmt (siehe 2.2.5). Wie unter 3.6.5.1.1 für die Induktion mit Salicylsäure beschrieben, wurde den Bakteriensuspensionen 1 mM Paraquat (0,5 x MHK) zugesetzt. Da auch hier die erwarteten MHK-Wert-Unterschiede zwischen dem induzierten Stamm und dem Referenzstamm relativ gering ausfielen, wurden kleinere Abstufungen für die Antibiotika-Konzentrationen gewählt. Tabelle 3.17 zeigt die Werte der MHK-Bestimmung für

S. Typhimurium DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) und für *S. Hadar* (D) sowie für die entsprechenden Zweitschritt-Mutanten.

Tab. 3.17: MHK-Wert-Bestimmung für *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) und *S. Hadar* (D) sowie für die entsprechenden Zweitschritt-Mutanten nach Induktion mit Paraquat (1 mM). Cip = Ciprofloxacin; Clm = Chloramphenicol.

Stamm	Cip [$\mu\text{g/ml}$]	Clm [$\mu\text{g/ml}$]
B	0,02	4
B + Paraquat (1 mM)	0,045	2
BII	4	14
BII + Paraquat (1 mM)	4	10
C	0,025	5
C + Paraquat (1 mM)	0,055	3
CII	5	26
CII + Paraquat (1 mM)	3	24
D	0,02	4
D + Paraquat (1 mM)	0,025	3
DIIa	3	12
DIIa + Paraquat (1 mM)	3	10
DIIb-4a-2	1	6
DIIb-4a-2 + Paraquat(1 mM)	1	3

In Anwesenheit von Paraquat, welches reaktive Sauerstoff-Spezies erzeugt (310, 309), steigen die Empfindlichkeiten aller Stämme gegenüber Chloramphenicol. Die Empfindlichkeiten gegenüber Ciprofloxacin sinken leicht oder bleiben unverändert, mit Ausnahme der Zweitschritt-Mutante CII.

3.6.5.3 Posttranslationale Verstärkung von Rob mittels 2,2'-Bipyridin

Da das globale Regulatorgen *rob* konstitutiv exprimiert wird (137), besteht nicht die Möglichkeit durch Zugabe von Induktoren auf die Genexpression einzuwirken. Die Aktivität von Rob wird jedoch in *E. coli* posttranslational durch Bipyridin erhöht (263).

Die Anzucht der Kulturen erfolgte in LB-Bouillon. Der Aktivator 2,2'-Bipyridin wurde in einer Endkonzentration von 300 μM (entspricht 0,5 x MHK) zu Beginn der Anzucht zugesetzt. Abbildung 3.15 sowie Tabelle 3.18 zeigen die Genexpressionssteigerung der Regulatoren sowie von *sodA* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit 2,2'-Bipyridin.

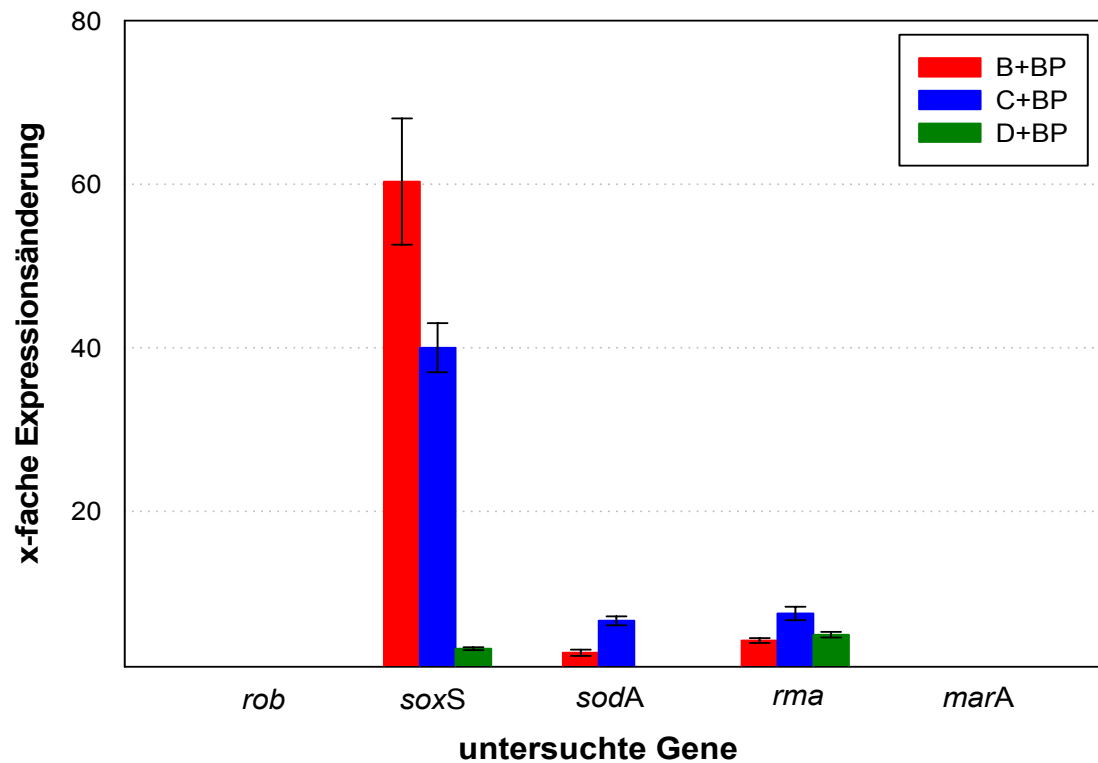


Abb. 3.15: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung der untersuchten Regulatorengene sowie von *sodA* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit 2,2'-Bipyridin (300 µM) im Vergleich zu den nicht-induzierten Wildtypstämmen.

Tab. 3.18: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung der untersuchten Regulatorengene sowie von *sodA* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit 2,2'-Bipyridin (300 µM) im Vergleich zu den nicht-induzierten Wildtypstämmen.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
B + 2,2'-Bipyridin [300 µM] (B)	<i>rob</i>	1	0
	<i>soxS</i>	60,3	12,8
	<i>sodA</i>	2,7	13,7
	<i>rma</i>	4,2	6,9
	<i>marA</i>	1	0
C + 2,2'-Bipyridin [300 µM] (C)	<i>rob</i>	1	0
	<i>soxS</i>	40,0	7,6
	<i>sodA</i>	6,6	8,3
	<i>rma</i>	7,5	10,9
	<i>marA</i>	1	0
D + 2,2'-Bipyridin [300 µM] (D)	<i>rob</i>	1	0
	<i>soxS</i>	3,2	5,4
	<i>sodA</i>	1	0
	<i>rma</i>	4,9	7,1
	<i>marA</i>	1	0

Nach Induktion mit Bipyridin ist die Genexpression von *soxS* in den Stämmen B (etwa 60-fach) und C (40-fach) deutlich, und die von *sodA* entsprechend geringer (2,7-fach bei B, 6,6-fach bei C) erhöht. Das Regulatogen *rma* zeigt abhängig vom Stamm eine 4 - 8-fache Expressionssteigerung. Die Genexpression der Regulatoren *rob* und *marA* ist in keinem der untersuchten Stämme erhöht.

Abbildung 3.16 sowie Tabelle 3.19 zeigen die veränderte Genexpression der Effluxpumpen in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit 2,2'-Bipyridin (300 µM).

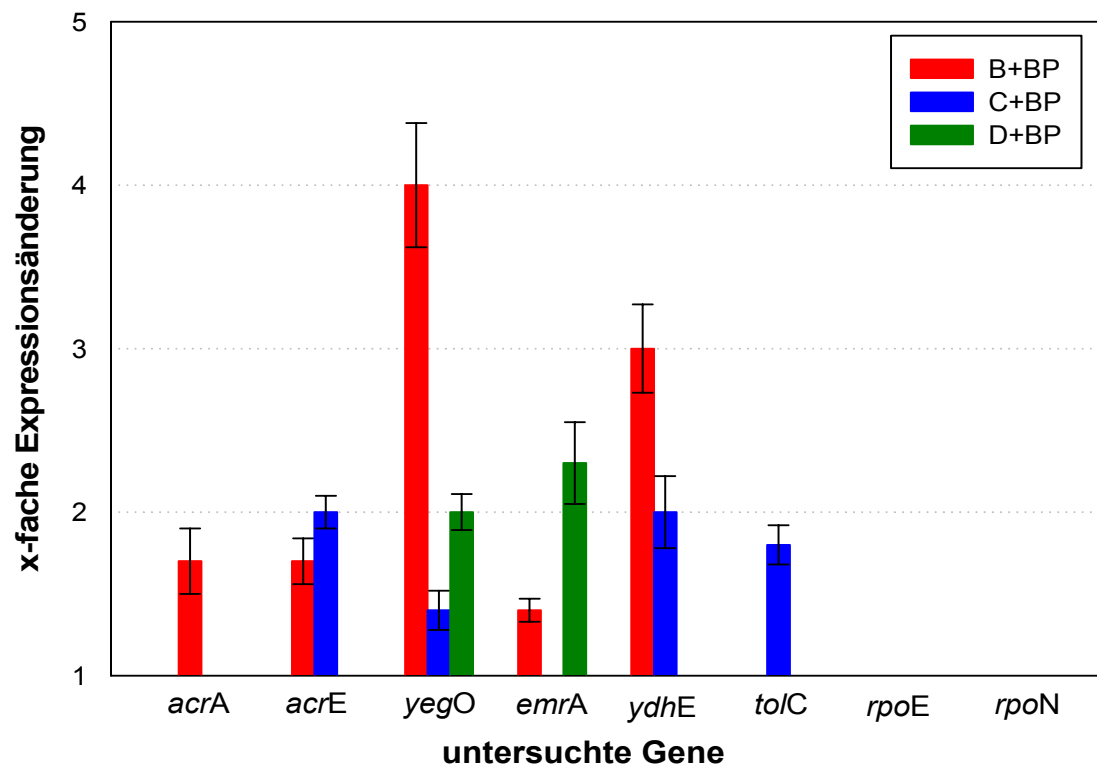


Abb. 3.16: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung der untersuchten Effluxpumpengene sowie der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit 2,2'-Bipyridin (300 µM) im Vergleich zu den nicht-induzierten Wildtypstämmen.

Tab. 3.19: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung der untersuchten Effluxpumpengene sowie der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Induktion mit 2,2'-Bipyridin (300 µM) im Vergleich zu den nicht-induzierten Wildtypstämmen.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
B + 2,2'-Bipyridin [300 µM] (B)	<i>acrA</i>	1,7	11,6
	<i>acrE</i>	1,7	8,4
	<i>yegO</i>	4,0	9,6
	<i>emrA</i>	1,4	5,3
	<i>ydhE</i>	3,0	9,1

Tab. 3.19: Fortsetzung.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
	<i>tolC</i>	1	0
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0
C + 2,2'-Bipyridin [300 µM] (C)	<i>acrA</i>	1	0
	<i>acrE</i>	2,0	4,9
	<i>yegO</i>	1,4	8,6
	<i>emrA</i>	1	0
	<i>ydhE</i>	2,0	11,1
	<i>tolC</i>	1,8	6,6
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0
D + 2,2'-Bipyridin [300 µM] (D)	<i>acrA</i>	1	0
	<i>acrE</i>	1	0
	<i>yegO</i>	2,0	5,3
	<i>emrA</i>	2,3	10,7
	<i>ydhE</i>	1	0
	<i>tolC</i>	1	0
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0

Nach Induktion mit Bipyridin ist die Expression der Effluxpumpengene nur geringfügig erhöht (1,4 - 4-fach). Unverändert sind die Transkriptmuster von *tolC* bei B, von *acrA* und *emrA* bei C und von *acrA*, *acrE*, *ydhE* und *tolC* bei D sowie die der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN*.

3.6.5.3.1 Phänotypische Auswirkungen der posttranslationalen Verstärkung von Rob

Zur Beurteilung, inwiefern die durch posttranslationale Verstärkung von Rob hervorgerufene Expressionssteigerung der Effluxpumpen die Sensibilität der untersuchten *Salmonella*-Stämme beeinflusst, wurden Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) durchgeführt. Unter Zugabe von 2,2'-Bipyridin wurden die Empfindlichkeiten gegenüber Ciprofloxacin und Chloramphenicol bestimmt (siehe 2.2.5). Wie unter 3.6.5.1.1 für die Induktion mit Salicylsäure beschrieben, wurde den Bakteriensuspensionen 300 µM 2,2'-Bipyridin (0,5 x MHK) zugesetzt. Auch hier waren die erwarteten MHK-Wert-Unterschiede zwischen dem induzierten Stamm und dem Referenzstamm relativ gering, so dass kleinere Abstufungen für die Antibiotika gewählt wurden. Tabelle 3.20 zeigt die Werte der MHK-Bestimmung für *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) und für *S. Hadar* (D) sowie für die entsprechenden Zweitschritt-Mutanten.

Tab. 3.20: MHK-Wert-Bestimmung für *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) und *S. Hadar* (D) sowie für die entsprechenden Zweitschritt-Mutanten nach Induktion mit 2,2'-Bipyridin (300 µM). Cip = Ciprofloxacin; Clm = Chloramphenicol.

Stamm	Cip [µg/ml]	Clm [µg/ml]
B	0,02	4
B + 2,2'-Bipyridin (300 µM)	0,025	3
BII	4	14
BII + 2,2'-Bipyridin (300 µM)	3	14
C	0,025	5
C + 2,2'-Bipyridin (300 µM)	0,025	4
CII	5	26
CII + 2,2'-Bipyridin (300 µM)	5	28
D	0,02	4
D + 2,2'-Bipyridin (300 µM)	0,03	4
DIIa	3	12
DIIa + 2,2'-Bipyridin (300 µM)	4	12
DIIb-4a-2	1	6
DIIb-4a-2 + 2,2'-Bipyridin (300 µM)	1	10

Die MHK-Werte der untersuchten Stämme bewegen sich nach Zugabe von 2,2'-Bipyridin sowohl gegenüber Ciprofloxacin als auch gegenüber Chloramphenicol geringfügig um die Werte der entsprechenden Referenzstämme.

3.6.6 Vergleich der Expression von Effluxpumpen und Regulatoren nach Überexpression verschiedener Regulatoren

Da unbekannt ist, auf welche Weise die Expression von *rma* induziert wird, erschien der Einsatz eines Überexpressionsvektors als einzige geeignete Methode. Die Aktivität von Rob läßt sich bekanntermaßen posttranslational durch die Zugabe von 2,2'-Bipyridin steigern (263). Durch die zusätzliche Überexpression von *rob* sollte die Effizienz der beiden Möglichkeiten verglichen werden.

Zur Überexpression der Regulatorgene *rma* und *rob* wurde der Vektor pBAD18 (102) verwendet, der über einen Arabinose-induzierbaren Promotor verfügt. Die Zugabe von L-Arabinose (hier 15 mM) führt zur Expression der hinter den Arabinose-Promotor klonierten Gene, während die Anwesenheit von D-Glukose (hier 15 mM) zur Katabolitrepression und somit zu einer sehr effektiven Blockade der Expression führt.

3.6.6.1 Überexpression von *rob*

Abbildung 3.17 zeigt das Plasmid pPHB864, das zur Überexpression von *rob* verwendet wurde. Die Konstruktion sowie die Überprüfung der erfolgreichen Klonierung erfolgten wie unter 3.3.2 für den Vektor pPHB865 beschrieben. Zur Amplifikation des *rob*-PCR-Fragmentes wurden die Primer *rob_for(oe)* sowie *rob_rev(oe)* (siehe Tab. 2.4) verwendet.

Die Transformation des erhaltenen Vektors pPHB864 (Abb. 3.17) erfolgte mittels Elektroporation (siehe 2.2.12.4) in die entsprechenden *Salmonella*-Stämme.

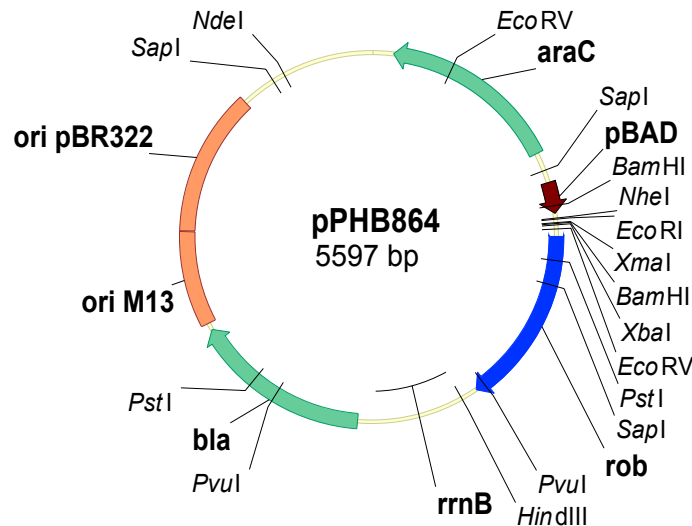


Abb. 3.17: Darstellung von pPHB864, das zur Überexpression von *rob* eingesetzt wurde. *bla* = Ampicillinresistenz-Kassette; ori M13 = Replikationsursprung zur Vermehrung in Phagen; ori pBR322 = Replikationsursprung zur Vermehrung in *E. coli*/*Salmonella*; *araC* = bifunktionaler Regulator; pBAD = Promotor des Arabinose-Operons; *rob* = kodiert für den globalen Regulator Rob; *rrnB* = Terminator.

Die Anzucht der Kulturen erfolgte in M9-Medium, da die von dem pBAD-Promotor ausgehende Expression in Minimalmedium effektiver ausfällt (102). Aufgrund mangelnden Wachstums in Minimalmedium musste der Stamm *S. Typhimurium* DT104 jedoch wie gewohnt in LB-Bouillon kultiviert werden. Der Induktor L-Arabinose bzw. der Repressor D-Glukose wurden zu Beginn der Anzucht in einer Endkonzentration von 15 mM zugesetzt. Abbildung 3.18 sowie Tabelle 3.21 zeigen die Expressionsänderung der Regulatoren in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Überexpression von *rob*.

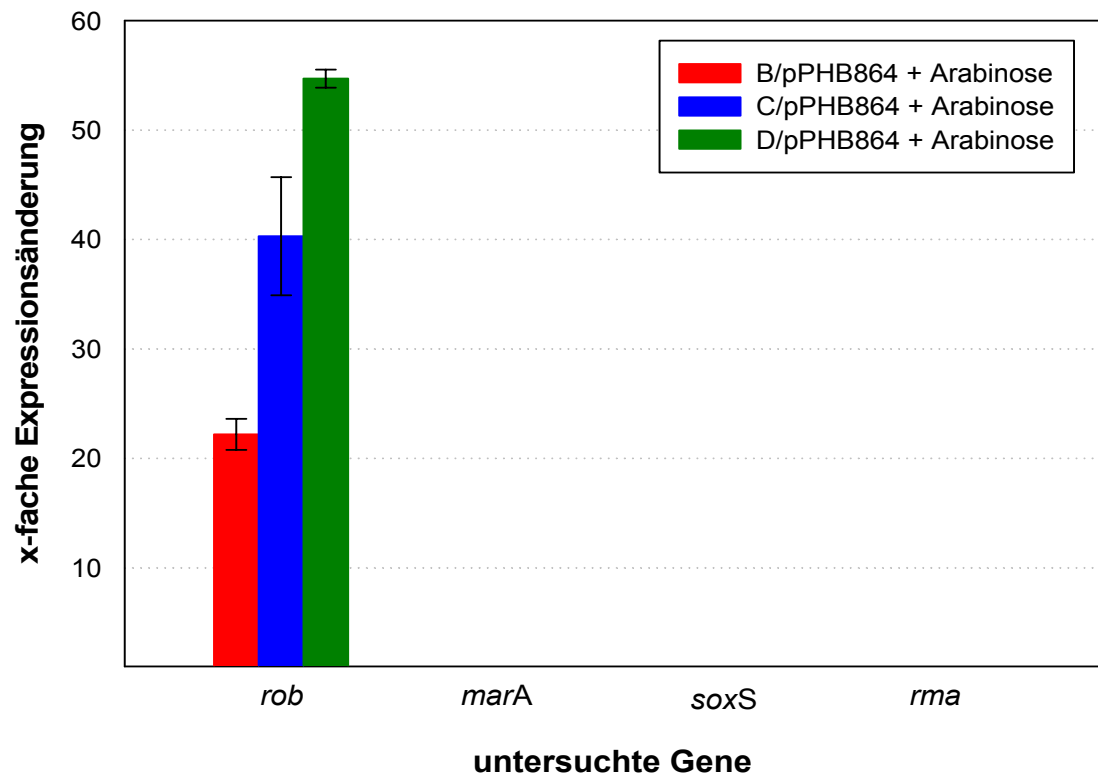


Abb. 3.18: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung der untersuchten Regulatorengene in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Überexpression von *rob*.

Tab. 3.21: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung der untersuchten Regulatorengene in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Überexpression von *rob*.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
B/pPHB864+ Arabinose [15 mM] (B/pPHB864+ Glukose [15 mM])	<i>rob</i>	22,2	6,4
	<i>marA</i>	1	0
	<i>soxS</i>	1	0
	<i>rma</i>	1	0
C/pPHB864+ Arabinose [15 mM] (C/pPHB864+ Glukose [15 mM])	<i>rob</i>	40,3	13,4
	<i>marA</i>	1	0
	<i>soxS</i>	1	0
	<i>rma</i>	1	0
D/pPHB864+ Arabinose [15 mM] (D/pPHB864+ Glukose [15 mM])	<i>rob</i>	54,7	1,5
	<i>marA</i>	1	0
	<i>soxS</i>	1	0
	<i>rma</i>	1	0

Die, mit Hilfe des Arabinose-induzierbaren Promotors pBAD durchgeführte, Überexpression des Regulorgens *rob* führt Stamm-spezifisch zu einer erhöhten Expression von etwa 20-fach bis etwa 55-fach. Unverändert sind die Transkriptmengen der Regulorgene *marA*, *soxS* und *rma*.

Abbildung 3.19 sowie Tabelle 3.22 zeigen die veränderte Genexpression der Effluxpumpen in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Überexpression von *rob*.

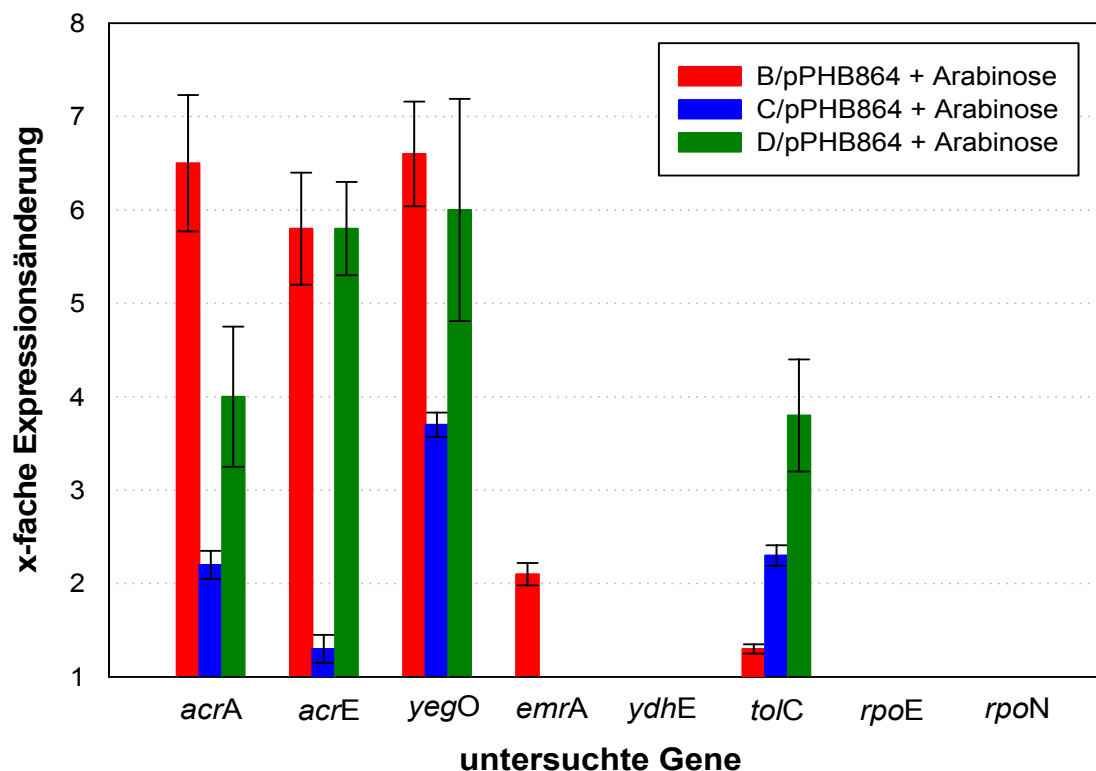


Abb. 3.19: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung der untersuchten Effluxpumpengene sowie der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Überexpression von *rob*.

Tab. 3.22: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung der untersuchten Effluxpumpengene sowie der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Überexpression von *rob*.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
B/pPHB864+ Arabinose [15 mM] (B/pPHB864+ Glukose [15 mM])	<i>acrA</i>	6,5	11,3
	<i>acrE</i>	5,8	10,4
	<i>yegO</i>	6,6	8,5
	<i>emrA</i>	2,1	5,6
	<i>ydhE</i>	1	0
	<i>tolC</i>	1,3	3,8

Tab. 3.22: Fortsetzung.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0
C/pPHB864+ Arabinose [15 mM] (C/pPHB864+ Glukose [15 mM])	<i>acrA</i>	2,2	6,9
	<i>acrE</i>	1,3	11,6
	<i>yegO</i>	3,7	3,6
	<i>emrA</i>	1	0
	<i>ydhE</i>	1	0
	<i>tolC</i>	2,3	4,9
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0
D/pPHB864+ Arabinose [15 mM] (D/pPHB864+ Glukose [15 mM])	<i>acrA</i>	4,0	18,7
	<i>acrE</i>	5,8	8,6
	<i>yegO</i>	6,0	19,9
	<i>emrA</i>	1	0
	<i>ydhE</i>	1	0
	<i>tolC</i>	3,8	15,9
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0

Nach Überexpression des globalen Regulatorgens *rob* ist die Expression der für die RND-Effluxpumpen kodierenden Gene *acrA*, *acrE*, *yegO* und *tolC* bei allen untersuchten Stämmen erhöht, wobei Stamm-spezifische Unterschiede vorliegen. Mit Ausnahme des Stammes B (2,1-fache Expressionssteigerung von *emrA*) ist die Expression der Gene *emrA* und *ydhE* nicht erhöht. Die Expression der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* ist ebenfalls unverändert.

3.6.6.2 Überexpression von *rma*

Abbildung 3.20 zeigt das Plasmid pPHB863, das zur Überexpression von *rma* verwendet wurde. Die Konstruktion sowie die Überprüfung der erfolgreichen Klonierung erfolgten wie unter 3.3.2 für den Vektor pPHB865 beschrieben. Zur Amplifikation des *rma*-PCR-Fragmentes wurden die Primer *rma_for(oe)* sowie *rma_rev(oe)* (siehe Tab. 2.4) verwendet. Die Transformation des erhaltenen Vektors pPHB863 (Abb. 3.20) erfolgte dann mittels Elektroporation (siehe 2.2.12.4) in die entsprechenden *Salmonella*-Stämme.

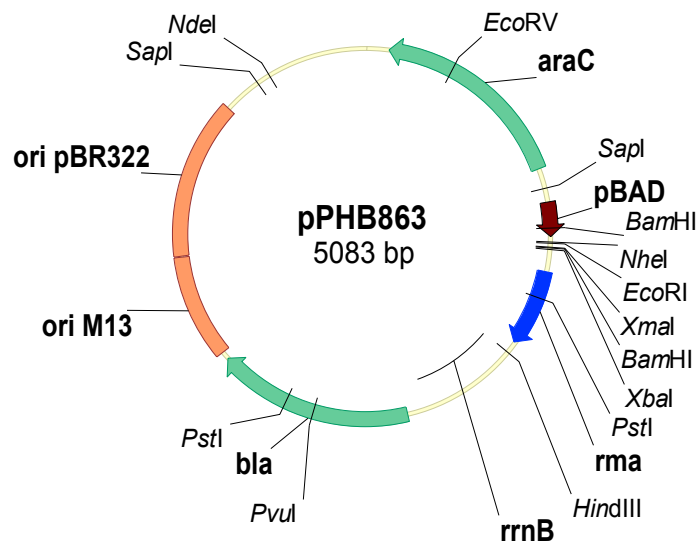


Abb. 3.20: Darstellung von pPHB863, das zur Überexpression von *rma* eingesetzt wurde. bla = Ampicillinresistenz-Kassette; ori M13 = Replikationsursprung zur Vermehrung in Phagen; ori pBR322 = Replikationsursprung zur Vermehrung in *E. coli*/ *Salmonella*; araC = bifunktionaler Regulator; pBAD = Promotor des Arabinose-Operons; *rma* = kodiert für den globalen Regulator Rma; rrnB = Terminator.

Die Anzucht der Kulturen erfolgte für die Stämme *S. Hadar* und *S. Typhimurium* DT204c in M9-Medium. Der Stamm *S. Typhimurium* DT104 wurde wie oben beschrieben in LB-Bouillon kultiviert. Der Induktor L-Arabinose bzw. der Repressor D-Glukose wurden zu Beginn der Anzucht in einer Endkonzentration von 15 mM zugesetzt. Abbildung 3.21 sowie Tabelle 3.23 zeigen die Expressionsänderung der Regulatoren in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Überexpression von *rma*.

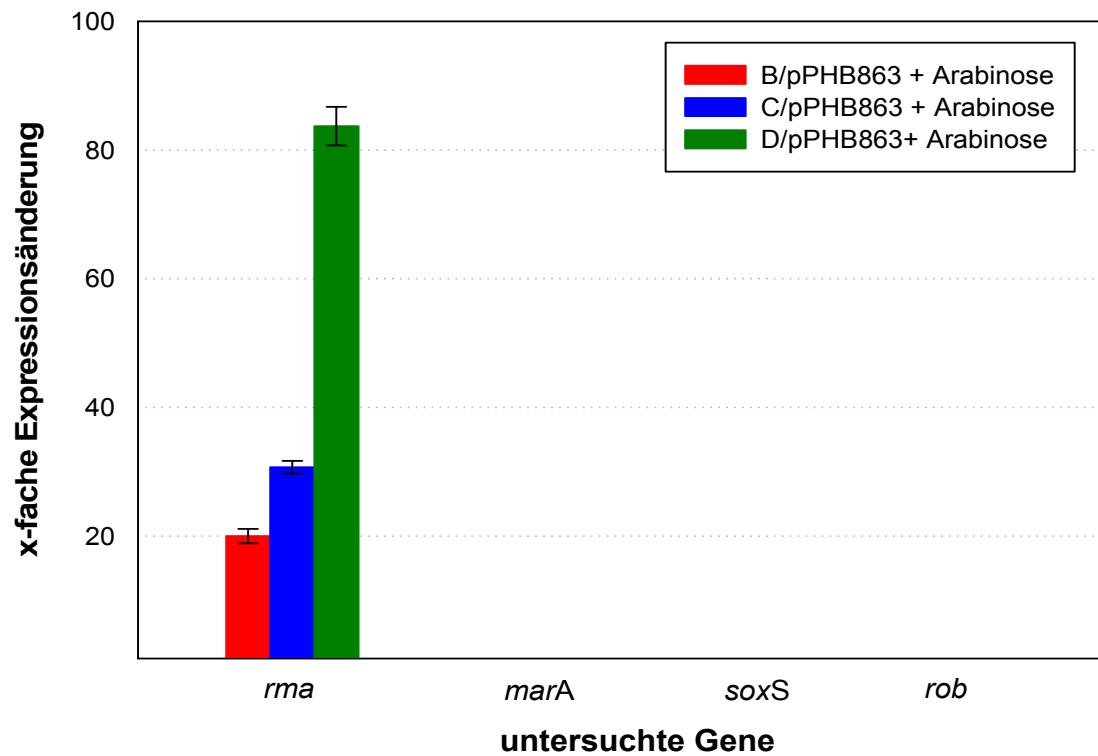


Abb. 3.21: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung der untersuchten Regulatorgene in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Überexpression von *rma*.

Tab. 3.23: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung der untersuchten Regulatorgene in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Überexpression von *rma*.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
B/pPHB863 + Arabinose [15 mM] (B/pPHB863 + Glukose [15 mM])	<i>rma</i>	20,0	5,6
	<i>marA</i>	1	0
	<i>soxS</i>	1	0
	<i>rob</i>	1	0
C/pPHB863 + Arabinose [15 mM] (C/pPHB863 + Glukose [15 mM])	<i>rma</i>	30,7	3,2
	<i>marA</i>	1	0
	<i>soxS</i>	1	0
	<i>rob</i>	1	0
D/pPHB863 + Arabinose [15 mM] (D/pPHB863 + Glukose [15 mM])	<i>rma</i>	83,7	3,6
	<i>marA</i>	1	0
	<i>soxS</i>	1	0
	<i>rob</i>	1	0

Die, mit Hilfe des Arabinose-induzierbaren Promotors pBAD durchgeführte, Überexpression des Regulorgens *rma* führt Stamm-spezifisch zu einer erhöhten Expression von etwa 20-fach bis etwa 80-fach. Unverändert sind die Transkriptmengen der Regulorgene *marA*, *soxS* und *rob*.

Abbildung 3.22 sowie Tabelle 3.24 zeigen die veränderte Genexpression der Effluxpumpen in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Überexpression von *rma*.

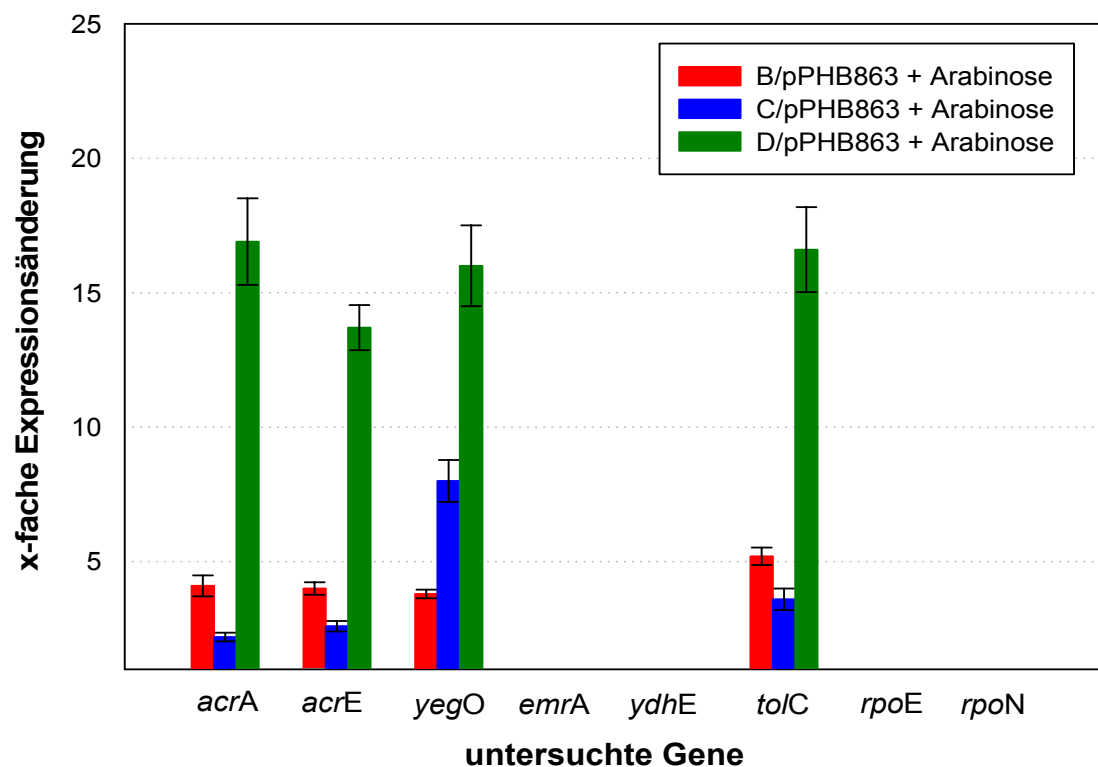


Abb. 3.22: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung der untersuchten Effluxpumpengene sowie der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Überexpression von *rma*.

Tab. 3.24: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung der untersuchten Effluxpumpengene sowie der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* in *S. Typhimurium* DT204c (B), *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie *S. Hadar* (D) nach Überexpression von *rma*.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
B/pPHB863 + Arabinose [15 mM] (B/pPHB863 + Glukose [15 mM])	<i>acrA</i>	4,1	9,6
	<i>acrE</i>	4,0	5,8
	<i>yegO</i>	3,8	4,3
	<i>emrA</i>	1	0

Tab. 3.24: Fortsetzung.

Stamm (Bezug)	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
	<i>ydhE</i>	1	0
	<i>tolC</i>	5,2	6,1
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0
C/pPHB863 + Arabinose [15 mM] (C/pPHB863 + Glukose [15 mM])	<i>acrA</i>	2,2	7,3
	<i>acrE</i>	2,6	4,2
	<i>yegO</i>	8,0	9,7
	<i>emrA</i>	1	0
	<i>ydhE</i>	1	0
	<i>tolC</i>	3,6	11,2
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0
D/pPHB863 + Arabinose [15 mM] (D/pPHB863 + Glukose [15 mM])	<i>acrA</i>	16,9	9,5
	<i>acrE</i>	13,7	6,1
	<i>yegO</i>	16,0	9,4
	<i>emrA</i>	1	0
	<i>ydhE</i>	1	0
	<i>tolC</i>	16,6	9,5
	<i>rpoE</i>	1	0
	<i>rpoN</i>	1	0

Nach Überexpression des globalen Regulatorgens *rma* ist die Expression der für die RND-Effluxpumpen kodierenden Gene *acrA*, *acrE*, *yegO* und *tolC* bei allen untersuchten Stämmen erhöht. Besonders deutlich sind die Erhöhungen der Genexpression in dem Stamm D (13 - 17-fach). Die Expression der Gene *emrA* und *ydhE* ist in keinem der untersuchten Stämme erhöht. Unverändert sind die Transkriptmuster der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN*.

3.6.6.3 Phänotypische Auswirkungen der Überexpression von *rob* und *rma*

Zur Beurteilung, inwiefern die durch verstärkte Expression der globalen Regulatoren *rob* und *rma* hervorgerufene Expressionssteigerung der Effluxpumpen die Sensibilität der untersuchten *Salmonella*-Stämme beeinflusst, wurden Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentrationen (MHKs) durchgeführt. In Anwesenheit der Überexpressionsplasmide pPHB864 (*rob*) (siehe Abb. 3.17) sowie pPHB863 (*rma*) (siehe Abb. 3.20) wurden die Empfindlichkeiten gegenüber verschiedenen Antibiotika bestimmt (siehe 2.2.5).

Um die Replikation des jeweiligen Konstruktes in der Zelle zu gewährleisten, wurden die MHK-Wert-Bestimmungen in Anwesenheit des Selektionsantibiotikums Ampicillin (50 µg/ml) durchgeführt. Zur Induktion bzw. Repression des pBAD-Promotors wurden den Bakteriensuspensionen (auf McFarland 0,5 eingestellt) nach Verdünnung in dem entsprechenden Medium 15 mM L-Arabinose bzw. D-Glukose zugesetzt. Da mit unterschiedlichen Arabinose-Konzentrationen (5 mM, 15 mM, 30 mM) keine Unterschiede hinsichtlich der Induktionsstärke bewirkt werden konnten, wurde kontinuierlich mit 15 mM gearbeitet.

Nach Literaturangaben (102) fällt die Überexpression des hinter den pBAD-Promotor klonierten Gens in Minimalmedium (M9-Medium) effizienter aus als in Komplexmedium (MH-Bouillon). Dieses Phänomen könnte möglicherweise auf eine geringere Kopienzahl des Plasmids oder eine mögliche Katabolitrepression in Vollmedium zurückzuführen sein. Daher wurde die Bestimmung der MHK-Werte für *S. Hadar* für die Antibiotika Ciprofloxacin und Chloramphenicol zunächst vergleichend in beiden Medien durchgeführt (siehe Tab.3.25).

Tab. 3.25: MHK-Wert-Bestimmung für *S. Hadar* (D) sowie für die entsprechenden die *rob*- bzw. *rma*-Überexpressionsplasmide tragenden Stämme nach Induktion mit L-Arabinose bzw. Repression mit D-Glukose. Cip = Ciprofloxacin; Clm = Chloramphenicol; MH = Bestimmung in MH-Bouillon; M9 = Bestimmung in M9-Minimalmedium; Gluk. = D-Glukose; Arab. = L-Arabinose; pPHB864 = *rob*-Überexpressionsplasmid; pPHB863 = *rma*-Überexpressionsplasmid.

Stamm	Cip (MH) [µg/ml]	Cip (M9) [µg/ml]	Clm (MH) [µg/ml]	Clm (M9) [µg/ml]
D + Gluk. (15 mM)	0,03	0,015	4	2
D + Arab. (15 mM)	0,03	0,015	4	2
D/pPHB864 + Gluk. (15 mM)	0,03	0,015	4	4
D/pPHB864 + Arab. (15 mM)	0,03	0,06	4	16
D/pPHB863 + Gluk. (15 mM)	0,03	0,015	4	4
D/pPHB863 + Arab. (15 mM)	0,06	0,12	8	32

Nach Überexpression der globalen Regulatoren *rob* und *rma* in M9-Medium ist im Gegensatz zu der Überexpression in Komplexmedium ein deutlicherer Anstieg der MHK-Werte zu beobachten. Daher wurden im Folgenden die Empfindlichkeiten gegenüber verschiedenen Antibiotika in Anwesenheit der Überexpressionsplasmide, sofern möglich (Ausnahme *S. Typhimurium* DT104), in Minimalmedium durchgeführt. Die Auswertung erfolgte standardmäßig nach 40 h.

Der Tabelle 3.26 sind die Werte der Empfindlichkeitsbestimmung von *S. Typhimurium* DT204c in An- und Abwesenheit der Überexpressionsplasmide unter induzierenden sowie reprimierenden Bedingungen in M9-Medium zu entnehmen.

Tab. 3.26: MHK-Wert-Bestimmung für *S. Typhimurium* DT204c (B) sowie für die entsprechenden die *rob*- bzw. *rma*-Überexpressionsplasmide tragenden Stämme nach Induktion mit L-Arabinose bzw. Repression mit D-Glukose in M9-Medium. Cip = Ciprofloxacin; Nor = Norfloxacin; Moxi = Moxifloxacin; Spar = Sparfloxacin; Nal = Nalidixinsäure; Clm = Chloramphenicol; Novo = Novobiocin; Ery = Erythromycin; Roxi = Roxithromycin; Tet = Tetracyclin; Gluk. = D-Glukose; Arab. = L-Arabinose; pPHB864 = *rob*-Überexpressionsplasmid; pPHB863 = *rma*-Überexpressionsplasmid.

Stamm	Cip [µg/ml]	Nor [µg/ml]	Moxi [µg/ml]	Spar [µg/ml]	Nal [µg/ml]	Clm [µg/ml]	Novo [µg/ml]	Ery [µg/ml]	Roxi [µg/ml]	Tet [µg/ml]
B + Gluk. (15 mM)	0,03	0,015	0,0075	0,015	2	4	2048	64	512	2
B + Arab. (15 mM)	0,03	0,015	0,0075	0,015	2	4	2048	64	512	2
B/pPHB864 + Gluk. (15 mM)	0,03	0,015	0,0075	0,015	2	4	2048	64	512	2
B/pPHB864 + Arab. (15 mM)	0,12	0,06	0,015	0,12	4	16	8192	64	1024	4
B/pPHB863 + Gluk. (15 mM)	0,06	0,015	0,0075	0,015	2	4	2048	64	512	2
B/pPHB863 + Arab. (15 mM)	0,24	0,06	0,0075	0,12	16	32	4096	64	1024	8

Nach der Überexpression des globalen Regulators *rob* ist bei *S. Typhimurium* DT204c gegenüber den meisten untersuchten Antibiotika eine Verringerung der Empfindlichkeit von 2 - 3 Verdünnungsstufen zu beobachten. Die Empfindlichkeiten gegenüber Moxifloxacin, Nalidixinsäure, Tetracyclin sowie Roxithromycin sind nur um 1 Verdünnungsstufe erniedrigt, wohingegen der MHK-Wert für Erythromycin unverändert bleibt. Nach Überexpression von *rma* bleiben die MHK-Werte für Erythromycin und Moxifloxacin unverändert, die Werte für die übrigen Antibiotika steigen um 2 - 3 Verdünnungsstufen. Die Empfindlichkeiten gegenüber Roxithromycin und Novobiocin verringern sich um 1 Verdünnungsstufe.

Die Tabelle 3.27 zeigt die Werte der Empfindlichkeitsbestimmung von *S. Typhimurium* DT104 in An- und Abwesenheit der Überexpressionsplasmide unter induzierenden sowie reprimierenden Bedingungen in MH-Bouillon. Da dieser Stamm in Minimalmedium kein Wachstum zeigt, musste für die Bestimmung der Empfindlichkeiten auf Komplexmedium zurückgegriffen werden.

Tab. 3.27: MHK-Wert-Bestimmung für *S. Typhimurium* DT104 (C) sowie für die entsprechenden die *rob*- bzw. *rma*-Überexpressionsplasmide tragenden Stämme nach Induktion mit L-Arabinose bzw. Repression mit D-Glukose. Cip = Ciprofloxacin; Nor = Norfloxacin; Moxi = Moxifloxacin; Spar = Sparfloxacin; Nal = Nalidixinsäure; Clm = Chloramphenicol; Novo = Novobiocin; Ery = Erythromycin; Roxi = Roxithromycin; Tet = Tetracyclin; Gluk. = D-Glukose; Arab. = L-Arabinose; pPHB864 = *rob*-Überexpressionsplasmid; pPHB863 = *rma*-Überexpressionsplasmid.

Stamm	Cip [µg/ml]	Nor [µg/ml]	Moxi [µg/ml]	Spar [µg/ml]	Nal [µg/ml]	Clm [µg/ml]	Novo [µg/ml]	Ery [µg/ml]	Roxi [µg/ml]	Tet [µg/ml]
C + Gluk. (15 mM)	0,03	0,12	0,03	0,03	2	4	64	256	512	2
C + Arab. (15 mM)	0,03	0,12	0,03	0,03	2	4	64	256	256	1
C/pPHB864 + Gluk. (15 mM)	0,03	0,12	0,03	0,03	2	4	64	256	512	2
C/pPHB864 + Arab. (15 mM)	0,03	0,12	0,06	0,03	4	8	128	256	512	2
C/pPHB863 + Gluk. (15 mM)	0,03	0,12	0,03	0,03	2	4	64	256	512	2
C/pPHB863 + Arab. (15 mM)	0,12	1	0,12	0,12	8	8	256	256	512	2

Nach der Überexpression des globalen Regulators *rob* ist bei *S. Typhimurium* DT104 gegenüber den meisten Antibiotika keine Veränderung der Empfindlichkeit zu beobachten. Die Empfindlichkeiten gegenüber Moxifloxacin, Nalidixinsäure, Chloramphenicol und Novobiocin sind um 1 Verdünnungsstufe verringert. Nach Überexpression von *rma* bleiben die MHK-Werte für die Makrolide sowie für Tetracyclin unverändert, wohingegen die Werte für die übrigen Antibiotika um 2 - 3 Verdünnungsstufen steigen (mit Ausnahme von Chloramphenicol: 1 Verdünnungsstufe). Der Tabelle 3.28 sind die Werte der Empfindlichkeitsbestimmung von *S. Hadar* in An- und Abwesenheit der Überexpressionsplasmide unter induzierenden sowie reprimierenden Bedingungen in M9-Medium zu entnehmen.

Tab. 3.28: MHK-Wert-Bestimmung für *S. Hadar* (D) sowie für die entsprechenden die *rob*- bzw. *rma*-Überexpressionsplasmide tragenden Stämme nach Induktion mit L-Arabinose bzw. Repression mit D-Glukose in M9-Medium. Cip = Ciprofloxacin; Nor = Norfloxacin; Moxi = Moxifloxacin; Spar = Sparfloxacin; Nal = Nalidixinsäure; Clm = Chloramphenicol; Novo = Novobiocin; Ery = Erythromycin; Roxi = Roxithromycin; Tet = Tetracyclin; Gluk. = D-Glukose; Arab. = L-Arabinose; pPHB864 = *rob*-Überexpressionsplasmid; pPHB863 = *rma*-Überexpressionsplasmid.

Stamm	Cip [µg/ml]	Nor [µg/ml]	Moxi [µg/ml]	Spar [µg/ml]	Nal [µg/ml]	Clm [µg/ml]	Novo [µg/ml]	Ery [µg/ml]	Roxi [µg/ml]	Tet [µg/ml]
D + Gluk. (15 mM)	0,03	0,06	0,06	0,03	8	4	1024	64	128	1
D + Arab. (15 mM)	0,03	0,06	0,06	0,03	8	4	1024	64	128	1

Tab. 3.28: Fortsetzung.

Stamm	Cip [µg/ml]	Nor [µg/ml]	Moxi [µg/ml]	Spar [µg/ml]	Nal [µg/ml]	Clm [µg/ml]	Novo [µg/ml]	Ery [µg/ml]	Roxi [µg/ml]	Tet [µg/ml]
D/pPHB864 + Gluk. (15 mM)	0,015	0,06	0,06	0,03	16	4	1024	128	128	1
D/pPHB864 + Arab. (15 mM)	0,06	0,5	0,24	0,12	64	16	8192	128	128	4
D/pPHB863 + Gluk. (15 mM)	0,015	0,06	0,12	0,03	16	4	1024	128	256	1
D/pPHB863 + Arab. (15 mM)	0,12	1	0,5	0,24	128	32	16384	256	256	16

Nach der Überexpression des globalen Regulators *rob* ist bei *S. Hadar* gegenüber allen unersuchten Antibiotika der verschiedenen Substanzklassen, mit Ausnahme der Makrolide, eine Verringerung der Empfindlichkeit von 2 - 3 Verdünnungsstufen zu beobachten. Nach Überexpression von *rma* bleiben die MHK-Werte für die Makrolide ebenfalls unverändert, die Werte für die übrigen Antibiotika steigen um 3 - 4 Verdünnungsstufen (mit Ausnahme von Moxifloxacin: 2 Verdünnungsstufen).

3.6.7 Untersuchung des Einflusses der verstärkten Expression der Effluxpumpe AcrAB

Zur Beurteilung des Einflusses einer einzelnen Effluxpumpe, der Pumpe AcrAB, auf den Resistenzphänotyp wurden die Gene *acrA* sowie *acrB* unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren pBAD-Promotors überexprimiert, bevor anschließend die Empfindlichkeiten gegenüber diversen Antibiotika bestimmt wurden. Auf diese Weise sollte zudem die Frage beantwortet werden, welche Antibiotika von der Pumpe AcrAB-TolC aus der Zelle transportiert werden. Abbildung 3.23 zeigt den Vektor pPHB861, der zur Überexpression des Membranfusionsproteins (AcrA) sowie des Transporters (AcrB) verwendet wurde. Die Konstruktion sowie die Überprüfung erfolgten wie unter 3.3.2 für den Vektor pPHB865 beschrieben. Zur Amplifikation des *acrAB*-PCR-Fragmentes wurden die Primer *acrAB_for(oe)* sowie *acrAB_rev(oe)* (siehe Tab. 2.4) verwendet. Die Transformation des erhaltenen Plasmids pPHB861 (Abb. 3.23) erfolgte mittels Elektroporation (siehe 2.2.12.4) in die entsprechenden *Salmonella*-Stämme.

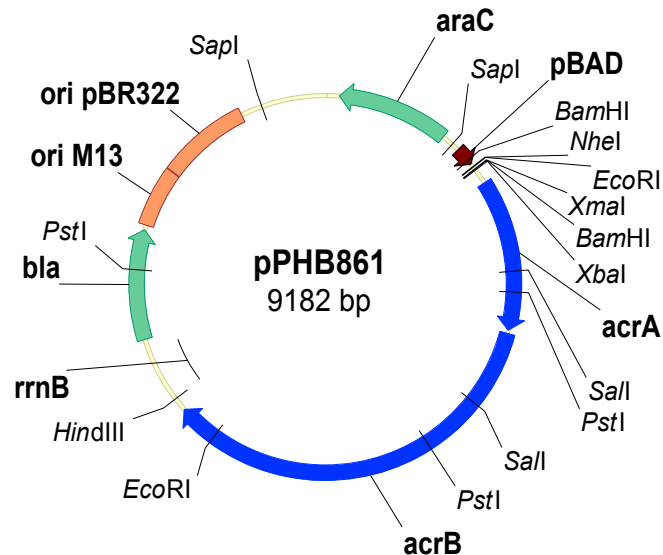


Abb. 3.23: Darstellung von pPHB861, das zur Überexpression von *acrAB* eingesetzt wurde. *bla* = Ampicillinresistenz-Kassette; *ori* M13 = Replikationsursprung zur Vermehrung in Phagen; *ori* pBR322 = Replikationsursprung zur Vermehrung in *E. coli*/*Salmonella*; *araC* = bifunktionaler Regulator; *pBAD* = Promotor des Arabinose-Operons; *acrA* = kodiert für das Membranfusionsprotein AcrA; *acrB* = kodiert für das Transportprotein AcrB in der Cytoplasmamembran; *rrnB* = Terminator.

Die Tabelle 3.29 zeigt die Werte der Empfindlichkeitsbestimmung von *S. Hadar* in An- und Abwesenheit des Überexpressionsplasmids pPHB861 unter induzierenden und reprimierenden Bedingungen in M9-Medium.

Tab. 3.29: MHK-Wert-Bestimmung für *S. Hadar* (D) sowie für den entsprechenden das *acrAB*-Überexpressionsplasmid tragenden Stamm nach Induktion mit L-Arabinose bzw. Repression mit D-Glukose. Cip = Ciprofloxacin; Nor = Norfloxacin; Moxi = Moxifloxacin; Spar = Sparfloxacin; Nal = Nalidixinsäure; Clm = Chloramphenicol; Novo = Novobiocin; Ery = Erythromycin; Roxi = Roxithromycin; Tet = Tetracyclin; Gluk. = D-Glukose; Arab. = L-Arabinose; pPHB861 = *acrAB*-Überexpressionsplasmid.

Stamm	Cip [µg/ml]	Nor [µg/ml]	Moxi [µg/ml]	Spar [µg/ml]	Nal [µg/ml]	Clm [µg/ml]	Novo [µg/ml]	Ery [µg/ml]	Roxi [µg/ml]	Tet [µg/ml]
D + Gluk. (15 mM)	0,03	0,06	0,06	0,03	8	4	1024	64	128	1
D + Arab. (15 mM)	0,03	0,06	0,06	0,03	8	4	1024	64	128	1
D/ pPHB861 + Gluk. (15 mM)	0,015	0,06	0,06	0,03	16	4	1024	128	128	1
D/ pPHB861 + Arab. (15 mM)	0,12	1	0,5	0,24	128	64	16384	256	256	16

Nach der Überexpression der Effluxpumpe *acrAB* ist bei *S. Hadar* gegenüber allen untersuchten Antibiotika der verschiedenen Substanzklassen, mit Ausnahme der

Makrolide, eine Verringerung der Empfindlichkeit von 3 - 4 Verdünnungsstufen zu beobachten.

3.7 Untersuchungen zur Expression von Regulatoren und der Effluxpumpe AcrAB in klinischen Isolaten von *Salmonella spec.*

Um zu untersuchen, ob die, in den In-vitro-Mutanten beobachtete, erhöhte Expression von Regulatoren und Effluxpumpen (siehe 3.6.3 - 4) auch in klinischen Isolaten von *Salmonella spec.* auftritt und eine mögliche Bedeutung bei der Ausbildung des Resistenzphänotyps hat, wurde das Transkriptmuster ausgewählter Regulatoren- und Effluxpumpengene verschiedener Stämme bestimmt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Expression des globalen Regulorgens *rma* gerichtet, da die Expression dieses Gens in den Zweitschritt-Mutanten aus den Selektionsexperimenten (BII, CII, DIIa, DIb-4a-2) eine starke Aufregulation (> 40-fach) zeigt (siehe 3.6.4).

Der Tabelle 3.30 sind die verwendeten klinischen Isolate von *Salmonella spec.* einschließlich der bekannten Mutationen sowie der MHK-Werte für Ciprofloxacin zu entnehmen.

Tab. 3.30: Klinische Isolate von *Salmonella spec.* einschließlich der bekannten Mutationen und der MHK-Werte für Ciprofloxacin (Cip).

Serovar	Lysotyp	Stammbezeichnung	bekannte Mutation	Cip [µg/ml]
S. Typhimurium	DT 204c	96-01749 (1)	<i>gyrA</i> : S83 ^(*)	0,5
S. Typhimurium	DT 104	96-06510 (2)	<i>gyrA</i> : S83 ^(*)	0,5
S. Typhimurium	DT 104	97-04764 (3)	<i>gyrA</i> : S83F	1
S. Typhimurium	DT 104	98-05405 (4)	-	0,5
S. Typhimurium	DT 104	Variante Copenhagen 80190 (5)	<i>gyrA</i> : S83A, D87N <i>gyrB</i> : S464F	32
S. Hadar		96-07291 (6)	<i>gyrA</i> : D87N	0,5
S. Hadar		97-13861 (7)	<i>gyrA</i> : D87N	1

^(*) mittels RFLP nachgewiesene *gyrA*-Mutation an der Position Ser83

Untersucht wurde die Expression der Regulorgene *rma* und *marA* sowie die des Effluxpumpengens *acrA*. Als Referenz dienten die entsprechenden Wildtypstämme S. Typhimurium DT204c (B), S. Typhimurium DT104 (C) sowie S. Hadar (D). Die Anzucht der Stämme erfolgte in LB-Bouillon. Für jedes Experiment wurden drei biologische Proben (drei verschiedene Anzuchten) verwendet. Aus jeder Probe wurde unabhängig voneinander die Gesamt-RNA isoliert (siehe 2.2.17), es wurde mit den 3'-Primern des real-time PCR Primer-Paares die reverse Transkription (siehe 2.2.19.1) durchgeführt, und

die Proben wurden in einer Dreifach-Bestimmung der quantitativen real-time PCR (siehe 2.2.19.2) unterzogen. Die verwendeten Primer sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen (Benennung: Genname_for bzw. rev(rt)). Anschließend wurden die Mittelwerte der zu vergleichenden Proben (klinisches Isolat/ Wildtyp) ins Verhältnis gesetzt. Die Signifikanz aller Werte wurde mit Hilfe des t-Testes (zweiseitig, $\alpha = 0,05$), dem Vergleich der Mittelwerte, berechnet. Die daraus resultierenden p-Werte lagen alle unter 0,05.

Der Abbildung 3.24 sowie der Tabelle 3.31 ist die veränderte Genexpression der Regulatoren *rma* und *marA* und der Effluxpumpe *acrA* in den klinischen Isolaten von *Salmonella* spec. im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypstämmen zu entnehmen.

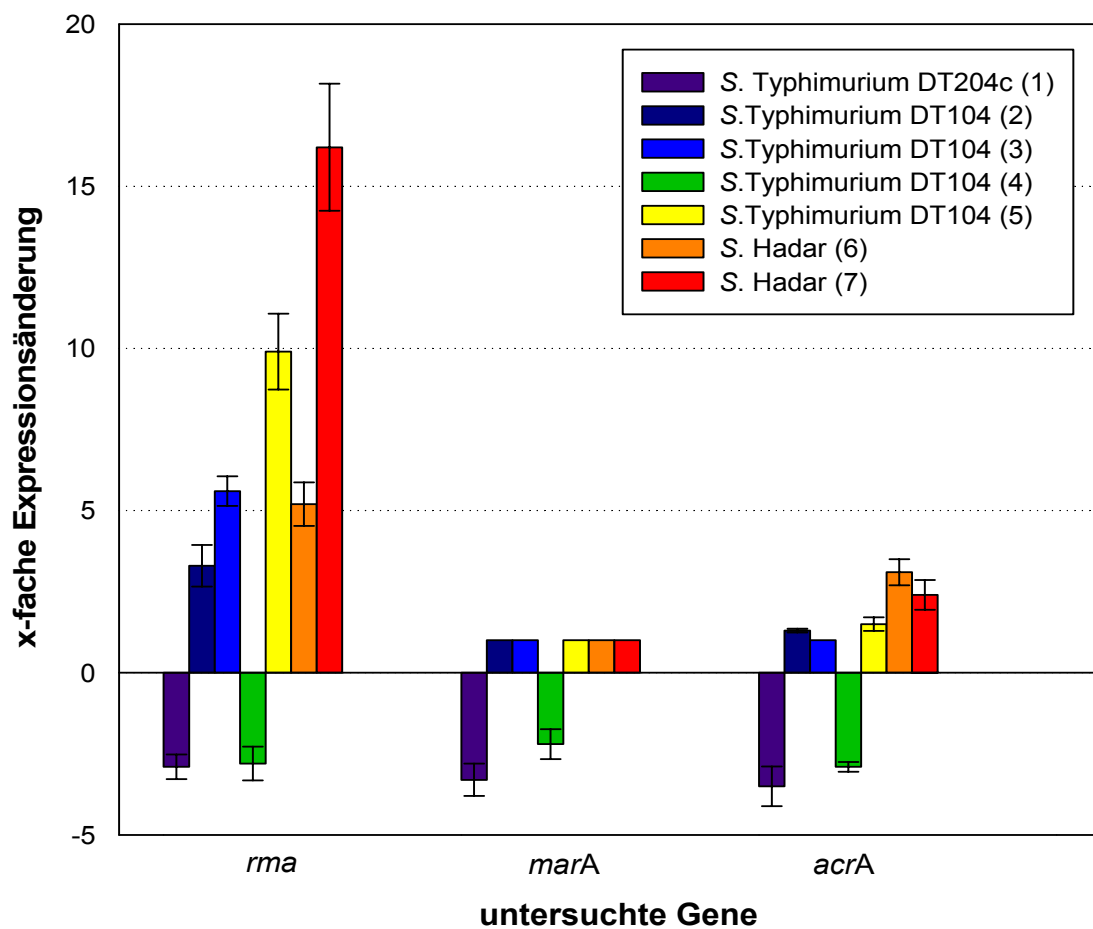


Abb. 3.24: Darstellung der x-fachen Expressionsänderung der Regulatorengene *rma* und *marA* sowie des Effluxpumpengens *acrA* in klinischen Isolaten von *Salmonella* spec. im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypstämmen.

Tab. 3.31: Mittelwerte der x-fachen Genexpression inklusive der relativen Standardabweichung der Regulatorengene *rma* und *marA* sowie des Effluxpumpengens *acrA* in klinischen Isolaten von *Salmonella* spec. im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypstämmen.

klinisches Isolat/ Bezug	Gen	x-fache Genexpression (Mittelwert)	relative Standardabweichung [%]
S. Typhimurium DT204c (1)/ B	<i>rma</i>	- 2,9	13,1
	<i>marA</i>	- 3,3	15,2
	<i>acrA</i>	- 3,5	17,4
S. Typhimurium DT104 (2)/ C	<i>rma</i>	3,3	19,6
	<i>marA</i>	1	0
	<i>acrA</i>	1,3	4,5
S. Typhimurium DT104 (3)/ C	<i>rma</i>	5,6	8,2
	<i>marA</i>	1	0
	<i>acrA</i>	1	0
S. Typhimurium DT104 (4)/ C	<i>rma</i>	- 2,8	18,6
	<i>marA</i>	- 2,2	20,9
	<i>acrA</i>	- 2,9	5,2
S. Typhimurium DT104 (5)/ C	<i>rma</i>	9,9	11,8
	<i>marA</i>	1	0
	<i>acrA</i>	1,5	13,7
S. Hadar (6)/ D	<i>rma</i>	5,2	12,9
	<i>marA</i>	1	0
	<i>acrA</i>	3,1	12,9
S. Hadar (7)/ D	<i>rma</i>	16,2	12,1
	<i>marA</i>	1	0
	<i>acrA</i>	2,4	19,2

Die Stämme *S. Typhimurium* DT204c (1) und *S. Typhimurium* DT104 (4) zeigen eine im Bereich von 2 - 3-fach verringerte Expression der untersuchten Gene *rma*, *marA* und *acrA*. Bei den übrigen Stämmen ist eine deutlich erhöhte Expression des Regulorgens *rma* (bis zu etwa 16-fach bei *S. Hadar* (7)) zu erkennen. Die Expression des Regulorgens *marA* ist nicht erhöht. Die Expression des, die Effluxpumpe AcrAB repräsentierenden, Gens *acrA* ist nur geringfügig erhöht.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst die Frage beantwortet werden, welche genetischen Veränderungen in In-vitro-Mutanten aus Selektionsexperimenten mit Fluorchinolonen zu der verringerten Sensibilität gegenüber verschiedenen Antibiotika führen. Da die MHK-Werte dieser Mutanten in Anwesenheit eines Effluxpumpeninhibitors (EPI) deutlich sanken, wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein verstärkter aktiver Efflux für den veränderten Phänotyp verantwortlich sei. Mittels eines globalen Ansatzes, der Erstellung einer chromosomalen Genbank, sollte ein möglicher positiver Regulator oder eine mögliche Effluxpumpe identifiziert werden. Anschließend wurden gezielt für Effluxpumpen bzw. globale Regulatoren kodierende Gene hinsichtlich ihrer Expression mittels quantitativer real-time PCR untersucht. Eine weitere in dieser Arbeit zu untersuchende Frage war die nach der Regulation von Effluxpumpen auf globaler Ebene. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Induktions- bzw. Überexpressionsexperimente mit den globalen Regulatoren MarA, SoxS, Rob sowie Rna durchgeführt. Es wurde gezielt die Expression dieser Regulatoren gesteigert, um die als Folge dessen veränderte Expression von Effluxpumpen und Regulatoren zu bestimmen. Abschließend wurde der Frage nachgegangen, ob die in den In-vitro-Mutanten beobachtete Expressionserhöhung von Effluxpumpen- und Regulatoren auch in klinischen Isolaten von *Salmonella* spec. auftritt, die eine verringerte Sensibilität gegenüber verschiedenen Antibiotika aufweisen.

4.1 Selektion Fluorchinolon-resistenter In-vitro-Mutanten

Die im Rahmen dieser Arbeit, zur Untersuchung der Beteiligung von Efflux an der Resistenzentwicklung verwendeten Stämme von *S. Typhimurium* (DT 204c = B, DT 104 = C) bzw. *S. Hadar* (D) sind aus Selektionsexperimenten (siehe 3.1) hervorgegangen, die in einer früheren Arbeit durchgeführt wurden (104). Selektiert wurde, je nach Selektionsschritt, mit unterschiedlichen Konzentrationen der Fluorchinolone Sparfloxacin (0,125 - 8 µg/ml), Clinafloxacin (0,125 - 0,25 µg/ml) und Ciprofloxacin (0,06 - 2 µg/ml). Alle Erstschrift-Mutanten wiesen im Vergleich zu den Wildtypstämmen eine MHK-Wert-Erhöhung gegenüber Ciprofloxacin von 5 Verdünnungsstufen auf. Eine Ausnahme stellte die Erstschrift-Mutante D1a dar, bei der die Erhöhung des MHK-Wertes 6 Verdünnungsstufen betrug. Die Empfindlichkeiten der Erstschrift-Mutanten von Chloramphenicol blieben im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypstämmen unverändert. Die Verringerung des Chloramphenicol-MHK-Wertes um 1 Verdünnungsstufe von D1b verglichen mit D lag im tolerierbaren Schwankungsbereich (Fehlerbereich der Methode).

Die verringerten Empfindlichkeiten der Erstschrift-Mutanten gegenüber Ciprofloxacin sind auf Punktmutationen in der QRDR von *gyrA* zurückzuführen. Es treten Mutationen auf, die an den Positionen 83 und 87 zu Aminosäureaustauschen führen (in BI und DIa: S83F; in CI: S83Y; in DIb: D87Y) (104). Mutationen an den Aminosäurepositionen 83 und 87 im Gen für die A-Untereinheit der Gyrase führen nachweislich zu einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber Chinolonen, sowohl in In-vitro-Versuchen als auch bei Feldisolaten (39, 50, 52, 81, 112, 117, 221, 252, 255, 267) (siehe 1.3.1). Der Aminosäureaustausch an Position 87 von Asparaginsäure zu Tyrosin (D87Y) in der Erstschrift-Mutante DIb wurde schon vielfach als resistenzvermittelnd beschrieben (92, 98, 233, 298). Einzelmutationen in *gyrA* führen bekanntermaßen zu verringerten Empfindlichkeiten gegenüber Fluorchinolonen in einem Bereich von etwa 5 Verdünnungsstufen (105, 112). Es traten bei allen Selektionsexperimenten mit verschiedenen Fluorchinolonen die gleichen *gyrA*-Mutationen auf. Die Selektion fand im ersten Schritt sowohl auf Sparfloxacin (B), als auch auf Ciprofloxacin (C, D) statt, was nicht auf eine unterschiedliche Präferenz dieser beiden Chinolone für eine der beiden Positionen (S83, D87) hindeutet. Da Mutationen in einem Chinolon-Targetgen für die verringerte Sensibilität der Erstschrift-Mutanten gegenüber Ciprofloxacin verantwortlich sind, erklärt sich auch die unveränderte Empfindlichkeit der Stämme gegenüber Chloramphenicol.

Die Zweischritt-Mutanten weisen im Vergleich zu den Erstschrift-Mutanten gegenüber Ciprofloxacin eine verringerte Empfindlichkeit von 3 Verdünnungsstufen auf. Eine Ausnahme stellt DIla mit einer Reduktion von 2 Verdünnungsstufen dar. Die Empfindlichkeiten gegenüber Chloramphenicol sind um 2 Verdünnungsstufen erniedrigt, mit Ausnahme von DIb-4a-2 (3 Verdünnungsstufen). Die Sequenzanalyse der Targetgene *gyrA*, *gyrB* und *parC* sowie des Gens für den lokalen Repressor *marR* (siehe 1.5.2.1) ergaben keine Unterschiede der Zweischritt- im Vergleich zu den Erstschrift-Mutanten. Die erhöhten MHK-Werte, sowohl für Ciprofloxacin als auch für Chloramphenicol, müssen daher andere genetische Ursachen haben. Eine Hypothese wäre, dass es sich um Mutationen handelt, die eine verringerte Akkumulation der Antibiotika in der Zelle zur Folge haben, wie z. B. eine verstärkte Expression von *multiple drug resistance* (*mdr*) Effluxpumpen. Dadurch ließen sich auch die Verringerungen der Empfindlichkeiten gegenüber zwei strukturell unterschiedlichen Antibiotika erklären.

4.2 Charakterisierung der In-vitro-Mutanten aus den Selektionsexperimenten

Zur Charakterisierung der erhaltenen Stämme aus den Selektionsexperimenten wurden im Rahmen dieser Arbeit Empfindlichkeitsbestimmungen gegenüber verschiedenen Antibiotika in An- und Abwesenheit eines EPIs durchgeführt (siehe 3.2.1). Außerdem wurden verschiedene Gene sequenziert, deren Homologe in verwandten Spezies für die Veränderung der Antibiotikaempfindlichkeit von Bedeutung sind (siehe 3.2.2). Weiterhin wurden die Generationszeiten der Wildtyp- und Mutantenstämme bestimmt (siehe 3.2.3), um die Frage zu beantworten, ob die genetischen Veränderungen, die sich während der Selektion ereignet haben, zu einer veränderten Fitness der Bakterienzellen geführt haben.

4.2.1 Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika

Zur Ermittlung der Antibiotikaempfindlichkeit der Wildtyp- und Mutantenstämme aus den Selektionsexperimenten wurden die Empfindlichkeiten gegenüber Antibiotika aus unterschiedlichen Klassen bestimmt. Die MHK-Wert-Bestimmungen von Ciprofloxacin sowie von Chloramphenicol wurden zudem in Anwesenheit des EPIs Phenylalanyl-Arginyl- β -Naphthylamid durchgeführt (siehe Tab. 3.3).

Die MHK-Werte der Fluorchinolone lagen für die Erstschrift-Mutanten überwiegend drei bis fünf Verdünnungsstufen über denen der entsprechenden Wildtypstämme. Die MHK-Werte von Chloramphenicol dagegen waren nicht erhöht. Diese Ergebnisse stimmen mit den ersten MHK-Wert-Bestimmungen von Ciprofloxacin (siehe Tab. 3.1) überein und belegen mit den Werten von den zusätzlich getesteten Fluorchinolonen Sparfloxacin, Clinafloxacin und Norfloxacin die Aussage, dass die Target-Mutationen in *gyrA* an Aminosäureposition Ser83 bzw. Asp87 für die verringerte Sensibilität gegenüber Fluorchinolonen verantwortlich sind (44, 294).

Die MHK-Werte der Fluorchinolone von den Zweitschrift- im Vergleich zu denen der Erstschrift-Mutanten wiesen Erhöhungen von 3 - 5 Verdünnungsstufen auf. Die MHK-Werte von Chloramphenicol zeigten in den Zweitschrift-Mutanten eine Erhöhung von zwei bis drei Verdünnungsstufen. Bemerkenswert sind die MHK-Werte der Zweitschrift-Mutanten von Ciprofloxacin und Chloramphenicol, die in Anwesenheit des EPIs deutlich (3 - 4 Verdünnungsstufen) absanken. Der EPI Phenylalanyl-Arginyl- β -Naphthylamid führt zu einer sterischen Behinderung innerhalb der Effluxpumpe (222) und auf diese Weise zu einer Hemmung des aktiven Efflux.

Diese Ergebnisse sind Grundlage der Hypothese, dass verstärkter aktiver Efflux, der durch die Zugabe eines EPIs gehemmt werden kann, für die Verringerung der Empfindlichkeit der Zweitschrift-Mutanten verantwortlich ist. Es handelt sich

möglicherweise um eine *mdr* Effluxpumpe, wie *AcrAB-TolC* oder *AcrEF-TolC*, deren Expression in den Zweitschritt-Mutanten erhöht ist. Diese Pumpen transportieren nicht nur Fluorchinolone und Chloramphenicol, sondern auch Makrolide wie Erythromycin (238, 239). Da die Stämme BII, CII, DIIa und DIIb-4a-2 aus einem Selektionsexperiment hervorgegangen sind, ist aufgrund der Mutationsrate und der eingesetzten Zellzahl statistisch anzunehmen, dass sich in jedem Selektionsschritt nur eine Mutation in einem Gen ereignet hat, die zu dem veränderten Phänotyp führt (105).

Denkbar wäre auch, dass die genetischen Veränderungen, die zu dem Phänotyp der Zweitschritt-Mutanten führen, nicht eine einzelne Effluxpumpe betreffen, sondern einen globalen Regulator, dessen veränderte Expression eine verstärkte Expression mehrerer Effluxpumpen bedingt. Einen Hinweis darauf, dass ein globaler Regulator und somit die Expression mehrerer Effluxpumpen betroffen sein könnte, geben die geringfügig erhöhten Novobiocin-MHK-Werte in den Zweitschritt-Mutanten. Während die Fluorchinolone, Chloramphenicol und auch die Makrolide von z. B. *AcrAB-Tol* oder auch *AcrEF-TolC* aus der Zelle transportiert werden, ist für den Transport von Novobiocin vor allem die Effluxpumpe *YegMNO-TolC* verantwortlich (20).

4.2.2 Sequenzanalyse von *acrRAB*, *soxR* sowie *rma*

Zur Beantwortung der Frage, welche genetischen Ursachen für den verstärkten Efflux in den Zweitschritt-Mutanten verantwortlich sein könnten, wurden Bereiche des *acrRAB*-Operons sequenziert (siehe 3.2.2). Sowohl in *E. coli* (303) als auch in *Salmonella spec.* (218) wurde der Zusammenhang zwischen einer Mutation in *acrR*, dem lokalen Repressor von *acrAB*, und der verstärkten Expression der Effluxpumpe, welche wiederum zu verringerter Sensibilität gegenüber bestimmten Antibiotika führt, beobachtet. In verschiedenen Fluorchinolon-resistenten Isolaten von *E. coli* wurden Mutationen in *acrR* detektiert, die an der Aminosäureposition 45 zu einem Austausch von Arginin zu Cystein führen (303). Die Aminosäure 45 liegt in der Mitte eines putativen *helix-turn-helix* DNA-Bindemotivs von *AcrR*. Die Stärke der Bindung des lokalen Repressors *AcrR* an die *acrAB*-Operatorregion ist aufgrund des Aminosäureaustausches verringert, wodurch eine effektivere Expression der Strukturgene *acrA* und *acrB* stattfinden kann. Darin könnte eine mögliche Erklärung für die verringerte Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen liegen. Olliver et al. (218) haben bei *in vitro* selektierten Fluorchinolon-resistenten Mutanten von *S. Typhimurium* in *AcrR* eine Verdopplung der Aminosäuren an Position 75 (Isoleucin) sowie 76 (Glutaminsäure) detektiert, die ebenfalls zu einer verstärkten Expression von *acrAB* führt, was mittels real-time PCR gezeigt werden konnte. Weiterhin ist für die Effluxpumpen *AcrAB-TolC* (138) sowie *AcrEF-TolC* (219) bekannt, dass auch im Bereich des Promotors integrierte Insertionselemente die Expression der Pumpe erhöhen können.

Ein Vergleich der Sequenzen von *acrR* der Erst- und Zweitschritt-Mutanten zeigte jedoch, dass sich diese hinsichtlich der sequenzierten Bereiche nicht von den entsprechenden Wildtypen unterscheiden (siehe 3.2.2).

Weiterhin wurde *soxR*, der lokale Regulator von SoxS, bei dem es sich ebenfalls um einen globalen Regulator von Effluxpumpen handelt (siehe 1.5.2.2) sequenziert, da bekannt ist, dass Mutationen in *soxR* zu einer verstärkten Expression von *soxS* und somit einer Verringerung der Antibiotika-Empfindlichkeit führen. Koutsolioutsou et al. (148) haben in einem klinischen Isolat von *S. Typhimurium* eine Punktmutation in *soxR* detektiert, die an der Aminosäureposition 121 zu einem Austausch von Glycin nach Asparaginsäure führt. Zudem wurden in klinischen Isolaten von *E. coli* verschiedene konstitutive *soxR*-Mutationen identifiziert, die zu einer verstärkten Expression von *soxS* und damit zu einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika wie Nalidixinsäure, Chlorampenicol und Tetracyclin, führten (149). Im Rahmen der Sequenzanalysen der vorliegenden Arbeit wurden jedoch auch in *soxR* keine Veränderungen in den *in vitro* selektierten Mutanten im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen detektiert.

Zusätzlich wurde das für den globalen Regulator Rma kodierende Gen (siehe 1.5.2.4) inklusive Promotorregion sequenziert. Über die Regulation dieses Regulators ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nichts bekannt. Eine verstärkte Expression von *ramA*, einem *rma*-Analog, führt jedoch in *Klebsiella pneumoniae* zu einer erhöhten Expression von *acrAB*, was mittels *Northern*-Blots gezeigt werden konnte (273). Die Untersuchung von *rma* im Rahmen dieser Arbeit ergab keine Sequenzunterschiede zwischen den *in vitro* selektierten Mutanten und den entsprechenden Wildtypstämmen. Allerdings konnten Schneiders et al. (273) die erhöhte Expression von *ramA* in *K. pneumoniae* auch nicht auf Mutationen innerhalb des Operators oder der Promotorregion zurückführen. Beide Befunde deuten darauf hin, dass ein übergeordneter Regulator existiert, der die Expression von *rma/ramA* steuert.

Die Sequenzierung von Genen, die möglicherweise für die Verringerung der Antibiotika-Empfindlichkeiten der Zweitschritt-Mutanten verantwortlich sein könnten, stellte einen Versuch dar, erste Hinweise auf mögliche genetische Veränderungen zu erhalten. Da mit dieser Methode jedoch keine Mutation detektiert werden konnte, wurde anschließend, mit der Erstellung einer chromosomalen Genbank (siehe 3.3), ein globaler Ansatz gewählt, um Effluxpumpen bzw. positive Regulatoren zu identifizieren, die in den Zweitschritt-Mutanten zu dem Phänotyp mit erhöhter Resistenz beitragen.

4.2.3 Wachstumsverhalten als Indikator für die Fitness

Um die mögliche Ursache für die verringerte Antibiotika-Empfindlichkeit der Zweitschritt-Mutanten einzugrenzen, wurden die Generationszeiten der Wildtyp- sowie der Mutantenstämme bestimmt. Die Wachstumsgeschwindigkeit wird als Maß für die Fitness der Stämme angesehen. Bestimmte resistenzvermittelnde Mutationen können sich auf die Wachstumseigenschaften der Bakterien auswirken und so deren Fitness, Virulenz und Konkurrenzfähigkeit in der Umwelt beeinflussen.

Die Generationszeiten der Wildtypstämme untereinander unterschieden sich nur geringfügig. Die Erstschritt-Mutanten BI, CI sowie DIb wiesen aber im Vergleich zu den Wildtypstämmen leicht verlängerte Generationszeiten auf (siehe Tab. 3.4).

Die Reduktion der Fitness von Bakterienstämmen durch Mutationen in essentiellen Genen, wie in den für die Gyrase und Topoisomerase IV kodierenden Genen, ist beschrieben worden. Aminosäureaustausche in *gyrA* von *E. coli*, vor allem an Position 83 (S83L) und an Position 87 (D87G), können zu einer Erhöhung der Generationszeit von bis zu 33 % führen (17).

Zudem führen nicht näher charakterisierte Mutationen in den für die Topoisomerasen kodierenden Genen von Chinolon-resistenten *Streptococcus pneumoniae* (91) und *Pseudomonas aeruginosa* (151) zu einem Verlust an Fitness. Der Vorteil für die Bakterien gegenüber bestimmten Antibiotika eine geringere Empfindlichkeit aufzuweisen, stellt jedoch einen vergleichsweise großen Selektionsvorteil dar, so dass die Einbuße hinsichtlich der Fitness, durch eine eingeschränkte Funktionstüchtigkeit essentieller Enzyme, eine untergeordnete Rolle spielt. Ähnlich verhält es sich z. B. auch mit Mutationen in *rpoB*, welches für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase kodiert. Diese Mutationen vermitteln dem betroffenen Bakterienstamm Resistenz gegenüber Rifampicin, sind aufgrund von Schwierigkeiten bei der Transkription jedoch mit einer Reduktion der Fitness verbunden (177).

Häufig setzen sich als Reaktion auf Mutationen, die zu einer Reduktion der Fitness führen, sogenannte kompensatorische Mutationen durch. Ist z. B. ein verringerter Superspiralisierungsgrad, aufgrund einer durch eine Mutation in *gyrA* oder *gyrB* hervorgerufenen verringerten Gyrase-Aktivität, ursächlich für die verringerte Fitness, kann dieser durch zusätzliche Mutationen wiederhergestellt werden. Geschieht dieses durch eine Mutation in demselben Gen, das mutiert für die Einbuße der Fitness verantwortlich ist, so spricht man von intragenischer Kompensation. Führt eine Mutation in einem anderen Gen zu der Fitnesskompensation, so wird von extragenischer Kompensation gesprochen. Bei *Pseudomonas aeruginosa* wurde eine extragenische Kompensation hinsichtlich der Fluorchinolon-Resistenz beschrieben, da ausgeschlossen werden konnte, dass sich die kompensatorische Mutation in *gyrA*, *gyrB*, *parC* oder *parE* ereignet hatte

(151). Daten von Schulte deuten für *E. coli* ebenfalls auf extragenische Mutationen zur Kompensation der Fitnessseinbußen bei der Fluorchinolon-Resistenz hin (276).

In den Zweitschritt-Mutanten, mit Ausnahme von CII, werden die geringfügig verlängerten Generationszeiten der Erstschritt-Mutanten kompensiert. Die genetischen Veränderungen, die sich im zweiten Selektionsschritt bei BII, DIIa und DIIb-4a-2 ereignet haben, führen demnach zu einem Vorteil hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit. Nach Betrachtung der MHK-Werte in Anwesenheit des EPIs (siehe 3.2.1), wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich im zweiten Selektionsschritt Mutationen ereignet haben müssen, die zu einer verstärkten Expression der Effluxpumpen führen.

In *Campylobacter* spec. z. B. führt eine einzelne *gyrA*-Mutation und die verstärkte Expression der *multidrug* Effluxpumpe CmeABC zu verringerter Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen. Zhang et al. (322) zeigten in diesem Zusammenhang, dass die Fluorchinolon-resistenten Mutanten von *Campylobacter* spec. nach der Isolation aus dem Huhn keine Fitnessseinbußen aufwiesen und bei der Kolonisation des Wirtes, auch in Abwesenheit antibakteriellen Selektionsdruckes, konkurrenzfähig waren.

Da unbekannt ist, welche Mutationen in den In-vitro-Zweitschritt-Mutanten zu der verringerten Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika führen, ist es schwierig zu erörtern, ob diese Mutationen zu der geringen Fitnesskompensation führen. Es konnte jedoch prinzipiell bei *Campylobacter* spec. gezeigt werden, dass die verstärkte Expression einer Effluxpumpe nicht zu Einbußen hinsichtlich der Fitness führt. Die Ergebnisse aus der Bestimmung der Generationszeiten widerlegen demnach nicht die Hypothese, dass sich im zweiten Selektionsschritt Mutationen ereignet haben, die zu einer erhöhten Expression von Effluxpumpen führen.

4.3 Erstellung einer Genbank als globaler Ansatz

Durch die Erstellung einer chromosomalen Genbank (siehe 3.3) sollten Effluxpumpen bzw. positive Regulatoren identifiziert werden, die in der *S. Hadar* Zweitschritt-Mutante DIIb-4a-2 zu dem erhöhten Resistenzphänotyp beitragen. Als Methode wurde eine *shotgun*-Klonierung verwendet und die fragmentierte, in den Vektor pBR322 klonierte, chromosomale DNA von DIIb-4a-2 in den Wildtypstamm *S. Hadar* (D) transformiert, um positive Regulatoren zu identifizieren. Klone, die ein interessantes *shotgun*-Fragment tragen, wurden phänotypisch über eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber den Antibiotika Ciprofloxacin und Chloramphenicol identifiziert. Anschließend wurden die entsprechenden Inserts sequenziert und in den genomischen Kontext eingeordnet.

Mittels Erstellung einer Plasmid-Genom-Bibliothek konnten Lomovskaya und Lewis (169) in *E. coli* die, der MFS-Familie zugehörige (170), Effluxpumpe EmrAB identifizieren. Diese

Bibliothek wurde ebenfalls durch *shotgun*-Klonierung der chromosomalen DNA eines resistenten Klon erstellt. Verwendet wurde ein gegenüber dem Entkoppler Carbonylcyanid-3-Chlorophenylhydrazon (CCCP) resistenter Klon, der zuvor auf 100 μ M CCCP selektiert wurde. Eine andere Gruppe um Gambino (85) durchsuchte eine, wie auch im Rahmen dieser Arbeit mit dem Plasmid pBR322 hergestellte, Genbank nach Klonen, die eine erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika vermitteln und konnte auf diesem Weg *marA* als Ursache identifizieren. Die von pBR322 ausgehende Expression ist demnach ausreichend hoch, um Gene, wie positive Regulatoren oder Effluxpumpen, die eine verringerte Antibiotika-Sensibilität vermitteln, zu identifizieren.

Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 4000 Klonen zeigten nur 4 Klone Wachstum auf Ciprofloxacin und Chloramphenicol (1,5 x MHK). Nach Sequenzierung und Einordnung in den genomischen Kontext enthielt jedoch nur einer der untersuchten Klone ein interessantes Insert (siehe Abb. 3.2). Mit Hilfe des *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) wurde das Insert als Gen STM2126 identifiziert (siehe 3.3.1). Die übrigen Klone hatten vermutlich aufgrund der Selektion auf Ciprofloxacin eine der bekannten *gyrA*-Mutationen (252) erworben.

STM2126 zeigt eine starke Homologie zu einem putativen Membranprotein der HlyD-Familie von *E. coli*. In *E. coli* werden Toxine, wie Hämolyisin A, mit Hilfe des Transportsystems HlyBD sekretiert (127, 128, 144, 147). Das Protein HlyB stellt den Transporter in der Cytoplasmamembran dar, während HlyD als Membranfusionsprotein fungiert (62, 235). Interessanterweise koppelt HlyBD, wie zahlreiche RND-Effluxpumpen (siehe 1.4.1), mit TolC (142) in der äußeren Membran (18, 145). Diese Tatsache führte zu der Einschätzung, dass es sich bei STM2126 möglicherweise um einen Bestandteil einer *multidrug* Effluxpumpe handelt, der für die verringerte Antibiotikaempfindlichkeit der In-vitro-Zweitschritt-Mutante verantwortlich ist.

Zur Untersuchung, ob das mittels *shotgun*-Klonierung identifizierte Gen STM2126 für die verringerten Empfindlichkeiten gegenüber Ciprofloxacin und Chloramphenicol verantwortlich ist, wurde jenes mit Hilfe des Arabinose-induzierbaren pBAD-Promotors überexprimiert (siehe 3.3.2). Die MHK-Werte gegenüber Ciprofloxacin, Chloramphenicol, Sparfloxacin und Nalidixinsäure zeigten jedoch nach Überexpression von STM2126 keine Veränderung im Vergleich zu der mittels Glukose reprimierten Kontrolle (siehe Tab. 3.6). Überexpression des Gens STM2126 vermittelt demnach keine erhöhte Resistenz gegenüber den Fluorchinolonen und Chloramphenicol. Auch bei diesem Klon beruhte die erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin vermutlich auf dem Erwerb einer Mutation in den bekannten Targetgenen. Die verringerte Sensibilität gegenüber

Chloramphenicol lässt sich nicht so einfach erklären, da Unempfindlichkeiten gegenüber diesem Antibiotikum in der Regel auf der Expression Plasmid- oder Transposon-lokalisierter *cat*-Gene basieren (84, 266). Die durch *cat* kodierte Chloramphenicol-Acetyl-Transferase katalysiert die Di-Acetylierung des Antibiotikums, welches in der acetylierten Form nicht mehr an die Zielstruktur, die 50S-Untereinheit des Ribosoms, binden kann. Die Aufnahme des *cat*-Gens durch einzelne Zellen ist jedoch im Rahmen dieses Experimentes nicht denkbar.

Mehrere mögliche Erklärungen sind dafür vorstellbar, warum mit Hilfe der Erstellung der chromosomalen Genbank kein Gen identifiziert werden konnte, welches für die verringerte Antibiotika-Empfindlichkeit der Zweitschritt-Mutante Dlb-4a-2 verantwortlich ist. 1. Bei einer Wahrscheinlichkeit von nur etwa 97,5 % mit der jedes Gen kloniert wurde, besteht natürlich die Möglichkeit, dass das relevante Gen nicht vollständig erfasst wurde und das unvollständige Transkript somit kein funktionstüchtiges Protein lieferte. 2. Das mutierte Gen ist möglicherweise kein positiver Regulator oder eine Effluxpumpe, sondern ein negativer Regulator, der nach der genetischen Veränderung nicht mehr als Repressor fungiert und dann die Expression positiver Regulatoren oder einer Effluxpumpe ermöglicht. Beispiele dafür sind Mutationen in *acrR* (218, 303) oder *marR* (13, 166, 210, 214, 302), die in *E. coli* die Expression von *acrAB* bzw. *marA* erhöhen. Um dieser Frage nachzugehen, könnte das *shotgun*-Experiment invertiert werden. Die fragmentierte chromosomale DNA des Wildtypstammes könnte in die resistente Mehrschrittmutante transformiert werden. Aufgrund der Komplementation des vermuteten mutierten Regulators mit dem funktionierenden Regulator aus dem Wildstamm, würde eine MHK-Wert-Reduktion in der transformierten Mutante erfolgen.

Zu erwarten gewesen wäre mittels dieses Ansatzes zudem die Detektion von Genen bekannter Effluxpumpen wie z. B. *acrAB*. Ursächlich für die fehlende Detektion bekannter Pumpen könnte die zu geringe Größe der klonierten Fragmente (4,5 kb) oder auch die zufällige Verteilung der Erkennungssequenzen für die *Sau3A*-Restriktion sein.

Sowohl durch Sequenzierung bekannter Regulatoren als auch durch das *shotgun*-Klonierungsexperiment konnte die Ursache für die MHK-Wert-Erhöhen von Ciprofloxacin und Chloramphenicol in den Zweitschritt-Mutanten nicht identifiziert werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde nun versucht, unbekannte Effluxpumpen oder Regulatoren in *Salmonella* zu identifizieren und mittels real-time PCR die Expression der entsprechenden Gene in den Mutanten zu untersuchen.

4.4 Identifizierung unbekannter Effluxpumpen

Mdr Effluxpumpen verfügen, über Spezies-Grenzen hinaus, über charakteristische Motive bzw. weisen Konsensus-Sequenzen auf. So besitzen z. B. alle Transportproteine der RND-Familie (siehe 1.4.1) 12 transmembrane Helices mit großen, periplasmatischen Domänen zwischen Helix 1 und 2 sowie zwischen Helix 7 und 8 (245). Die spezifische Funktion (Transport von strukturell unterschiedlichen Substanzen) sowie die spezifische Lokalisation (in der Cytoplasmamembran) führen zu der biologischen Notwendigkeit, dass sich an vielen Positionen des Proteins die gleiche Aminosäure befindet. Auf diese Weise kommen z. B. Aminosäuresequenz-Homologien von MexB aus *Pseudomonas aeruginosa* und AcrB aus *S. Typhimurium* von 69 % zu stande (siehe Tab. 3.7). Ähnlich verhält es sich bei den anderen Komponenten der *multidrug* Effluxpumpen. Bei den Membranfusionsproteinen (MFPs) der RND-Familie sind ein 60-Aminosäurereste-Segment, das dem N-terminalen, Membran-durchspannenden Segment folgt sowie ein 100-Reste-Segment, welches in der Nähe des C-Terminus lokalisiert ist, stark konserviert (62). Diese stark konservierten Bereiche sind für die Interaktion mit der inneren bzw. äußeren Membran von Bedeutung. Die Aminosäuresequenz-Homologie zwischen MexA von *P. aeruginosa* und AcrA von *S. Typhimurium* liegt mit 57 % noch relativ hoch, jedoch unter der Homologie der entsprechenden Transportproteine MexB und AcrB. Noch weniger stark ist die Konservierung in der Gruppe der Proteine der äußeren Membran (*outer membrane proteins* = OMPs). Es handelt sich dabei um eine stark divergente Gruppe. Vorhanden ist eine N-terminale Signalsequenz, die von einem stark hydrophilen Bereich von etwa 40 Aminosäure-Resten gefolgt ist (228). Die Sequenz-Homologie zwischen OprM von *P. aeruginosa* und TolC von *S. Typhimurium* beträgt nur 19 %. Erklären lässt sich diese, verglichen mit der Homologie der anderen Effluxpumpen-Komponenten, relativ geringe Sequenz-Homologie dadurch, dass sich die OMPs unabhängig von den in einem Operon organisierten Transportproteinen und den Membranfusionsproteinen entwickelt haben (163, 173). Bei TolC und OprM handelt es sich um Porine, die mit verschiedenen Proteinen koppeln. TolC z. B. ist zusammen mit HlyBD für den Export von Hämolyisin A verantwortlich (143), nach Kopplung mit AcrAB für die Exkretion von verschiedenen Antibiotika, Farbstoffen, Detergenzien, Fettsäuren, Gallensalzen sowie organischen Lösungsmitteln (11, 207, 261, 286) und nach Kopplung mit EmrAB für den Export hydrophober Entkoppler und Antibiotika wie Nalidixinsäure und Thiolactomycin (82, 170).

Zielsetzung der in dieser Arbeit durchgeführten Aminosäuresequenz-Alignments war die Identifizierung möglicher unbekannter Effluxpumpen in *Salmonella* spec. Da die verschiedenen Bestandteile der *multidrug* Effluxpumpen, wie bereits dargelegt, unterschiedlich starke Sequenzhomologien aufweisen, wurde versucht mittels

Aminosäuresequenz-Alignments Gene ausfindig zu machen, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu bekannten Effluxpumpen putative Effluxpumpen darstellen. Für die Alignments gegen das Genom von *S. Typhimurium* LT2 wurden gezielt Komponenten (Transporter, MFPs und OMPs) von Effluxpumpen verschiedener Familien ausgewählt, die Fluorchinolone als Substrate besitzen.

Die für die Alignments eingesetzten Komponenten zeigten überwiegend Sequenzhomologien mit schon beschriebenen Effluxpumpen aus *Salmonella* spec. wie AcrAB, AcrEF und YegMNO (siehe Tab. 3.7). Unbekannte Sequenzen, die dann mit „putatives Kation-Efflux-Protein“ oder „ähnlich eines Transmembranproteins aus *E. coli*, das Acridin-Resistenz vermittelt“ beschrieben sind, weisen nur Sequenzhomologien zu bekannten Effluxpumpen von zum Teil deutlich unter 50 % auf. Da auf Grundlage dieser Alignments die Gene für Effluxpumpen-Komponenten ausgewählt wurden, deren Expressionsmuster im Verlaufe der Arbeit mittels real-time PCR (siehe 3.6) untersucht wurden, wurde davon abgesehen, die Expression putativer Effluxpumpengene zu bestimmen, die nur eine relativ geringe Sequenzhomologie zu bekannten Effluxpumpen aufweisen. Gewählt wurden für die Untersuchungen mittels real-time PCR Gene, die bekanntermaßen für Effluxpumpen kodieren, welche Fluorchinolone als Substrate besitzen. Nach den Aminosäuresequenz-Alignments wurde die Wahrscheinlichkeit, dass eine veränderte Expression bekannter Effluxpumpen ursächlich für die verringerte Fluorchinoloneempfindlichkeit der In-vitro-Zweitschritt-Mutanten ist, als größer eingeschätzt.

Wäre ein erstes Screening nach interessanten Effluxpumpen mit Hilfe eines Microarray-Chips durchgeführt worden, hätten auch Gene untersucht werden können, die Homologien zu bekannten Effluxpumpen anderer Spezies aufweisen, in *Salmonella* spec. jedoch noch nicht beschrieben sind. Die Methode der real-time PCR ermöglicht jedoch nur die Analyse einer ausgewählten Anzahl von Genen. Daher wurden für die Untersuchungen mittels real-time PCR überwiegend diejenigen Gene gewählt, die bekanntermaßen für Fluorchinolone-Transporter kodieren.

4.5 Deletion von *marR* zur Überexpression von MarA

Die Expression des globalen Regulators MarA steht unter der Kontrolle des lokalen Repressors *marR* (277) (siehe 1.5.2.1). Zur Identifizierung ausschließlich über den globalen Regulator MarA regulierter Effluxpumpen mittels real-time PCRs wurden daher *marR*-defiziente Mutanten von *S. Hadar* WT (D) sowie der Erstschrift-Mutante D1a und der Zweitschrift-Mutante D11a hergestellt (siehe 3.5). Die genotypische Überprüfung mittels analytischer PCR lieferte den Beweis, dass die Deletion von *marR* in allen Stämmen

sequenzspezifisch stattgefunden hatte (siehe 3.5.1). Die phänotypische Untersuchung der *marR*-Deletionsmutanten lieferte jedoch MHK-Werte, die auf dem Niveau des entsprechenden Wildtypstammes bzw. bei *DlaΔmarR* und *DIIaΔmarR* deutlich darunter lagen (siehe Tab. 3.8). Erwartet wurden allerdings für die Deletionsmutanten deutlich erhöhte MHK-Werte verglichen mit den Werten für die entsprechenden *marR*-kompetenten Stämme, denn nach der Deletion von *marR* kann *marA* ungehindert exprimiert werden. Der globale Regulator MarA aktiviert dann die Transkription verschiedener Effluxpumpengene, so dass die Empfindlichkeiten gegenüber verschiedenen Antibiotika sinken sollten. In *E. coli* wurde vielfach gezeigt, dass Mutationen in *marR* bzw. in der Operatorregion *marO* zu einer verstärkten Expression von *marA* und damit zu einem erhöhten Resistenzphänotyp führen (53, 56, 89, 214, 302). Obwohl in *Salmonella* spec. bis dato *in vivo* keine Mutationen in *marR* oder *marO* identifiziert wurden, zeigten Sulavik et al. (285), dass der *mar*-Locus von *S. Typhimurium* strukturell und funktionell eine große Ähnlichkeit zu *marRAB* von *E. coli* aufweist.

Besonders auffällig sind die MHK-Werte der hergestellten Deletionsmutanten in Anwesenheit des EPIs. Die Werte der Erst- und Zweitschritt-Mutanten aus dem Selektionsversuch sanken deutlich stärker als die Werte für die entsprechenden Deletionsmutanten. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass Efflux bei den Deletionsmutanten keine Bedeutung mehr hat, *marA* demnach nicht mehr exprimiert wird. Eine erhöhte Empfindlichkeit von *S. Choleraesuis* gegenüber verschiedenen Antibiotika wurde auch nach Inaktivierung von *marA* durch Insertionsmutagenese beobachtet (290). Um auszuschließen, dass Sekundärstrukturen, die möglicherweise nur in den $\Delta marR$ -Stämmen auftreten, für die mangelnde Expression von *marA* verantwortlich sind, wurde eine MHK-Wert-Bestimmung der Deletionsmutanten vor Excision der Kanamycinresistenz-Kassette (Integranen) durchgeführt. Die Integranen verhielten sich jedoch verglichen mit den Deletionsmutanten ähnlich sensibel. Demnach wurde *marA* auch in diesen Stämmen nicht exprimiert.

Die *marR*-Deletion wurde anschließend mit einem weiteren Primer-Paar (homologe Flanken an anderem Genloci) wiederholt, um auszuschließen, dass die fehlende Expression von *marA* sequenzspezifische Ursachen hat. Allerdings zeigten die mit dem zweiten Primerpaar erzeugten *marR*-Deletionsmutanten ein ähnliches MHK-Wert-Profil, wie die zuvor konstruierten Mutanten.

Mittels real-time PCR wurden die Transkriptmengen von *marA* in D und in $D\Delta marR$ verglichen um sicherzustellen, dass die Expression des Aktivators nicht durch Deletion des Repressors beeinflusst wurde. Die Bestimmung ergab eine 6,3-fache Aufregulation von *marA* in $D\Delta marR$. Da die Deletion von *marR* demnach wie erwartet zu einer

verstärkten Expression von *marA* führt, scheint die mangelnde Funktionalität von MarA nicht auf Ebene der Transkription, sondern auf Ebene der Translation zu liegen.

Bei der Wahl der Primer zur Durchführung der Deletion wurde darauf geachtet, dass die wenige Basen stromaufwärts von *marR* befindliche Shine/Dalgarno-Sequenz (SD) (285) intakt bleibt. *marA* verfügt zwar über eine eigene SD, möglicherweise findet die Translation von *marR* und *marA* jedoch gekoppelt statt (251). Unter Umständen ist es für eine erfolgreiche Translation von *marA* von Bedeutung, dass das Ribosom schon an der SD von *marR* an die mRNA bindet, auch wenn dann, beispielsweise durch eine Deletion, kein funktionstüchtiges MarR gebildet werden kann.

Als Erklärung für die mangelnde Translation von *marA* wäre denkbar, dass die Effizienz der Translationsinitiation, die durch Sekundärstrukturen in der mRNA kontrolliert werden kann (150, 189), nach Einführung der Deletion in *marR* abnimmt. Möglicherweise ist der Zugang zur Initiationsstelle von *marA* durch eine veränderte Sekundärstruktur der mRNA, nach Einführung der Deletion, blockiert. Daraus könnte eine mangelhafte Translationsinitiation resultieren, die zu einer geringeren Molekülanzahl an MarA in den Deletionsmutanten als in den Wildtypstämmen führt, was wiederum die erhöhte Sensibilität der Deletionsmutanten gegenüber verschiedenen Antibiotika bedingen könnte.

Die *marR*-Deletion sollte der Identifizierung exklusiv über MarA regulierter Effluxpumpen dienen. Die Identifizierung der auf diese Weise regulierten Pumpen wurde im Rahmen dieser Arbeit alternativ mittels Salicylsäure-Induktion erreicht. Durch die Bindung von Salicylsäure an den Repressor MarR erfolgt ebenfalls eine verstärkte Expression von *marA*, wie Randall und Woodward (247) für *S. Typhimurium* zeigen konnten. Von geringfügigem Nachteil an dieser Strategie, gegenüber der *marR*-Deletion, ist jedoch die Unkenntnis darüber, was Salicylsäure, neben der Inaktivierung von MarR, möglicherweise außerdem in der Zelle bewirkt.

4.6 Expression von Effluxpumpen und Regulatoren

Zur Untersuchung der Expression von Effluxpumpen und Regulatoren in den In-vitro-Stämmen wurden quantitative real-time PCR-Experimente durchgeführt. Bestimmt wurde einerseits die Expression bestimmter Gene der Zweitschritt-Mutanten von *S. Typhimurium* und *S. Hadar* im Vergleich zu der Genexpression der entsprechenden Wildtyp-Stämme bzw. andererseits die Expression bestimmter Effluxpumpen- und Regulatorgene nach Induktion oder Überexpression im Vergleich zu der Expression im nicht-induzierten Referenzstamm. Ziel war zum einen die Aufklärung der Ursache der erhöhten Antibiotika-Unempfindlichkeit in den Zweitschritt-Mutanten und zum anderen die prinzipielle Untersuchung der Regulation von Effluxpumpen in *Salmonella spec.*

4.6.1 Induktion durch Fluorchinolone und Chloramphenicol

Es ist bekannt, dass die Regulation von Effluxpumpen einem komplizierten Netzwerk aus lokalen (siehe 1.5.1) sowie globalen (siehe 1.5.2) Regulatoren unterliegt. Um der Frage nachzugehen, ob möglicherweise auch eine direkte Induktion von Pumpen bzw. Regulatoren durch Substrate stattfindet oder ob Fluorchinolone möglicherweise indirekt über eine Veränderung des Superspiralisierungsgrades Einfluß auf die Regulation nehmen, wurden Induktionsexperimente von S. Hadar mit verschiedenen Fluorchinolonen sowie mit Chloramphenicol durchgeführt. Mittels quantitativer real-time PCR wurde die Expression des Effluxpumpengens *acrA* sowie des Regulatorgens *marA* nach Induktion bestimmt (siehe 3.6.2).

Bekanntlich führen bestimmte Mutationen in *gyrA* zu einer veränderten Aktivität der Gyrase, was wiederum eine Veränderung des Superspiralisierungsgrades zur Folge haben kann (4, 17). Von dem DNA-Superspiralisierungsgrad wiederum ist die Expression bestimmter Gene abhängig, da die Promotoren dieser Gene je nach Superspiralisierungsgrad besser oder schlechter für die RNA-Polymerase zugänglich sind (65, 66, 83, 311). Die Überlegung, die zu dem experimentellen Ansatz der Induktion mittels Fluorchinolonen geführt hat war, ob an die DNA-gebundene Fluorchinolone-Moleküle möglicherweise auch Einfluß auf den Superspiralisierungsgrad nehmen, wodurch die Expression bestimmter Gene verändert wird. So wurde z. B. von Abu Mraheil (1) nach Zugabe von Nalidixinsäure und Moxifloxacin eine Abnahme des Qsc-Wertes, als Maß für den DNA-Superspiralisierungsgrad, beobachtet. Denkbar wäre eine verringerte Expression von Genen, die für Porine wie OmpF kodieren sowie eine verstärkte Expression von Genen, die für Effluxpumpen bzw. deren Aktivatoren wie AcrAB bzw. MarA kodieren, um die Fluorchinolone aus der Zelle zu eliminieren.

Die Chinolone bilden mit DNA und Gyrase einen stabilen, ternären, spaltbaren Komplex (42), wodurch essentielle Prozesse wie DNA-Replikation und Transkription nicht mehr stattfinden können, da der Komplex replikative Helikasen und RNA-Polymerasen blockiert (68, 279, 306). Nach dem beschriebenen Modell würde die Zelle unter dem Einfluß der Antibiotika jedoch einen „Rettungsprozeß“ initiieren. Bei der durch einzelsträngige DNA ausgelösten SOS-Antwort (187, 231) wird die Zellteilung verhindert und die Produktion von DNA-Reparaturenzymen verstärkt (122). Neben dem SOS-System ist die homologe Rekombination als Mechanismus zur Beseitigung der durch die Chinolone induzierten Schäden beschrieben (131). Prinzipiell wirken Chinolone nur auf sich teilende Zellen. Teilungsinaktive Zellen weisen unter Chinolonwirkung Lebensfähigkeit auf. Es wäre daher also denkbar, dass Zellen trotz des Einflusses der Chinolone lebenserhaltende Prozesse, wie die Produktion von Effluxpumpen, aufrechterhalten.

Ebenso denkbar wäre eine direkte Induktion von globalen Regulatoren oder Effluxpumpen durch die Fluorchinolone als Substrate, ähnlich wie in *E. coli* die durch Gallensalze und Fettsäuren induzierte Expression von AcrAB über Interaktion mit Rob (261). Das Induktionspotential von Antibiotika, insbesondere von Fluorchinolonen, wurde schon vielfach beobachtet. Gmuender et al. (94) beschrieben in *Haemophilus influenzae* z. B. die verstärkte Expression zahlreicher Gene, die für DNA-Reparatur-Proteine kodieren sowie von *gyrA* und *gyrB* nach Behandlung der Zellen mit Ciprofloxacin (10 x MHK). In *Pseudomonas aeruginosa* beobachteten Brazas und Hancock (36) die verstärkte Expression des Effluxpumpengens *mexB* nach Induktion mit Ciprofloxacin (0,3 x MHK). Shaw et al. (278) fanden in Induktionsexperimenten in *E. coli* mit verschiedenen Antibiotika heraus, dass die Behandlung mit Norfloxacin (33 x MHK) ebenfalls zu einer erhöhten Expression von unter anderem *recA* (konnte auch schon bei einer Konzentration von 0,5 x MHK beobachtet werden), *gyrA* sowie *gyrB* führt. Bemerkenswert ist die deutliche Expressionssteigerung von *yeeN*, einem putativen Transportprotein. Die Expression der Gene *ompN* sowie *yedS*, die für Proteine der äußeren Membran kodieren, sinkt nach Behandlung mit Norfloxacin, wobei die Autoren annehmen, dass die Regulation hier über einen veränderten Superspiralisierungsgrad geschieht. Nach Zugabe von Ampicillin (2 x MHK) konnte eine Expressionssteigerung der für RND-Pumpen kodierenden Gene *acrF*, *yegO* sowie *yhIV* beobachtet werden.

Die Zugabe von Ciprofloxacin im Rahmen dieser Arbeit führte jedoch in keiner Konzentration und nach keiner Induktionszeit zu einer Expressionsänderung des Effluxpumpengens *acrA* oder des Regulorgens *marA* (siehe Tab. 3.9). Von den übrigen Fluorchinolonen bewirkte Norfloxacin eine geringe Aufregulation von *acrA* (2,6 x) und *marA* (1,2 x) sowie Moxifloxacin eine geringe Aufregulation von *acrA* (1,8 x). Die Zugabe von Chloramphenicol führte zu einer höheren Expressionssteigerung der untersuchten Gene (*acrA*: 4 x; *marA*: 7,8 x).

Abgesehen von Norfloxacin und Moxifloxacin induzieren die Fluorchinolone weder *acrA* noch *marA*. Für diese Unterschiede innerhalb der Gruppe der Fluorchinolone sind vermutlich strukturelle Unterschiede verantwortlich. Moxifloxacin unterscheidet sich von den übrigen verwendeten Fluorchinolonen durch die Methoxygruppe am C8-Atom. Norfloxacin trägt im Vergleich zu Ciprofloxacin, welches nicht induziert, am N-Atom des Pyridonringes einen Ethylrest statt des charakteristischen Cyclopropyls. Die sich von den Chinolonen stark unterscheidende Struktur des Chloramphenicols ist vermutlich für die leichte Induktionskraft bezüglich der Expression von *acrA* und *marA* verantwortlich.

Obwohl Fluorchinolone Substrate vieler Effluxpumpen darstellen, führt eine erhöhte Konzentration im Medium nicht zu einer verstärkten Expression der Pumpen. Eine mögliche Begründung liegt darin, dass die synthetischen Fluorchinolone erst vor etwa

40 Jahren entwickelt wurden und sich die Mikroorganismen evolutionär nicht anpassen konnten. Offenbar ist es Zufall, dass die relativ jungen Fluorchinolone mittels eines sich über einen sehr langen Evolutionszeitraum entwickelten Effluxmechanismus aus der Zelle eliminiert werden. Über eine Veränderung des Superspiralisierungsgrades nach Behandlung mit Fluorchinolonen findet offenbar auch keine Erhöhung der Expression von *acrA* und *marA* statt.

4.6.2 Expressionsunterschiede in Wildtyp- und Mutantenstämmen

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die verstärkte Expression von Effluxpumpen für die verringerte Sensibilität gegenüber verschiedenen Antibiotika in den In-vitro-Zweitschritt-Mutanten verantwortlich ist, wurden die Transkriptmuster diverser Pumpengene untersucht (siehe 3.6.3). Zudem galt es die Frage zu beantworten, welche Effluxpumpen in welchem Maße durch erhöhte Expression zu dem Resistenzphänotyp beitragen.

Grundsätzlich bestätigen die Ergebnisse die Hypothese. Eine deutlich erhöhte Expression in den Zweitschritt-Mutanten im Vergleich zu den Wildtypstämmen zeigten vor allem die Effluxpumpengene *acrA* und *acrE*, wobei Stamm-spezifische Unterschiede deutlich wurden. In DIIa betrug die Aufregulation nur etwa 5-fach, wohingegen die Expressionssteigerung in den übrigen Stämmen, mit Ausnahme von *acrE* bei CII, mehr als das Doppelte betrug. Bezüglich der Expression von *yegO* ließ sich in allen In-vitro-Mutanten eine Steigerung von etwa 2 - 4-fach, hinsichtlich der von *tolC* eine Steigerung von etwa 4 - 6-fach beobachten. Die Expression von *ydhE* zeigte nur in den *S. Hadar*-Mutanten eine geringe Steigerung (2 - 3-fach). Unverändert waren die Transkriptmuster des Effluxpumpengens *emrA* sowie die der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN*.

Demnach trägt offenbar die verstärkte Expression der RND-Effluxpumpen AcrAB-TolC, AcrEF-TolC und YegMNO-TolC sowie bei den Zweitschritt-Mutanten von *S. Hadar* zusätzlich die der MATE-Effluxpumpe YdhE gemeinsam zu der verringerten Sensibilität gegenüber verschiedenen Antibiotika der In-vitro-Mutanten bei.

Yang et al. (312) beobachteten in *E. coli* ebenfalls einen erhöhten Resistenzeffekt nach simultaner Überexpression der Effluxpumpen AcrAB-TolC, YdhE sowie MdfA (SMR-Familie) im Vergleich zu dem Effekt, den die Überexpression einer Effluxpumpe alleine bewirkte. Die Gruppe um Lee (158) beschrieb für *E. coli* und *Pseudomonas spec.* Unterschiede hinsichtlich der Stärke der vermittelten Unempfindlichkeit in Abhängigkeit von den Effluxpumpen-Typen, die gemeinsam exprimiert wurden. Den stärksten Synergie-Effekt soll die simultane Expression von Efflux-Pumpen haben, die verschiedenen Typen angehören, so z. B. einer aus mehreren Komponenten bestehenden Pumpe (RND-Familie), die die Substrate direkt in das Medium sekretiert, und einer Ein-Komponenten-Pumpe (SMR-, MFS-, MATE-Familie). Die simultane Expression mehrerer Pumpen des

gleichen Typs soll, verglichen mit der Expression einer einzelnen Pumpe, zu einer vergleichsweise geringen weiteren Erniedrigung der Sensibilität führen. Betrachtet man die MHK-Werte der In-vitro-Zweitschritt-Mutanten (siehe Tab. 3.3), so liegen hinsichtlich der Stämme keine bedeutsamen Unterschiede vor. Die zusätzliche Expression einer Effluxpumpe der MATE-Familie (YdhE) in den *S. Hadar* Stämmen führte hier nicht zu einer höheren Unempfindlichkeit verglichen mit den Zweitschritt-Mutanten von *S. Typhimurium*.

Auch in klinischen Isolaten von *S. Typhimurium*, die nach einer Therapie mit Ciprofloxacin deutlich erniedrigte Empfindlichkeiten gegenüber Ciprofloxacin, Nalidixinsäure, Chloramphenicol, Tetracyclin und Ethidiumbromid zeigten, wurde eine erhöhte Genexpression von *acrAB*, *acrEF*, *acrD* sowie des globalen Regulorgens *marA* gemessen (70). Chen et al. (46) beobachteten bei auf Ciprofloxacin selektierten Isolaten von *S. Typhimurium* eine erhöhte Genexpression von *acrAB*, *acrEF* und *emrAB* (MFS-Familie). Die Expression von *yegMNO* war ebenfalls erhöht, wenn auch in einem geringeren Maße.

Die alleinige Aufregulation von *acrAB* wurde in einer Vielzahl von Isolaten von *Salmonella* spec. (25, 50, 93, 234, 246, 281) sowie von *Klebsiella* spec. (188) beobachtet. Es handelte sich dabei sowohl um klinische Isolate, bei denen eine Therapie mit Fluorchinolonen versagt hatte, als auch um Stämme, die aus Selektionsexperimenten hervorgegangen waren. Olliver et al. (219) beschrieben bei einem mit Fluochinolonen selektierten Isolat von *S. Typhimurium* DT204 die erhöhte Expression der Effluxpumpengene *acrEF*. Zurückgeführt werden konnte diese Expressionssteigerung auf die Insertion des IS1- sowie des IS10-Elementes im Promotorbereich von *acrEF*. Die Insertionselemente kodieren ihrerseits für Promotoren, von denen die erhöhte Expression von *acrEF* ausging.

Zur Beantwortung der Frage, welche Ursache die erhöhte Expression der Effluxpumpen in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Selektionsmutanten haben könnte, wurden die Transkriptmuster der Gene, die für die globalen Regulatoren MarA, SoxS, Rob und Rma kodieren, untersucht (siehe 3.6.4). Eine deutliche Expressionssteigerung, von >80-fach in der Zweitschritt-Mutante Dlb-4a-2 und von etwa 40 - 50-fach in den übrigen untersuchten In-vitro-Mutanten, zeigte das Regulatorgen *rma*. Eine vergleichsweise geringfügig erhöhte Expression wurde bei *marA* beobachtet (etwa 2 - 4-fach). Die Expression von *soxS* war nur in Dlb-4a-2 geringfügig erhöht (1,7-fach), wohingegen das Transkriptmuster von *rob* keine Veränderung zeigte.

Erwartungsgemäß war in keinem der untersuchten Stämme eine Expressionsänderung von *rob* zu beobachten ist, da *rob* konstitutiv exprimiert wird (261) und die Aktivität dieses Regulators nur posttranslational durch Bipyridin verstärkt werden kann (263).

Besonders auffällig ist die sehr deutliche Aufregulation von *rma* in allen Zweitschritt-Mutanten. Die Überexpression dieses globalen Regulators ist vermutlich die Ursache für die erhöhte Expression der Effluxpumpen AcrAB-TolC, AcrEF-Tol, YegMNO-TolC sowie von YdhE in den *S. Hadar* Zweitschritt-Mutanten. Eine verstärkte Expression von *rma* bzw. analogen Genen konnte schon mehrfach für eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika verantwortlich gemacht werden. Komatsu et al. (141) beobachteten bei der Überexpression von *romA* aus *Enterobacter cloacae* in *E. cloacae* sowie in *E. coli* eine Inhibierung der Expression von Proteinen der äußeren Membran, wie OmpF, sowie eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen, β -Laktam-Antibiotika, Chloramphenicol und Tetracyclin. Einige Jahre später beschrieben George et al. (88) den mit MarA und SoxS verwandten Transkriptionsaktivator RamA von *Klebsiella pneumoniae*, der überexprimiert in *E. coli* ebenfalls die Unempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika erhöhte. In diesem Zusammenhang äußerten die Autoren die Vermutung, dass der zuvor von Komatsu et al. (141) identifizierte Aktivator nicht von *romA*, sondern möglicherweise von dem stromabwärts lokalisierten Gen *ramA* kodiert wird, da *ramA* von *E. cloacae* und *ramA* von *K. pneumoniae* deutliche Sequenzhomologien untereinander sowie mit anderen Transkriptionsaktivatoren, wie *marA* und *soxS*, aufweisen. In *Salmonella* spec. wurde ein homologes Gen, *rma* genannt, erstmals von Yassien et al. (313) beschrieben. *rma* wurde mittels einer genomischen Bibliothek eines Isolates von *S. enterica* Serovar Paratyphi B, das Resistenz gegenüber diversen Antibiotika zeigte, identifiziert und vermittelte nach Überexpression in *E. coli* auch in diesem Stamm erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika. Ähnliches beobachteten van der Straaten et al. (297) für *ramA* von *S. Typhimurium* sowie Chollet et al. (48) für *ramA* von *Enterobacter aerogenes*. Eine verstärkte Expression von *ramA* in klinischen Isolaten wurde erstmals von Schneiders et al. (273) beschrieben. Klinische Isolate von *K. pneumoniae*, die Resistenz gegenüber Cephalosporinen und erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin zeigten, wiesen eine erhöhte Expression von *ramA*, nicht jedoch von *marA* oder *soxS* auf. Die Ursache der Überexpression von *ramA* konnte nicht ermittelt werden. Mutationen innerhalb der Promotor- oder Operatorregion von *ramA* konnten jedoch ausgeschlossen werden. Die heterologe Expression von *ramA* in *E. coli* vermittelte erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika, die von einer funktionalen AcrAB-TolC Effluxpumpe abhängig war. Auch Ruzin et al. (268) zeigten in klinischen Isolaten von *K. pneumoniae*, die einen *multiple drug resistance* (MDR) Phänotyp aufwiesen, den Zusammenhang zwischen Überexpression von *ramA* und Transkriptionsaktivierung von *acrAB*. Unbeantwortet bleibt die Frage nach der Ursache der Aufregulation des globalen Regulators *rma*. Mittels Sequenzierung der Zweitschritt-Mutanten (siehe 3.2.2) konnte

eine Veränderung in dem Strukturgen selbst ausgeschlossen werden. Über die Regulation von *rma* ist bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nichts bekannt. Der unmittelbare genomische Kontext liefert keine Hinweise auf einen lokalen Regulator, ähnlich wie z. B. *marR*, der die Expression von *marA* bis zu seiner Inaktivierung, durch Mutationen oder die Bindung eines Struktur-verändernden Substrates, reprimiert (siehe 1.5.2.1). Es ist aber dennoch anzunehmen, dass eine genetische Veränderung des potentiellen Regulators von *rma* zu dessen verstärkter Expression geführt hat. Infolge dessen fand die Aufregulation der Effluxpumpen statt, die wiederum in der verringerten Sensibilität der In-vitro-Zweitschritt-Mutanten resultierte.

4.6.3 Rolle von MarA, SoxS, Rob und Rma für die Expression von Effluxpumpen

Um der Frage nachzugehen, welche Effluxpumpen von welchen globalen Regulatoren angesprochen werden und in welchem Maße möglicherweise Regulationskaskaden über mehrere Regulatoren stattfinden, wurden Induktionsexperimente durchgeführt.

4.6.3.1 Induktion von *marA*

Die Expression von *marA* wurde in *Salmonella* spec. durch die Zugabe von Salicylsäure erreicht. Wie für *E. coli* beschrieben (55) bindet der Induktor Salicylsäure an das Dimer des lokalen Repressors MarR und verstärkt die Dissoziation von MarR und der Operatorregion *marO*, woraufhin die ungehinderte Expression des globalen Regulorgens *marA* stattfinden kann.

Nach Zugabe des Induktors Salicylsäure war in allen untersuchten Stämmen eine deutliche Aufregulation der Expression von *marA* zu beobachten. Bei den Stämmen B und D fand zudem eine leichte Expressionssteigerung (etwa 3 - 4-fach) des Regulorgens *rma* statt. Bei Stamm C waren zusätzlich eine etwa 8-fache Expressionssteigerung von *soxS* sowie eine 2,5-fache Steigerung von *sodA* zu beobachten (siehe Abb. 3.11 und Tab. 3.12). Auffällig ist das unterschiedliche Induktionspotential von Salicylsäure in den verschiedenen Stämmen von *Salmonella* spec. Stammspezifische Unterschiede führen offenbar zu einer unterschiedlich starken Inaktivierung von MarR und damit zu einer unterschiedlich starken Expressionsaktivierung von *marA*. Denkbar wäre auch, dass je nach Stamm unterschiedlich viel Salicylsäure in die Zellen gelangt ist. Bei *S. Typhimurium* DT104 (C) ist zudem eine Expressionserhöhung von *soxS* zu beobachten. Eine Regulation von *soxS* über MarA ist bislang nicht beschrieben worden. Da die Expressionserhöhung nur bei einem Stamm (C) beobachtet wurde, handelt es sich möglicherweise um eine stammspezifische Besonderheit. Die Aufregulation von *sodA* kann sowohl durch MarA als auch durch SoxS bedingt sein. In *E. coli* beschrieben Martin

et al. (179) für *sodA* eine *marbox*, die von MarA sowie SoxS gebunden werden kann. Über die Regulation von *rma* ist bis dato nichts bekannt. Da bei *S. Typhimurium* DT204c (B) und *S. Hadar* (D) nach Zugabe von Salicylsäure eine leichte Aufregulation zu beobachten ist, wäre eine Regulation über MarA denkbar bzw. eine Aktivierung mittels Salicylsäure. Anhand der von Martin und Rosner (184) für *E. coli* veröffentlichten *marbox*-Konsensus-Sequenz wurde im Promotorbereich von *rma* nach einer möglichen *marbox* gesucht, jedoch keine detektiert. Da die beschriebene Konsensus-Sequenz relativ stark degeneriert ist, besteht jedoch die Möglichkeit, dass eine vorhandene *marbox* nicht identifiziert wurde. Außerdem wurde die Suche nach der entsprechenden Sequenz auf bestimmte promotornahe Bereiche beschränkt. Die genaue Position in Hinblick auf die -10- und -35-Region kann jedoch stark variieren.

Erwartungsgemäß wurde bei *rob* keine Expressionsänderung beobachtet, da *rob* konstitutiv exprimiert wird (261) und die Aktivität dieses Regulators nur posttranslational verstärkt werden kann (263). Barbosa und Levy (21), die mittels eines Macroarrays einen *E. coli*-Stamm, der *marA* konstitutiv exprimiert, hinsichtlich durch diesen Regulator angesprochene Gene untersuchten, beobachteten ebenfalls keine Expressionsänderung von *rob*. Schneiders et al. (274) beschrieben in *E. coli* sogar eine Repression des *rob*-Promotors durch MarA, sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Laut den Autoren verfügt die Operatorregion von *rob* über eine rückwärts orientierte *marbox*, an die MarA bindet und auf diese Weise die Expression von *rob* reprimiert, anstatt wie sonst beschrieben als Transkriptionsaktivator zu fungieren.

Nach Induktion mit Salicylsäure zeigten alle untersuchten Effluxpumpengene bei allen Stämmen eine erhöhte Expression. Auffällig war die jeweils stärkste Expressionssteigerung bei *S. Typhimurium* DT204c (B), von etwa 14-fach bei *acrA*, etwa 12-fach bei *yegO* und etwa 10-fach bei *emrA*. Die Expressionssteigerungen der Effluxpumpengene in *S. Typhimurium* DT104 (C) und *S. Hadar* (D) lagen, mit Ausnahme von *acrA* (1,3-fach) und *acrE* (1,8-fach) bei C sowie von *yegO* (8-fach) bei D, im Bereich von 2 - 5-fach. Unverändert waren die Transkriptmuster der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* (siehe Abb. 3.12 und Tab. 3.13). Die vergleichsweise starke Aufregulation in *S. Typhimurium* DT204c (B) ist auf die starke Expression von *marA* zurückzuführen. Die Induktion von *marA* war in *S. Typhimurium* DT104 (C) vergleichsweise am geringsten, was sich auch in den absoluten Werten der Expressionserhöhung der Effluxpumpen widerspiegelt. Das Verhältnis der Aufregulation von *marA* zu der Aufregulation der Effluxpumpen stimmt in den untersuchten Stämmen demnach überein.

Die Expression der untersuchten Pumpengene *acrA*, *acrE*, *emrA*, *yegO*, *ydhE* sowie die des Poringens *tolC* stieg in allen untersuchten Stämmen nach Induktion mit Salicylsäure und wird daher offenbar über MarA reguliert. In *E. coli* wurden für *acrA* und *tolC* *marboxes*

gefunden (179). Bei der Entwicklung des *mar*-Phänotyps wurde auch eine koordinierte Aktivierung, wie im Rahmen dieser Arbeit durch MarA beobachtet, von *acrAB* und *tolC* beschrieben (11, 80). Auch Barbosa und Levy (21) beschrieben eine erhöhte Expression von *acrA* und *tolC* in einem *E. coli*-Stamm, der konstitutiv *marA* exprimiert. In *Salmonella spec.* beobachteten Escribano et al. (75) den Zusammenhang zwischen MarA-Induktion mittels Salicylsäure, erhöhter Expression der Effluxpumpe AcrAB und verringerter Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika.

Für *acrE* und *yegO* wurden im Rahmen dieser Arbeit in den verwendeten *Salmonella*-Stämmen anhand der Konsensus-Sequenz von Martin und Rosner (184) potentielle *marboxes* identifiziert. Die mögliche *acrEF-marbox* liegt etwa 140 Nukleotide stromaufwärts vom *acrE*-Startcodon, zeigt 1 Nukleotid Abweichung von der beschriebenen Konsensus-Sequenz und liegt in der sogenannten B-Orientierung vor. Die potentielle *yegMNO-marbox* liegt etwa 650 Nukleotide stromaufwärts des *yegO*-Startcodons in *yegN*, es existieren 2 Nukleotide Abweichung von der beschriebenen Konsensus-Sequenz und ebenfalls liegt die B-Orientierung vor. Im Gegensatz zu der sogenannten F-Orientierung, beschreibt die B-Orientierung die invertierte Ausrichtung einer *marbox* (179). Es ist jedoch zu bedenken, dass es sich bei den ausgemachten *marboxes* lediglich um mögliche Bindungsstrukturen handelt, deren Funktionalität experimentell überprüft werden müsste. Da *acrE* und *yegO* jedoch nach Induktion mittels Salicylsäure eine erhöhte Genexpression aufweisen, werden diese Gene in *Salmonella spec.* offensichtlich über MarA reguliert.

Die Regulation von *emrA* geschieht in *E. coli* nach Grkovic et al. (101) nicht über MarA. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aber eine Aufregulation von *emrA* nach Salicylsäureinduktion festgestellt. Möglicherweise verhält es sich in *Salmonella spec.* anders oder die Regulation von *emrA* findet über SoxS oder Rma statt. Das Gen *ydhE*, welches für eine der MATE-Familie zugehörige Effluxpumpe kodiert, zeigt auch in allen Stämmen eine leichte Aufregulation. Über die globale Kontrolle ist bis dato nichts bekannt. Offenbar findet eine Regulation über MarA statt. Eine *marbox* konnte jedoch, mittels der von Martin und Rosner (184) beschriebenen Konsensus-Sequenz für *E. coli*, nicht identifiziert werden. Die Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* zeigten keine Expressionsänderung. Mittels dieser Kontrolle konnte gezeigt werden, dass die nach Induktion mit Salicylsäure ermittelten Expressionssteigerungen genspezifisch auftraten und nicht infolge einer allgemein erhöhten Transkription.

Zur Beurteilung, inwiefern die durch Induktion von *marA* hervorgerufene Expressionssteigerung der Effluxpumpen die Antibiotika-Empfindlichkeit der untersuchten *Salmonella*-Stämme beeinflusst, wurden MHK-Wert-Bestimmungen durchgeführt. Unter Zugabe des Induktors Salicylsäure wurden die Empfindlichkeiten gegenüber Ciprofloxacin

und Chloramphenicol bestimmt (siehe Tab. 3.14). Mit Ausnahme der Zweitschritt-Mutante CII gegenüber Ciprofloxacin zeigten alle untersuchten Stämme nur leicht verringerte Sensibilitäten gegenüber den untersuchten Antibiotika. Rosner (262) beobachtete in *E. coli* jedoch eine deutliche Verringerung der Empfindlichkeiten gegenüber Ampicillin, Tetracyclin und Nalidixinsäure nach Zugabe von Salicylsäure oder Acetylsalicylsäure. In *Salmonella spec.* ist nach Induktion von *marA* nur eine geringfügig erniedrigte Sensibilität gegenüber Ciprofloxacin und Chloramphenicol zu beobachten. Offenbar führt die verstärkte Expression von *marA* alleine nicht zu einem Resistenzphänotyp, sondern es ist zusätzlich die erhöhte Expression anderer Regulatoren notwendig.

4.6.3.2 Induktion von *soxS*

Die Expression von *soxS* wurde durch Zugabe von Paraquat erhöht. Das aktive Fe-S-Zentrum des lokalen Regulators *soxR* wird durch die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies oxidiert (86) und aktiviert in dieser Form die Expression von *soxS*.

Nach Zugabe von Paraquat fand in allen Stämmen eine starke Expressionssteigerung des Regulorgens *soxS*, sowie eine entsprechend schwächere Steigerung von *sodA* statt. Eine geringe Aufregulation der Transkriptmengen der Effluxpumpengene *marA*, *rma* und *rob* war stammspezifisch zu beobachten (siehe Abb. 3.13 und Tab. 3.15). Die Induktion von *soxS* mittels Paraquat fiel stärker aus als die von *marA* mittels Salicylsäure. Auch bei dieser Induktion waren jedoch stammspezifische Unterschiede hinsichtlich der Induktionsstärke zu beobachten. Die *sodA*-Kontrolle zeigte, dass sich die Aufregulation von *soxS* wie erwartet auf die Expression von *sodA* auswirkt. Dieser Zusammenhang wurde schon von Pomposiello und Demple (237) für *S. Typhimurium* beschrieben. Die stärkste Expressionssteigerung von *soxS* war bei *S. Typhimurium* DT104 (C) zu beobachten, die dann verglichen mit den anderen Stämmen, zu der höchsten Expressionssteigerung von *sodA* führte. Das Verhältnis der Aufregulation von *soxS* zu der Aufregulation von *sodA* stimmt in den untersuchten Stämmen demnach überein.

In *E. coli* bindet nicht nur MarA an *marboxes*, sondern auch die Homologe SoxS und Rob (136, 137, 192). Ähnlich verhält es sich offenbar auch in *Salmonella spec.* SoxS aktiviert in den Stämmen *S. Typhimurium* DT204c (B) und *S. Hadar* (D) die Transkription von *marA*. Die leichte Aufregulation von *rma* und *rob* ist ungewöhnlich, da sie sich in nur je einem Stamm beobachten lässt. Die Transkriptmenge von *rob* sollte, aufgrund dessen konstitutiver Expression (261), unverändert sein. Die erhöhte Expression von *rma* in *S. Typhimurium* DT104 hat möglicherweise stammspezifische Ursachen.

Deutlich ist die Aufregulation der Expression von *acrA*, *acrE* sowie *ydhE* in dem Stamm B. Die Expression der übrigen untersuchten Gene liegt, mit Ausnahmen von *yegO* bei C (1,5-fach) und *ydhE* (6,6-fach) sowie *acrA* (1,5-fach) bei D, bei allen Stämmen im Bereich

von 2 - 6-fach. Unverändert sind die Transkriptmuster von *acrE* und *yegO* bei D, von *emrA* bei C und D sowie die der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* (siehe Abb. 3.14 und Tab. 3.16). Die Expression der Pumpengene ist überwiegend erhöht, ähnlich wie nach Induktion von MarA. Auch über SoxS findet demnach ein nicht unerheblicher Teil der Expressionskontrolle der Pumpengene statt. Schon Alekshun und Levy (5) sowie Barbosa und Levy (21) stellten fest, dass die Gene des MarRAB-Regulons mit denen des SoxRS-Regulons überlappen. Ursächlich dafür ist die strukturelle Ähnlichkeit zwischen MarA und SoxS sowie ihren DNA-Bindestellen (179, 181). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass von MarA und SoxS die gleichen Effluxpumpengene angesprochen werden. Auch Miller und Sulavik (192) beschrieben für *E. coli* die Aufregulation von *acrAB*, und eine daraus resultierende verringerte Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika, durch sowohl MarA als auch SoxS. Die allgemein niedrige Expressionssteigerung der Effluxpumpengene in *S. Hadar* nach Induktion mit Paraquat hat offenbar stammspezifische Ursachen. Die Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* zeigten erwartungsgemäß keine Expressionsänderung. Auch die Induktion mit Paraquat hat demnach nicht zu einer allgemein erhöhten Transkription, sondern zu einer spezifischen Antwort der Zelle geführt.

Zur Beurteilung, inwiefern die durch Induktion von *soxS* hervorgerufene Expressionssteigerung der Effluxpumpen die Sensibilität der untersuchten *Salmonella*-Stämme beeinflusst, wurden ebenfalls MHK-Wert-Bestimmungen durchgeführt. Unter Zugabe des Induktors Paraquat wurden die Empfindlichkeiten gegenüber Ciprofloxacin und Chloramphenicol bestimmt (siehe Tab. 3.17). In Anwesenheit von Paraquat, welches reaktive Sauerstoff-Spezies erzeugt (309, 310), stiegen die Empfindlichkeiten aller Stämme gegenüber Chloramphenicol. Die Empfindlichkeiten gegenüber Ciprofloxacin sanken leicht oder blieben unverändert, mit Ausnahme der Zweitschritt-Mutante CII.

Paraquat bewirkt, besonders gegenüber Chloramphenicol, eine leichte Erhöhung der Empfindlichkeit. Offenbar wirkt Paraquat in der eingesetzten Konzentration in so hohem Maße zytotoxisch, dass die Zellen empfindlicher auf das Antibiotikum reagieren. Koutsolioutsou et al. (148) beobachteten sowohl für eine Mutante von *S. Typhimurium*, die eine Mutation in *soxR* (G121D) trägt, die wiederum zu einer erhöhten Expression von *soxS* führt, als auch für einen Wildtypstamm nach Induktion mit Paraquat, verringerte Empfindlichkeiten gegenüber Nalidixinsäure, Ciprofloxacin, Chloramphenicol und Tetracyclin. Interessanterweise wurden jedoch in der *soxR*-Mutante stärkere MHK-Wert-Erhöhrungen beschrieben als in dem mit Paraquat induzierten Wildtypstamm. Möglicherweise verfügt das konstitutiv veränderte SoxR über eine stärkere Aktivität als das, unter bestimmten Versuchsbedingungen, mittels Paraquat aktivierte SoxR des Wildtypstammes. Als Bestätigung dessen stellten die Autoren fest, dass die Menge an

soxS-mRNA in der unbehandelten Mutante höher war als in dem für 30 min mit Paraquat behandelten Stamm.

4.6.3.3 Posttranslationale Verstärkung von Rob

Da das globale Regulatorgen *rob* konstitutiv exprimiert wird (137), besteht nicht die Möglichkeit durch Zugabe von Induktoren auf die Genexpression einzuwirken. Die Aktivität von Rob wurde daher, wie für *E. coli* beschrieben (263), posttranslational durch die Zugabe von Bipyridin erhöht.

Nach Induktion mit Bipyridin war die Genexpression von *soxS* in den Stämmen B (etwa 60-fach) und C (40-fach) deutlich, und die von *sodA* entsprechend geringer (2,7-fach bei B, 6,6-fach bei C) erhöht. Das Regulatorgen *rma* zeigte abhängig vom Stamm eine 4 - 8-fache Expressionssteigerung. Die Genexpression der Regulatoren *rob* und *marA* war in keinem der untersuchten Stämme erhöht (siehe Abb. 3.15 und Tab. 3.18). Mittels Bipyridin kam es wie erwartet zu keiner Expressionssteigerung von *rob*, da die Aktivitätserhöhung von Rob nicht auf erhöhter Transkriptmenge, sondern auf posttranslationaler Konformationsänderung des Proteins durch Bindung von Bipyridin beruht. Die erhöhte Expression von *soxS* ist möglicherweise auf die Wirkung des Bipyridins zurückzuführen, da es sich bei 4,4'-Bipyridin um die unmethylierte Vorstufe des Paraquats handelt, welches die Expression von *soxS* induziert. Die Expressionserhöhung von *soxS* führte zu einer Expressionssteigerung des für die Superoxiddismutase kodierenden Gens *sodA*. In *S. Hadar* ist die Aufregulation von *soxS* offenbar zu gering, so dass eine Expressionssteigerung von *sodA* nicht messbar war. Über die Regulation von *rma* ist, wie schon erwähnt, bis dato nichts bekannt. Da bei allen untersuchten Stämmen nach Zugabe von Bipyridin eine Aufregulation zu beobachten ist, wäre eine Regulation über Rob denkbar bzw. eine Aktivierung mittels Bipyridin. Anhand der von Martin und Rosner (184) für *E. coli* veröffentlichten *marbox*-Konsensus-Sequenz wurde im Promotorbereich von *rma* jedoch keine *marbox* ausfindig gemacht. Es ist daher wahrscheinlich, dass der beschriebene Effekt ebenfalls auf die Wirkung des Bipyridins, und nicht auf die erhöhte Aktivität von Rob zurückzuführen ist. Die Expression des Regulatorgens *marA* ist nach Verstärkung von Rob nicht erhöht. Für *E. coli* ist jedoch beobachtet worden, dass nach Verstärkung von Rob mittels Bipyridin die Expression von *marA* leicht ansteigt (263). Zudem geht man davon aus, dass Rob an *marboxes* des *mar/sox/rob*-Regulons (179), folglich auch an die *marbox* des *mar*-Operons (100), bindet und auf diese Weise die Expression der entsprechenden Gene aktiviert. Möglicherweise war die im Rahmen dieses Experimentes durchgeführte posttranslationale Verstärkung von Rob nicht ausreichend stark, um eine weitere Aktivierung anderer Gene zu

gewährleisten. Denkbar wäre ebenfalls, dass die für *E. coli* beobachtete Verstärkung von Rob mittels Bipyridin nicht auf *Salmonella spec.* zutrifft.

Nach Induktion mit Bipyridin war die Expression der Effluxpumpengene nur geringfügig erhöht (1,4 - 4-fach). Unverändert waren die Transkriptmuster von *tolC* bei B, von *acrA* und *emrA* bei C und von *acrA*, *acrE*, *ydhE* und *tolC* bei D sowie die der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* (siehe Abb. 3.16 und Tab. 3.19). Die sehr geringe, und zudem in Bezug auf die Stämme sehr unregelmäßige, Expressionserhöhung einiger Effluxpumpengene kann nicht mit Sicherheit auf die Aktivität von Rob zurückgeführt werden, da die Expression der globalen Regulatorgene *soxS* und *rma* ebenfalls erhöht war. Um definitiv beurteilen zu können, welche Effluxpumpen über den globalen Regulator Rob angesprochen werden und ob es zudem zu einer Aktivierung anderer Regulatoren kommt, muss *rob* überexprimiert werden. Dass eine deutliche Aktivierung der Promotoren des *rob*-Regulons nur durch Überexpression von *rob* mit heterologen Promotoren bzw. durch die Verwendung von *multicopy*-Plasmiden erreicht werden kann, wurde auch schon von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (14, 159, 205).

Die MHK-Werte der untersuchten Stämme bewegten sich nach Zugabe von 2,2'-Bipyridin sowohl gegenüber Ciprofloxacin als auch gegenüber Chloramphenicol geringfügig um die Werte der entsprechenden Referenzstämmen (siehe Tab. 3.20). Betrachtet man die nur geringfügig erhöhte Expression der Effluxpumpengene, so war dieses Ergebnis zu erwarten.

4.6.3.4 Überexpression von *rob*

Die mit Hilfe des Arabinose-induzierbaren Promotors pBAD durchgeführte Überexpression des Regulators *rob* führte stammspezifisch zu einer erhöhten Expression von etwa 20-fach bis etwa 55-fach. Unverändert waren die Transkriptmengen der Regulatorgene *marA*, *soxS* und *rma* (siehe Abb. 3.18 und Tab. 3.21). Die unterschiedlich hohen Werte für *rob* nach Überexpression in den verschiedenen Stämmen sind darauf zurückzuführen, dass die Gen-eigene Shine-Dalgarno-Sequenz von dem Translationsapparat des jeweiligen Stammes unterschiedlich effektiv erkannt wird. Die Überexpression von *rob* führte nicht zu einer erhöhten Expression anderer Regulatoren. Demnach kann die erhöhte Expression der Regulatorgene *soxS* und *rma* in dem Bipyridin-Induktionsexperiment nicht aus einer Aktivität von Rob resultieren, sondern ist auf den Einfluß des Induktors zurückzuführen.

Nach Überexpression des globalen Regulators *rob* war die Expression der für die RND-Effluxpumpen kodierenden Gene *acrA*, *acrE*, *yegO* und *tolC* bei allen untersuchten Stämmen erhöht, wobei stammspezifische Unterschiede vorlagen. Mit Ausnahme des Stammes B (2,1-fache Expressionssteigerung von *emrA*) war die Expression der Gene

emrA und *ydhE* nicht erhöht. Die Expression der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* war ebenfalls unverändert (siehe Abb. 3.19 und Tab. 3.22). In *E. coli* ist vor allem AcrAB als diejenige Effluxpumpe beschrieben worden, deren erhöhte Expression nach Überexpression von *rob* (287) bzw. Induktion von *rob* durch Gallensalze und Fettsäuren (261) den *mar*-Phänotyp bedingt. In *Salmonella spec.* sind, wie im Rahmen dieses Experimentes gezeigt werden konnte, die Effluxpumpen AcrEF sowie YegMNO in ähnlicher Höhe beteiligt. In *E. coli* bindet Rob zur Aktivierung der entsprechenden Gene an die *mar/sox/rob-boxes* (137). Da sowohl von MarA, als auch von SoxS und Rob überwiegend die gleichen Effluxpumpengene angesprochen wurden, scheint es sich in *Salmonella spec.* ähnlich zu verhalten.

Zur Beurteilung, inwiefern die durch verstärkte Expression des globalen Regulators *rob* hervorgerufene Expressionssteigerung der Effluxpumpen die Sensibilität der untersuchten *Salmonella*-Stämme beeinflusst, wurden MHK-Wert-Bestimmungen durchgeführt. In Anwesenheit des Überexpressionsplasmides pPHB864 wurden die Empfindlichkeiten gegenüber verschiedenen Antibiotika bestimmt (siehe Tab. 3.26 - 28). Nach der Überexpression des globalen Regulators *rob* war bei *S. Typhimurium* DT204c gegenüber den meisten untersuchten Antibiotika eine Verringerung der Empfindlichkeit von 2 - 3 Verdünnungsstufen zu beobachten. Die Empfindlichkeiten gegenüber Moxifloxacin, Nalidixinsäure, Tetracyclin sowie Roxithromycin waren nur um 1 Verdünnungsstufe erniedrigt, wohingegen der MHK-Wert für Erythromycin unverändert blieb. Bei *S. Typhimurium* DT104 war nach Überexpression von *rob* gegenüber den meisten Antibiotika keine Veränderung der Empfindlichkeit zu beobachten. Die Empfindlichkeiten gegenüber Moxifloxacin, Nalidixinsäure, Chloramphenicol und Novobiocin waren um 1 Verdünnungsstufe verringert. Da *S. Typhimurium* DT104 in M9-Medium kein Wachstum zeigte, wurden die MHK-Wert-Bestimmungen in MH-Bouillon durchgeführt. Wie bereits erwähnt, haben Guzman et al. (102) auf die geringere Expressionskraft des pBAD-Promotors in Komplexmedium hingewiesen. Bei *S. Hadar* war gegenüber allen untersuchten Antibiotika der verschiedenen Substanzklassen, mit Ausnahme der Makrolide, eine Verringerung der Empfindlichkeit von 2 - 3 Verdünnungsstufen zu beobachten. Die durch den globalen Regulator Rob bedingte erhöhte Expression der *multidrug* Effluxpumpen AcrAB-TolC, AcrEF-TolC und YegMNO-TolC führt demnach zu verringerten Empfindlichkeiten gegenüber Fluorchinolonen, Chloramphenicol, Novobiocin sowie Tetracyclin. Ariza et al. (14) beschrieben in *E. coli* nach Überexpression von *rob* ebenfalls erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber Nalidixinsäure, Chloramphenicol und Tetracyclin, während Nakajima et al. (205) erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber Chloramphenicol, Tetracyclin, Novobiocin und Kanamycin beobachteten. Der Transport von Chloramphenicol geschieht in *Enterobacter spec.* mit Hilfe der AcrAB-TolC-

Effluxpumpe (90), wohingegen Novobiocin in *E. coli* hauptsächlich von YegMNO-TolC transportiert wird (20). Möglicherweise verhält es sich in *Salmonella spec.* ähnlich. Die vergleichsweise hohen MHK-Werte für Erythromycin und Roxithromycin lassen sich durch die natürliche Resistenz gramnegativer Mikroorganismen gegenüber den Makroliden erklären. Diese Unempfindlichkeit resultiert aus der äußeren Membran, die eine Permeationsbarriere für große Moleküle darstellt. Auffällig ist jedoch die unveränderte Empfindlichkeit nach Überexpression von *rob* gegenüber den Makroliden. Für *E. coli* (49, 325) und auch für *Salmonella spec.* (24) wurden Makrolide als Substrate der AcrAB-Effluxpumpe beschrieben. Offenbar gelangen aufgrund der äußeren Membran als Permeationsbarriere so wenige Moleküle in die Zelle, dass eine erhöhte Expression von AcrAB zu keiner weiteren Erhöhung der Resistenz führt.

Hinsichtlich der Detektion der über Rob regulierten Effluxpumpen eignet sich die Überexpression mittels pBAD im Vergleich zu der posttranslationalen Verstärkung mittels Bipyridin erheblich besser. Bei der erstgenannten Methode ist sichergestellt, dass die veränderte Expression der Pumpengene auf den globalen Aktivator Rob zurückzuführen ist. Darüber hinaus wurden nach Überexpression von *rob* absolut höhere Werte hinsichtlich der veränderten Genexpression bestimmt, so dass zudem der Einfluß der verstärkten Expression der Effluxpumpen auf den Phänotyp untersucht werden konnte.

4.6.3.5 Überexpression von *rma*

Die mit Hilfe des Arabinose-induzierbaren Promotors pBAD durchgeführte Überexpression des Regulatorgens *rma* führte stammspezifisch zu einer erhöhten Expression von etwa 20-fach bis etwa 80-fach. Unverändert waren die Transkriptmengen der Regulatorgene *marA*, *soxS* und *rob* (siehe Abb. 3.21 und Tab. 3.23). Auch die Höhe der Überexpression von *rma* ist von dem Stamm, in dem das Regulatorgen zur Expression gebracht wird, abhängig. Wie die verstärkte Expression von *rob*, so führt auch die Überexpression von *rma* nicht zu einer erhöhten Expression anderer Regulatorgene. Nach Überexpression des globalen Regulatorgens *rma* war die Expression der für die RND-Effluxpumpen kodierenden Gene *acrA*, *acrE*, *yegO* und *tolC* bei allen untersuchten Stämmen erhöht. Besonders deutlich waren die Erhöhungen der Genexpression in dem Stamm D (13 - 17-fach). Die Expression der Gene *emrA* und *ydhE* war in keinem der untersuchten Stämme erhöht. Unverändert waren auch die Transkriptmuster der Kontrollgene *rpoE* und *rpoN* (siehe Abb. 3.22 und Tab. 3.24).

Deutlich wird in diesem Versuch der Einfluß der Höhe der *rma*-Überexpression auf die Höhe der Expression der RND-Pumpen. Die höchste Expression von *rma* war in *S. Hadar* zu beobachten. Die daraus resultierende Aufregulation der RND-Pumpen lag mit einem Wert von etwa 16-fach deutlich über den Werten, die für die Stämme von *S. Typhimurium*

ermittelt wurden. Die absoluten Werte für die Genexpressionsänderung sind demnach von nicht so großer Bedeutung. Von Interesse ist eher, ob bestimmte Effluxpumpen von dem globalen Regulator Rma angesprochen werden oder nicht. Ähnlich wie nach Überexpression von *rob*, ist nach verstärkter Expression von *rma* nur die Genexpression der RND-Pumpen aufreguliert. Der Zusammenhang zwischen erhöhter Expression von *rma* (bzw. homologer Gene) und einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika ist bereits von einigen Arbeitsgruppen beschrieben worden, so z. B. von George et al. (88) für *ramA* in *Klebsiella pneumoniae*, von van der Straaten et al. (297) für *ramA* in *S. Typhimurium* und von Chollet et al. (48) für *ramA* in *Enterobacter aerogenes*. Bislang ist jedoch, als Ursache der erhöhten Antibiotika-Unempfindlichkeit nach verstärkter Expression des globalen Regulators Rma, nur in *K. pneumoniae* eine erhöhte Expression der AcrAB-TolC Effluxpumpe beschrieben worden (268, 273). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass in *Salmonella* spec. neben AcrAB-TolC auch die RND-Pumpen AcrEF-TolC und YegMNO-TolC an der durch Rma vermittelten, erhöhten Unempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika beteiligt sind.

Zur Beurteilung, inwiefern die durch verstärkte Expression des globalen Regulators *rma* hervorgerufene Expressionssteigerung der Effluxpumpen die Sensibilität der untersuchten *Salmonella*-Stämme beeinflusst, wurden MHK-Wert-Bestimmungen durchgeführt. In Anwesenheit des Überexpressionsplasmids pPHB863 wurden die Empfindlichkeiten gegenüber verschiedenen Antibiotika bestimmt (siehe Abb. 3.26 - 28). Nach Überexpression von *rma* blieben die MHK-Werte bei *S. Typhimurium* DT204c für Erythromycin und Moxifloxacin unverändert, die Werte für die übrigen Antibiotika stiegen um 2 - 3 Verdünnungsstufen. Die Empfindlichkeiten gegenüber Roxithromycin und Novobiocin verringerten sich um 1 Verdünnungsstufe. Bei *S. Typhimurium* DT104 blieben die MHK-Werte für die Makrolide sowie für Tetracyclin unverändert, wohingegen die Werte für die übrigen Antibiotika um 2 - 3 Verdünnungsstufen stiegen (mit Ausnahme von Chloramphenicol: 1 Verdünnungsstufe). Die MHK-Werte für die Makrolide blieben bei *S. Hadar* ebenfalls unverändert, die Werte für die übrigen Antibiotika stiegen um 3 - 4 Verdünnungsstufen (mit Ausnahme von Moxifloxacin: 2 Verdünnungsstufen). Aufgrund des schlechten Wachstums von *S. Typhimurium* DT104 wurden die MHK-Wert-Bestimmungen, wie bereits beschrieben, in MH-Bouillon, statt in M9-Medium durchgeführt. Die in diesem Stamm ermittelten MHK-Wert-Erhöhen fielen aufgrund der Verwendung des Komplexmediums geringer aus als in den anderen Stämmen, waren jedoch im Gegensatz zu den Werten nach Überexpression von *rob* deutlicher erhöht. Allgemein sind die durch verstärkte Expression von *rma* erreichten Erhöhungen in Bezug auf die Antibiotika-Unempfindlichkeiten etwas größer als diejenigen nach Überexpression

von *rob*. Ursache dafür ist vermutlich die stärkere Aufregulation der Genexpression der RND-Pumpen nach Überexpression von *rma*.

Die, durch den globalen Regulator Rma bedingte, erhöhte Expression der *multidrug* Effluxpumpen AcrAB-TolC, AcrEF-TolC und YegMNO-TolC führt demnach zu verringerten Empfindlichkeiten gegenüber Fluorchinolonen, Chloramphenicol, Novobiocin sowie Tetracyclin. Chollet et al. (48) beobachteten in *E. aerogenes* nach Überexpression von *ramA* ebenfalls erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen, Chloramphenicol und Tetracyclin. Wie auch nach verstärkter Expression von *rob*, bleibt die Empfindlichkeit gegenüber den Makroliden nach Überexpression von *rma* unverändert. Dieses Resultat bestätigt die Hypothese, dass der stattfindende Transport der Makrolide zu gering ist, um die, aufgrund der natürlichen Resistenz, schon relativ hohen Unempfindlichkeiten weiter zu erhöhen.

4.6.3.6 Vergleich des Resistenzphänotyps nach Induktion bzw. Überexpression globaler Regulatoren

Große Unterschiede zeigen die Auswirkungen auf den Resistenzphänotyp, in Abhängigkeit davon, ob die verstärkte Expression der Regulatoren mittels Induktion (mit Salicylsäure, Paraquat bzw. Bipyridin) oder Überexpression (von *rob* bzw. *rma*) erreicht wurde. Zudem scheint der Regulator Rma die Expression der Effluxpumpen stärker zu induzieren und damit eine stärkere Erniedrigung der Empfindlichkeiten gegenüber verschiedenen Antibiotika zu bewirken als Rob nach Überexpression. Um die Effekte der einzelnen Regulatoren jedoch quantitativ vergleichen zu können, müssten alle Regulatorgene überexprimiert werden. Um zudem die „Induktionskraft“ der verschiedenen Regulatoren auf die Expression der Effluxpumpen vergleichen zu können, müssten mit dem pBAD-Überexpressionsplasmid identische Level der Regulatoren-Überexpression erreicht werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass mit unterschiedlichen Arabinose-Konzentrationen keine unterschiedliche Expressionsstärke bewirkt werden konnte. Definitiv kann demnach mittels dieser Experimente nur eine Aussage darüber getroffen werden, welche Effluxpumpen über welche Regulatoren angesprochen werden, ob es Überlappungen hinsichtlich der Kontrolle bestimmter Effluxpumpen gibt bzw. ob bestimmte Regulatoren über andere Regulatoren angesprochen werden. Nicht beurteilt werden kann, welchen Anteil die einzelnen Effluxpumpen an der Ausbildung des Resistenzphänotyps haben. Zu bedenken ist außerdem, dass mittels real-time PCR nur der Level der Genexpression (mRNA) gemessen wird, ohne dass Informationen über posttranskriptionale Prozesse oder die tatsächliche Proteinexpression erhalten werden.

4.6.3.7 Modell der Regulation ausgewählter Effluxpumpen in *Salmonella spec.*

Zusammenfassend verdeutlichen die Überexpressions- und Induktionsversuche, dass die Kontrolle von Effluxpumpen in *Salmonella spec.* einer sehr komplexen Regulation unterliegt, an der ein Netzwerk von Regulatoren beteiligt ist, die sich zum Teil auch untereinander beeinflussen. Durch jeden der globalen Regulatoren MarA, SoxS, Rob und Rma werden die RND-Effluxpumpen AcrAB-TolC, AcrEF-TolC sowie YegMNO-TolC angesprochen. Durch MarA werden zusätzlich die Expression der MATE-Effluxpumpe YdhE sowie die der MFS-Effluxpumpe EmrAB kontrolliert. Die Expression von YdhE wird zudem durch SoxS reguliert. Einen zusammenfassenden Überblick der Regulation ausgewählter, an der Sekretion von Fluorchinolonen beteiligten, Effluxpumpen in *Salmonella spec.* gibt Abbildung 4.1.

Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Genexpressionsdaten überein, die für die In-vitro-Zweitschritt-Mutanten ermittelt wurden. Die erhöhte Genexpression der RND-Effluxpumpen AcrAB-TolC, AcrEF-TolC und YegMNO-TolC ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die auffällig starke Expressionssteigerung des globalen Regulators Rma zurückzuführen. Eine Mutation, vermutlich in einem Regulator von Rma, die für die verstärkte Expression desselben und damit für die erhöhte Genexpression der *multiple drug resistance* Effluxpumpen verantwortlich ist, scheint ursächlich für die verringerte Antibiotika-Empfindlichkeit der In-vitro-Zweitschritt-Mutanten zu sein.

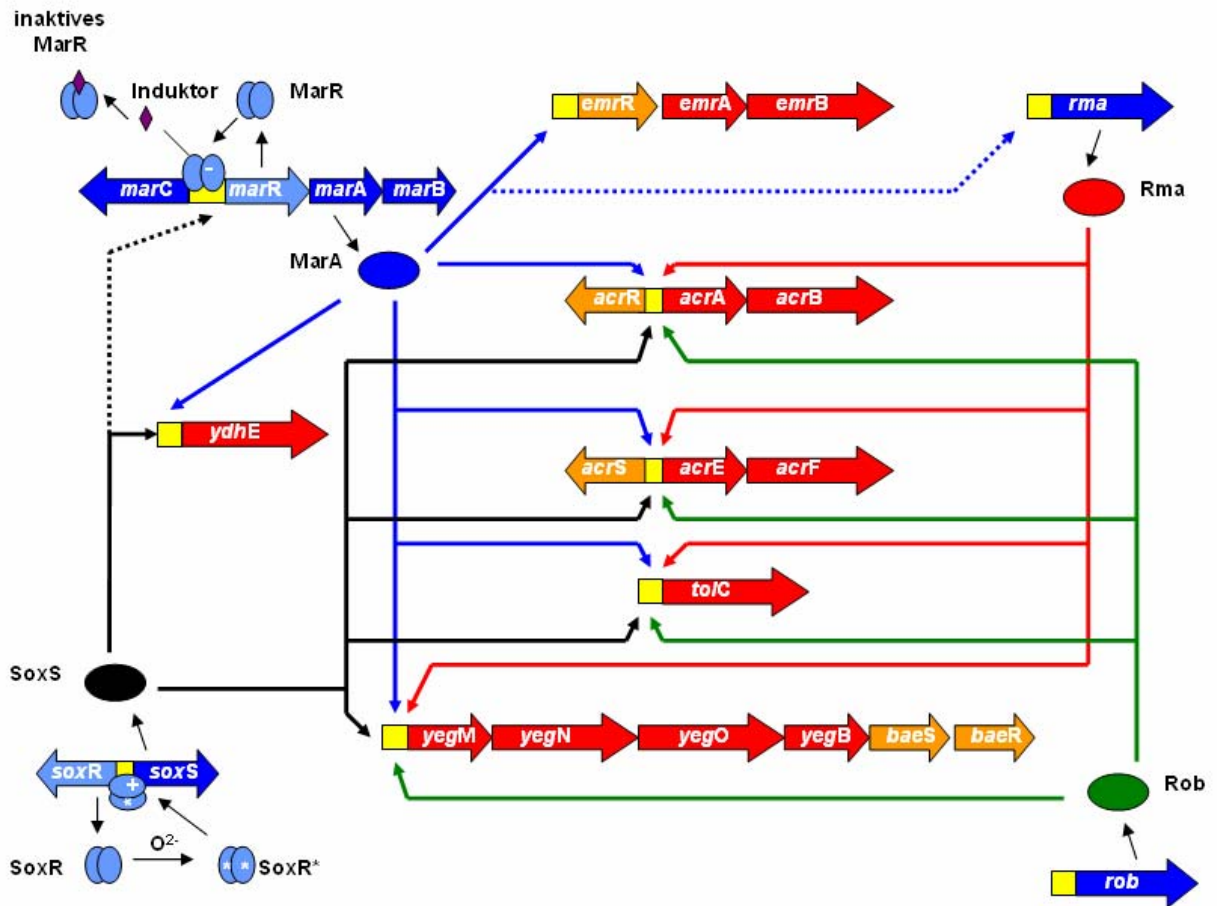


Abb. 4.1: Modell der Regulation ausgewählter Effluxpumpen, die in *Salmonella* spec. an der Sekretion von Fluorchinolonen beteiligt sind. Gelb dargestellt sind die Promotor- bzw. Operatorregionen, rot unterlegt sind die für die Effluxpumpen kodierenden Gene und blau dargestellt sind die für die globalen Regulatoren MarA, SoxS, Rob und Rma kodierenden Gene. Entsprechend heller (orange bzw. hellblau) sind die lokalen Regulatoren unterlegt. Die durchgezogenen Pfeile verdeutlichen die Aktivierung der Transkription der Effluxpumpengene durch die globalen Regulatoren. Die gestrichelten Pfeile zeigen einen positiven regulatorischen Einfluß von globalen Regulatoren auf andere globale Regulatoren (in Teilen verändert nach Grkovic et al. (101)).

4.6.4 Bedeutung einer erhöhten Expression der Effluxpumpe AcrAB für die Resistenzeigenschaften

Zur Beurteilung des Einflusses einer einzelnen Effluxpumpe, der Pumpe AcrAB, auf den Resistenzphänotyp wurden die Gene *acrA* sowie *acrB* unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren pBAD-Promotors überexprimiert, bevor anschließend die Empfindlichkeiten gegenüber diversen Antibiotika bestimmt wurden. Auf diese Weise sollte zudem die Frage beantwortet werden, welche Antibiotika von der Pumpe AcrAB-TolC aus der Zelle

transportiert werden. Nach der Überexpression der Effluxpumpe *acrAB* war bei *S. Hadar* gegenüber allen untersuchten Antibiotika der verschiedenen Substanzklassen, mit Ausnahme der Makrolide, eine Verringerung der Empfindlichkeit von 3 - 4 Verdünnungsstufen zu beobachten (siehe Tab. 3.29). AcrAB-TolC transportiert in *Salmonella spec.* demnach Fluorchinolone, Chloramphenicol, Novobiocin sowie Tetracyclin. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch die Experimente von Baucheron et al. (27), die zeigten, dass die Resistenz gegenüber Fluorchinolonen, Chloramphenicol und Tetracyclin in *S. Typhimurium* DT104 auf der Aktivität der Effluxpumpe AcrAB-TolC beruht. Nach Literaturangaben werden auch die Makrolide sowohl in *E. coli* (49) als auch in *Salmonella spec.* (24) von AcrAB-TolC transportiert. Ursache für die, im Rahmen dieser Arbeit ermittelten, unveränderten MHK-Werte der Makrolide nach Überexpression von *acrAB* ist die natürliche Resistenz von *Salmonella spec.* gegenüber Makroliden. Offenbar gelangen aufgrund der äußeren Membran als Permeationsbarriere so wenige Moleküle in die Zelle, dass eine erhöhte Expression von AcrAB zu keiner weiteren Erhöhung der Resistenz führt.

Die Verringerung der Antibiotika-Empfindlichkeit nach alleiniger Überexpression von *acrAB* war ähnlich hoch (3 - 4 Verdünnungsstufen) wie nach Überexpression des globalen Regulatorgens *rma*, welche zu einer erhöhten Expression der RND-Effluxpumpen AcrAB-TolC, AcrEF-TolC und YegMNO-TolC geführt hat. Diese Beobachtung bestätigt die Experimente von Lee et al. (158), die für *E. coli* und *Pseudomonas spec.* aussagen, dass die simultane Expression mehrerer Effluxpumpen desselben Typs (hier der RND-Familie), im Vergleich zu der erhöhten Expression einer einzelnen Effluxpumpe, keine deutliche Verringerung der Empfindlichkeit bedeutet. Bei den RND-Pumpen AcrAB, AcrEF und YegMNO liegt die Ursache vermutlich darin, dass sich alle drei Pumpenproteine mit dem in der äußeren Membran lokalisierten Porin TolC zu Effluxpumpen verbinden, die den Transport über beide Zellmembranen gramnegativer Bakterien gewährleisten (siehe 1.4.1). Die verstärkte Expression einer Effluxpumpe kann demnach zu erhöhtem Efflux von Antibiotika aus der Zelle, und damit einer erniedrigten Empfindlichkeit führen, jedoch nur bis zu einem gewissen Maße, was durch die begrenzte Anzahl von TolC in der äußeren Membran vorgegeben wird. Der Einbau zu vieler Porinmoleküle in die äußere Membran würde vermutlich zu einer Destabilisierung der Lipiddoppelschicht führen.

Die Ergebnisse der Überexpressionsexperimente verdeutlichen, dass durch Überexpression von Effluxpumpengenen nur ein bestimmtes Niveau an Antibiotika-Unempfindlichkeit erreicht werden kann. Wie bereits beobachtet wurde, entsteht ein hohes Resistenz-Niveau in *Salmonella spec.* zumeist durch die Kombination von erhöhtem *multidrug* Efflux und dem Auftreten von Target-Mutationen. Baucheron et al. (25) beschrieben verschiedene hochresistente *S. Typhimurium* DT204-Stämme, die zwei

Mutationen in der QRDR von *gyrA*, sowie je eine Mutation in *gyrB* und *parC* aufwiesen und zudem eine erhöhte Expression der Effluxpumpe AcrAB zeigten.

Das Auftreten von erhöhtem Efflux stellt bei der Resistenzentwicklung vor allem deswegen ein schwerwiegendes Problem dar, weil Bakterienzellen, die über erhöhten Efflux verfügen, in Gegenwart von Antibiotika einen Überlebensvorteil aufweisen und so mit höherer Wahrscheinlichkeit Target-Mutationen erwerben. Diese Überlegung wird auch durch die Experimente von Ricci et al. (254) belegt, welche die Schwierigkeit betonen in Abwesenheit von AcrB und TolC Ciprofloxacin-resistente *S. Typhimurium*-Stämme zu selektieren.

4.7 Expression von Regulatoren sowie der Effluxpumpe AcrAB in klinischen Isolaten von *Salmonella spec.*

Um zu untersuchen, ob die in den In-vitro-Mutanten beobachtete erhöhte Expression von Regulatoren und Effluxpumpen (siehe 3.6.3 - 4) auch in klinischen Isolaten von *Salmonella spec.* auftritt und eine mögliche Bedeutung bei der Ausbildung des entsprechenden Resistenzphänotyps hat, wurde das Transkriptmuster ausgewählter Regulator- und Effluxpumpengene verschiedener Stämme mittels real-time PCR bestimmt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Expression des globalen Regulatorgens *rma* gerichtet, da die Expression dieses Gens in den Zweitschritt-Mutanten aus den Selektionsexperimenten (BII, CII, DIIa, DIb-4a-2) eine starke Aufregulation von > 40-fach zeigte (siehe 3.6.4). Untersucht wurde die Expression der Regulatorgene *rma* und *marA* sowie die des Effluxpumpengens *acrA*.

Die Stämme *S. Typhimurium* DT204c (1) und *S. Typhimurium* DT104 (4) zeigten eine im Bereich von 2 - 3-fach verringerte Expression der untersuchten Gene *rma*, *marA* und *acrA*. Bei den übrigen Stämmen war eine deutlich erhöhte Expression des Regulatorgens *rma* (bis zu etwa 16-fach bei *S. Hadar* (7)) zu erkennen. Die Expression des Regulatorgens *marA* war nicht erhöht. Die Expression des die Effluxpumpe AcrAB repräsentierenden Gens *acrA* war nur geringfügig erhöht (siehe Abb. 3.24 und Tab. 3.31). Wie die In-vitro-Mutanten, so zeigen auch fünf der sieben untersuchten klinischen Isolate von *Salmonella spec.* eine deutlich erhöhte Expression des Regulatorgens *rma* sowie eine, wahrscheinlich dadurch hervorgerufene, vergleichsweise geringere Aufregulation von *acrA*. Dem Regulator Rma kommt in *Salmonella spec.* in Bezug auf die *multidrug* Efflux-vermittelte Resistenz offenbar eine größere Bedeutung zu als bisher angenommen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt kam unter den globalen Regulatoren, hinsichtlich der Aktivierung von Effluxpumpen, MarA die größte Bedeutung zu (152, 247, 285). Ursächlich dafür ist die Beobachtung, dass in Antibiotika-resistenten Isolaten von *E. coli* häufig

Mutationen in *marR* bzw. *marO* für den Resistenzphänotyp verantwortlich gemacht werden konnten (13, 53, 210, 214, 302). In *Salmonella spec.* wurden Mutationen in regulatorischen Genen des *mar*-Operons, die zu erhöhter Antibiotika-Unempfindlichkeit führen jedoch nicht detektiert. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass Rma, für das in *E. coli* kein Homolog existiert, in *Salmonella spec.* offenbar eine bedeutendere Rolle spielt als MarA. Sowohl in In-vitro-Mutanten als auch in klinischen Isolaten von *Salmonella spec.* hat Rma einen stärkeren Einfluß auf die Expression der Effluxpumpengene als MarA, dessen Genexpression in den Zweitschritt-Mutanten aus dem Selektionsexperiment nur geringfügig erhöht und in den klinischen Isolaten unverändert ist. Wie die *rma*-Überexpressionsexperimente (siehe 3.6.6.2) zeigten, wird von diesem Regulator, neben der Expression von *acrAB*-tolC, auch die Expression weiterer Effluxpumpengene wie *acrEF*-tolC und *yegMNO*-tolC aktiviert. Es ist daher anzunehmen, dass die Expression weiterer Effluxpumpen auch in den untersuchten klinischen Isolaten erhöht ist. In den klinischen Isolaten beruht die erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin (siehe Tab. 3.30) und weiteren Fluorchinolonen (Norfloxacin, Moxifloxacin, Ofloxacin, Levofloxacin) sowie Tetracyclin (Daten nicht gezeigt) offenbar auf einer Kombination aus Target-Mutationen (im Falle der Fluorchinolone) und erhöhtem Efflux. Das Zusammenwirken von Target-Mutationen und erhöhter Expression verschiedener Effluxpumpengene, wie *acrAB*, *acrEF*, *emrAB*, *yegMNO* und *mdlB*, bei der Verringerung der Empfindlichkeit von *Salmonella spec.* gegenüber Fluorchinolonen und anderen Antibiotika wurde u. a. auch von Chen et al. (46) beschrieben.

Auffällig waren die Expressionswerte der Stämme *S. Typhimurium* DT204c (1) sowie *S. Typhimurium* DT104 (4), die eine verringerte Transkription der untersuchten Gene zeigten. Da über die Regulation des globalen Regulators Rma bis zum jetzigen Zeitpunkt nichts bekannt ist, ist die Ursache für die verringerte Expression von *rma* nicht zu erklären. Zudem ist unbekannt, über welche Mutationen die Stämme möglicherweise noch verfügen. Die erniedrigte Expression des Effluxpumpengens *acrA* resultiert vermutlich aus der verringerten Aktivität des Regulators Rma.

Der MHK-Wert für Ciprofloxacin (0,5 µg/ml) des Stammes *S. Typhimurium* DT204c (1) beruht offenbar einzig auf der Mutation in *gyrA* (S83). Die beschriebenen Werte für Empfindlichkeiten gegenüber Ciprofloxacin in Stämmen der Spezies *Salmonella*, die ausschließlich eine *gyrA*-Mutation tragen, liegen je nach Stamm und Herkunft (Selektionsexperiment, klinisches oder veterinärmedizinisches Isolat) zwischen 0,125 und 1 µg/ml (98, 99, 233, 252). Die Erstschrift-Mutanten aus den Selektionsexperimenten (siehe Tab. 3.1) weisen ebenfalls MHK-Werte für Ciprofloxacin von 0,5 µg/ml auf.

Die erhöhte Unempfindlichkeit des Stammes *S. Typhimurium* DT104 (4) gegenüber Ciprofloxacin ist nachweislich nicht auf eine Mutation in den Targetgenen zurückzuführen (siehe Tab. 3.30). Erhöhter Efflux scheint aber aufgrund der Ergebnisse der real-time PCR ebenfalls nicht die Ursache für den veränderten Phänotyp zu sein. Möglicherweise beruht die erhöhte Antibiotika-Unempfindlichkeit des betroffenen Stammes auf verringertem Influx. Ursächlich für verringerten Influx kann z. B. die Interaktion der *micF*-mRNA mit der *ompF*-mRNA sein, welche die Biosynthese des Porins inhibiert (siehe 1.3.4). Auch eine veränderte Lipopolysaccharid-Schicht kann zu einer verringerten Empfindlichkeit führen, wie es z. B. für Trimethoprim-resistente veterinärmedizinische Isolate von *Salmonella* spec. beschrieben wurde (99). Denkbar wäre auch, dass der betroffene Stamm über ein Plasmid verfügt, welches ein für Qnr kodierendes Gen trägt. Bei Qnr handelt es sich um ein Protein, das die Gyrase vor der Inhibition durch Fluorchinolone schützt (siehe 1.3.3).

4.8 Ausblick

Diese Arbeit sollte zu der Beantwortung der Frage nach der Entstehung Efflux-vermittelter Fluorchinolon-Resistenz in *Salmonella* spec. beitragen. Anhand von In-vitro-Mutanten sowie von klinischen Isolaten sollte untersucht werden, welche Effluxpumpen bzw. Regulatoren aufgrund erhöhter Genexpression zu einer Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika führen. Zudem sollte die Frage nach der Regulation dieser Effluxpumpen auf globaler Ebene in *Salmonella* spec. beantwortet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels real-time PCR ausschließlich die Genexpression untersucht. Es liegen keine Informationen über mögliche posttranskriptionale Prozesse, die Proteinbiosynthese bzw. die Funktionsfähigkeit der Proteine vor. Daher wäre es wünschenswert, das Vorhandensein und die Menge der einzelnen Proteine, z. B. mittels Western-Blots, nachzuweisen.

Von den globalen Regulatoren zeigte Rma sowohl in den In-vitro-Mutanten als auch in den klinischen Isolaten die stärkste Aufregulation der Genexpression. Dieser Regulator, für den kein Homolog in *E. coli* existiert, scheint bei der Regulation von Effluxpumpen in *Salmonella* spec. eine zentrale Position einzunehmen. Daher wäre es von großem Interesse, die Regulation der *rma*-Expression aufzuklären. Da sich in dem unmittelbaren genomischen Kontext von *rma* kein potentieller Regulator befindet, handelt es sich vermutlich um einen übergeordneten Regulator, der an anderer Stelle im Genom lokalisiert ist. Zur Identifizierung dieses Regulators könnte eine *shotgun*-Klonierung durchgeführt werden. Allerdings bestünde mit dieser Methode nur die Möglichkeit einen positiven Transkriptionsaktivator zu identifizieren. Ein negativer Regulator, der aufgrund

einer Mutation weniger effizient bindet und so eine verstärkte Expression von *rma* zulässt, könnte auf diesem Wege nicht aufgefunden werden. Eine alternative Möglichkeit zur Untersuchung der Regulation von Rma wäre, die Durchführung einer Insertionsmutagenese. Durch z. B. Transposon-Mutagenese und anschließendes Screening auf eine erhöhte Expression von *rma*, könnte auch ein negativer Regulator detektiert werden. Das Screening auf erhöhte *rma*-Expression könnte z. B. mittels eines Reportersystems erfolgen, welches den Promotor des *rma*-Gens und eine β -Laktamase als Reportergen trägt. Somit würde der *knock-out* eines relevanten Repressors zur Aktivierung von *rma* führen, was über Ampicillin-Resistenz detektiert werden könnte. In diesem resistenten Stamm müsste anschließend nur der Genlocus der Insertion bestimmt werden.

Mögliche Regulatoren könnten auch mit Hilfe von Sequenz-Alignments bekannter Transkriptionsregulatoren gegen das *Salmonella*-Genom identifiziert werden.

Interessant wäre zudem die Identifizierung weiterer über Rma regulierter Gene. Dazu würde sich am besten ein globaler Ansatz mittels Microarray-Technologie eignen. Verglichen werden könnten ein *rma*-überexprimierender Stamm und ein entsprechender Wildtypstamm. Auf diese Weise könnten auch weitere Informationen über die Regulons der globalen Regulatoren MarA, SoxS und Rob gesammelt werden. Alternativ könnte auch die Methode der 2D-Gel-Elektrophorese gewählt werden, um mit Hilfe eines globalen Ansatzes Unterschiede in der Proteinexpression nach verstärkter Expression einzelner Regulatoren zu ermitteln.

Eine Fortsetzung der Untersuchung der Expression von Effluxpumpen und ihrer Regulation durch globale Regulatoren in Antibiotika-unempfindlichen Stämmen ist von großem Interesse für das Verständnis der Resistenzentwicklung bzw. -vermeidung bei *Salmonella spec.* sowie für die Entwicklung neuer auf der Ebene des bakteriellen Effluxes wirksamen Chemotherapeutika.

5. Zusammenfassung

Gastrointestinale Infektionskrankheiten, die durch Mikroorganismen der Gattung *Salmonella* verursacht werden, gehören weltweit zu den häufigsten bakteriellen Erkrankungen. Zur Therapie werden vor allem Fluorchinolone als Inhibitoren der bakteriellen Topoisomerasen eingesetzt. Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen entstehen durch Mutationen in den Targetgenen *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE*, welche für die Untereinheiten der Topoisomerase II und IV kodieren. Darüber hinaus führt eine verringerte Akkumulation, durch reduzierten Influx oder erhöhten Efflux, der Antibiotika in der Zelle zu einer verringerten Empfindlichkeit.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Beitrag geleistet werden zu der Beantwortung der Frage nach der Entstehung Efflux-vermittelter Fluorchinolon-Resistenz in *Salmonella* spec. Anhand von In-vitro-Mutanten sowie von klinischen Isolaten sollte untersucht werden welche Effluxpumpen bzw. Regulatoren, nach erhöhter Genexpression, zu einer Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika beitragen. Darüber hinaus sollte die Frage beantwortet werden wie in *Salmonella* spec. die Regulation dieser Effluxpumpen auf globaler Ebene stattfindet.

Zunächst wurden In-vitro-Zweitschritt-Mutanten, welche aus einem Selektionsversuch mit Fluorchinolonen hervorgegangen sind, näher charakterisiert. (1.) Die MHK-Werte der Fluorchinolone und von Chloramphenicol waren im Vergleich zu den Werten der Erstschrift-Mutanten erhöht und sanken in Anwesenheit eines Effluxpumpeninhibitors deutlich ab, woraus sich die Hypothese ergab, dass erhöhter Efflux in diesen Stämmen für die verringerte Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika verantwortlich ist. (2.) Die Sequenzanalysen der lokalen Regulatoren *acrR* und *soxR*, des globalen Regulators *rma* sowie von Teilen der Effluxpumpe *acrAB* ergaben keine Unterschiede zwischen Wildtypen, Erstschrift- und Zweitschrift-Mutanten. Daraus ließ sich folgern, dass andere genetische Veränderungen in den Zweitschrift-Mutanten für die verringerte Antibiotika-Empfindlichkeit verantwortlich sein müssen. (3.) Die Bestimmung der Generationszeiten ergab eine leichte Erhöhung in den Erstschrift-Mutanten, aufgrund der Target-Mutationen, sowie eine geringe Erniedrigung in den Zweitschrift-Mutanten. Demnach führt die genetische Veränderung, die in den Zweitschrift-Mutanten aufgetreten ist, zu einer geringen Fitnesskompensation.

Anschließend wurde versucht, mittels eines globalen Ansatzes, der Erstellung einer chromosomalen Genbank einer In-vitro-Zweitschrift-Mutante, einen möglichen, für die Verringerung der Antibiotika-Empfindlichkeiten verantwortlichen, positiven Regulator oder eine Effluxpumpe zu identifizieren.

Zur gezielten Untersuchung der Expression für Effluxpumpen bzw. globale Regulatoren kodierender Gene mittels quantitativer real-time PCR wurden mögliche Kandidaten

anhand von Aminosäure-Sequenzalignments ausgewählt. In den Zweitschritt-Mutanten von *S. Hadar* und *S. Typhimurium* war die Expression der RND-Effluxpumpen AcrAB-TolC, AcrEF-TolC und YegMNO-TolC im Vergleich zu dem entsprechenden Wildtyp deutlich erhöht. In den Stämmen von *S. Hadar* konnte zudem eine Expressionssteigerung der MATE-Effluxpumpe YdhE beobachtet werden. Ursächlich für die Expressionserhöhung der genannten Effluxpumpen ist die in allen Stämmen beobachtete starke Aufregulation des Regulorgens *rma*. In klinischen Isolaten von *Salmonella spec.*, die erhöhte Unempfindlichkeiten gegenüber verschiedenen Antibiotika zeigten, wurde ebenfalls eine deutliche Expressionserhöhung von *rma* beobachtet.

Eine weitere allgemeinere Frage war die nach der Regulation von Effluxpumpen in *Salmonella spec.* auf globaler Ebene. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Induktions- bzw. Überexpressionsexperimente durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass eine Auswahl strukturell unterschiedlicher Fluorchinolone keine induzierende Wirkung auf die Expression des Effluxpumpengens *acrA* sowie des Regulorgens *marA* hat. Die Fluorchinolone als Substrate der Effluxpumpen führen demnach weder direkt, noch indirekt über eine Veränderung des Superspiralisierungsgrades zu einer verstärkten Pumpen- bzw. Regulatorenexpression. Zudem wurde gezielt die Expression der globalen Regulatoren MarA, SoxS, Rob sowie Rma gesteigert, um die als Folge dessen veränderte Expression von Effluxpumpen und Regulatoren zu bestimmen. Die RND-Pumpen AcrAB-TolC, AcrEF-TolC und YegMNO-TolC werden über jeden der vier globalen Regulatoren angesprochen. MarA reguliert zudem positiv die Expression von *emrAB* (MFS-Familie), *ydhE* (MATE-Familie) und offenbar auch die des globalen Regulorgens *rma*, während SoxS zusätzlich positiv auf die Expression von *ydhE* und *marA* einwirkt. Phänotypisch führte die Überexpression der Regulorgene *rma* und *rob* zu deutlich verringerten Empfindlichkeiten gegenüber verschiedenen Antibiotika.

Zusammenfassend verdeutlichen diese Überexpressions- und Induktionsversuche, dass die Kontrolle von Effluxpumpen in *Salmonella spec.* einer sehr komplexen Regulation unterliegt, an der ein Netzwerk von Regulatoren beteiligt ist. Dem globalen Regulator Rma scheint dabei in *Salmonella spec.* eine wesentlichere Rolle zuzukommen als bisher angenommen wurde. Besonders die Ergebnisse aus den Versuchen mit den In-vitro-Mutanten deuten darauf hin, dass eine übergeordnete Kontrolle existiert, die Einfluss auf die Expression der globalen Regulatoren nimmt.

Diese Untersuchungen zur Regulation von Effluxpumpen in Antibiotika-unempfindlichen Stämmen sind von großem Interesse für das Verständnis der Resistenzentwicklung bzw. -vermeidung bei *Salmonella spec.* sowie für die Entwicklung neuer, auf der Ebene des bakteriellen Effluxes wirksamen, Chemotherapeutika.

Summary

Gastrointestinal infectious diseases, caused by salmonellae, belong to the most frequent bacterial diseases throughout the world. To combat those infections especially fluoroquinolones, as inhibitors of bacterial topoisomerases, are applied. Resistance to fluoroquinolones develops through mutations in the target genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE*, which encode the subunits of topoisomerases II and IV. Additionally decreased accumulation of the antibiotics in the cell, via reduced influx or increased efflux, leads to decreased susceptibilities.

Within this paper a contribution should be made to answer the issue of the development of efflux mediated fluoroquinolone resistance in *Salmonella* spec. On the basis of *in vitro* mutants as well as clinical isolates it should be analysed which efflux pumps and regulators contribute to decreased susceptibilities to various antibiotics. Additionally the issue was addressed how these efflux pumps are regulated globally.

First of all second step mutants, selected on fluoroquinolones, were characterised. (1.) MIC-values of fluoroquinolones and of chloramphenicol were increased compared to the first step selection mutants, and decreased in the presence of an efflux pump inhibitor. Hence it was hypothesised that enhanced efflux is responsible for the decreased susceptibilities to various antibiotics in these strains. (2.) Sequence analyses of local regulator genes *acrR* and *soxR*, of global regulator gene *rma* as well as of parts of the efflux pump genes *acrAB* showed no differences between wildtypes, first and second step selection mutants. Obviously other genetic alterations are responsible for decreased antibiotic susceptibilities in the second step selection mutants. (3.) Determination of doubling times showed a slight increase in the first step selection mutants, due to mutations in the target genes, and a minor decrease in the second step selection mutants. Thus the mutation, which occurred in the second selection step leads to a marginal fitness compensation.

Subsequently it was tried to identify a putative positive regulator or an efflux pump, which might be responsible for the decreased antibiotic susceptibilities, via chromosomal shotgun-cloning.

For selective determination of gene expression of efflux pumps and global regulators, using quantitative real-time PCR, possible candidates were chosen on the basis of amino acid sequence alignments. Second step selection mutants of *S. Hadar* and *S. Typhimurium* showed considerably increased expression of RND-type efflux pumps AcrAB-TolC, AcrEF-TolC and YegMNO-TolC compared to the respective wildtypes. The *S. Hadar* strains also showed increased expression of the MATE-type efflux pump YdhE. Responsible for the mentioned increases in efflux pump expression is the considerable upregulation of the global regulator gene *rma*. In clinical isolates of *Salmonella* spec.,

which displayed enhanced resistance to various antibiotics, an obvious increase in *rma* expression has also been observed.

Another issue was the global regulation of efflux pumps in *Salmonella* spec. To answer this question induction- and overexpression experiments have been performed. It was shown that various structurally diverse fluoroquinolones did not lead to any expression change of the efflux pump gene *acrA* and the global regulator gene *marA* respectively. Thus fluoroquinolones, as substrates of efflux pumps, do not lead to an increase in efflux pump or regulator expression, neither directly nor via a change in the supercoiling degree. Additionally the expression of global regulators MarA, SoxS, Rob and Rma has been enhanced specifically to determine resulting expression changes of efflux pump and regulator genes. The RND-type efflux pumps AcrAB-TolC, AcrEF-TolC and YegMNO-TolC are addressed via each of the above mentioned global regulators. MarA additionally activates the expression of *emrAB* (MFS-family), *ydhE* (MATE-family) and obviously also the expression of the global regulator *rma*, whereas SoxS moreover positively affects the expression of *ydhE* and *marA*. Phenotypically the overexpression of the global regulator genes *rma* and *rob* led to considerably decreased susceptibilities to various antibiotics.

Recapitulating these overexpression- and induction experiments point out that the control of efflux pumps in *Salmonella* spec. is subjected to a complex regulatory network to which various regulators contribute. Thereby the global regulator Rma seems to play a more fundamental role than previously thought. Especially the findings from the experiments with the *in vitro* mutants indicate that a superior regulator exists which controls the expression of the global regulators.

These investigations concerning the regulation of efflux pumps in unsusceptible strains are of major interest for understanding resistance development and avoidance in *Salmonella* spec. as well as the development of new chemotherapeutics, which act on the level of bacterial efflux.

6. Literatur

1. **Abu Mraheil, M.** 2004. Entwicklung eines molekularbiologischen Testsystems zum Nachweis von Inhibitoren bakterieller Topoisomerasen, deren Wirkung und des DNA-Superspiralisierungsgrades *in vivo*. Dissertation. Universität Hamburg.
2. **Ackermann, G., R. Schaumann, B. Pless, M. C. Claros, E. J. Goldstein, and A. C. Rodloff.** 2000. Comparative activity of moxifloxacin *in vitro* against obligately anaerobic bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:228-232.
3. **Aires, J. R. and H. Nikaido.** 2005. Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:1923-1929.
4. **Alexandre, V., A. Urios, G. Herrera, and M. Blanco.** 1989. New *Escherichia coli* *gyrA* and *gyrB* mutations which have a graded effect on DNA supercoiling. *Mol. Gen. Genet.* **219**:306-312.
5. **Alekshun, M. N. and S. B. Levy.** 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2067-2075.
6. **Alekshun, M. N. and S. B. Levy.** 1999. Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli* *marRAB* locus, by multiple chemicals *in vitro*. *J. Bacteriol.* **181**:4669-4672.
7. **Alekshun, M. N., S. B. Levy, T. R. Mealy, B. A. Seaton, and J. F. Head.** 2001. The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **8**:710-714.
8. **Andersen, J., S. A. Forst, K. Zhao, M. Inouye, and N. Delihass.** 1989. The function of *micF* RNA. *micF* RNA is a major factor in the thermal regulation of *OmpF* protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**:17961-17970.
9. **Anderson, V. E., T. D. Gootz, and N. Osheroff.** 1998. Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action. *J. Biol. Chem.* **273**:17879-17885.
10. **Andersson, M. I. and A. P. MacGowan.** 2003. Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:1-11.
11. **Aono, R., N. Tsukagoshi, and M. Yamamoto.** 1998. Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the *mar-sox* regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **180**:938-944.
12. **Argos, L., A. Landy, A. Abremski, et al.** 1986. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J.* **5**:433-440.
13. **Ariza, R. R., S. P. Cohen, N. Bachhawat, S. B. Levy, and B. Dimple.** 1994. Repressor mutations in the *marRAB* operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**:143-148.
14. **Ariza, R. R., Z. Li, N. Ringstad, and B. Dimple.** 1995. Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein. *J. Bacteriol.* **177**:1655-1661.
15. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl.** 1988. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.
16. **Avila-Sakar, A. J., S. Misaghi, E. M. Wilson-Kubalek, K. H. Downing, H. Zgurskaya, H. Nikaido, and E. Nogales.** 2001. Lipid-layer crystallization and preliminary three-dimensional structural analysis of AcrA, the periplasmic component of a bacterial multidrug efflux pump. *J. Struct. Biol.* **136**:81-88.
17. **Bagel, S., V. Hullen, B. Wiedemann, and P. Heisig.** 1999. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:868-875.

18. **Balakrishnan, L., C. Hughes, and V. Koronakis.** 2001. Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **313**:501-510.
19. **Ball, P.** 2000. Moxifloxacin (Avelox): an 8-methoxyquinolone antibacterial with enhanced potency. *Int. J. Clin. Pract.* **54**:329-332.
20. **Baranova, N. and H. Nikaido.** 2002. The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J. Bacteriol.* **184**:4168-4176.
21. **Barbosa, T. M. and S. B. Levy.** 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist.* **3**:303-311.
22. **Barnass, S., J. Franklin, and S. Tabaqchali.** 1990. The successful treatment of multiresistant nonenteric salmonellosis with seven day oral ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* **25**:299-300.
23. **Barrett, J. F., T. D. Gootz, P. R. McGuirk, C. A. Farrell, and S. A. Sokolowski.** 1989. Use of in vitro topoisomerase II assays for studying quinolone antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1697-1703.
24. **Baucheron, S., E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2004. Role of TolC and parC mutation in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT204. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**:657-659.
25. **Baucheron, S., H. Imberechts, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2002. The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage type DT204. *Microb. Drug Resist.* **8**:281-289.
26. **Baucheron, S., C. Mouline, K. Praud, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2005. TolC but not AcrB is essential for multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium colonization of chicks. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:707-712.
27. **Baucheron, S., S. Tyler, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2004. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3729-3735.
28. **Begley, M., C. G. Gahan, and C. Hill.** 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:625-651.
29. **Behra-Miellet, J., L. Dubreuil, and E. Jumas-Bilak.** 2002. Antianaerobic activity of moxifloxacin compared with that of ofloxacin, ciprofloxacin, clindamycin, metronidazole and beta-lactams. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **20**:366-374.
30. **Bergmans, H. E., I. M. van Die, and W. P. Hoekstra.** 1981. Transformation in *Escherichia coli*: stages in the process. *J. Bacteriol.* **146**:564-570.
31. **Birnboim, H. C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
32. **Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, and H. W. Boyer.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.
33. **Borges-Walmsley, M. I., J. Beauchamp, S. M. Kelly, K. Jumel, D. Candlish, S. E. Harding, N. C. Price, and A. R. Walmsley.** 2003. Identification of oligomerization and drug-binding domains of the membrane fusion protein EmrA. *J. Biol. Chem.* **278**:12903-12912.
34. **Borges-Walmsley, M. I., K. S. McKeegan, and A. R. Walmsley.** 2003. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.* **376**:313-338.
35. **Brandis, H., W. Köhler, H. J. Eggers, and G. Pulverer.** 1994. *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie.* Gustav Fischer Verlag.
36. **Brazas, M. D. and R. E. Hancock.** 2005. Ciprofloxacin induction of a susceptibility determinant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3222-3227.

37. **Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan.** 2000. Salmonella nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2465-2467.
38. **Brooun, A., J. J. Tomashek, and K. Lewis.** 1999. Purification and ligand binding of EmrR, a regulator of a multidrug transporter. *J. Bacteriol.* **181**:5131-5133.
39. **Brown, J. C., C. J. Thomson, and S. G. Amyes.** 1996. Mutations of the *gyrA* gene of clinical isolates of *Salmonella typhimurium* and three other *Salmonella* species leading to decreased susceptibilities to 4-quinolone drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**:351-356.
40. **Buckley, A. M., M. A. Webber, S. Cooles, L. P. Randall, R. M. La Ragione, M. J. Woodward, and L. J. Piddock.** 2006. The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol.* **8**:847-856.
41. **Bustin, S. A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**:169-193.
42. **Cabral, J. H., A. P. Jackson, C. V. Smith, N. Shikotra, A. Maxwell, and R. C. Liddington.** 1997. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature* **388**:903-906.
43. **Cambau, E. and L. Gutmann.** 1993. Mechanisms of resistance to quinolones. *Drugs* **3**:15-23.
44. **Cebrian, L., I. Escribano, J. C. Rodriguez, and G. Royo.** 2006. Alterations in the *gyrA* and *parC* Genes in *Salmonella* spp. Following In Vitro Exposure to Fluoroquinolones. *J. Chemother.* **18**:250-254.
45. **Chen, J., Y. Morita, M. N. Huda, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya.** 2002. VmrA, a member of a novel class of Na(+)-coupled multidrug efflux pumps from *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **184**:572-576.
46. **Chen, S., S. Cui, P. F. McDermott, S. Zhao, D. G. White, I. Paulsen, and J. Meng.** 2007. Contribution of Target Gene Mutations and Efflux to Decreased Susceptibility of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to Fluoroquinolones and Other Antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:535-542.
47. **Cherepanov, P. P. and W. Wackernagel.** 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**:9-14.
48. **Chollet, R., J. Chevalier, C. Bollet, J. M. Pages, and A. Davin-Regli.** 2004. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2518-2523.
49. **Chollet, R., J. Chevalier, A. Bryskier, and J. M. Pages.** 2004. The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3621-3624.
50. **Chu, C., L. H. Su, C. H. Chu, S. Baucheron, A. Cloeckaert, and C. H. Chiu.** 2005. Resistance to fluoroquinolones linked to *gyrA* and *parC* mutations and overexpression of *acrAB* efflux pump in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. *Microb. Drug Resist.* **11**:248-253.
51. **Clarke, L. and J. Carbon.** 1992. A colony bank containing synthetic ColEI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. 1976. *Biotechnology* **24**:179-187.
52. **Cloeckaert, A. and E. Chaslus-Dancla.** 2001. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. *Vet. Res.* **32**:291-300.
53. **Cohen, S. P., H. Hachler, and S. B. Levy.** 1993. Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:1484-1492.
54. **Cohen, S. P., D. C. Hooper, J. S. Wolfson, K. S. Souza, L. M. McMurry, and S. B. Levy.** 1988. Endogenous active efflux of norfloxacin in susceptible *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:1187-1191.

55. **Cohen, S. P., S. B. Levy, J. Foulds, and J. L. Rosner.** 1993. Salicylate induction of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: activation of the *mar* operon and a *mar*-independent pathway. *J. Bacteriol.* **175**:7856-7862.
56. **Cohen, S. P., L. M. McMurry, D. C. Hooper, J. S. Wolfson, and S. B. Levy.** 1989. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (*Mar*) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1318-1325.
57. **D'Aoust, J. Y.** 1985. Infective dose of *Salmonella typhimurium* in cheddar cheese. *Am. J. Epidemiol.* **122**:717-720.
58. **Dagert, M. and S. D. Ehrlich.** 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene.* **6**:23-28.
59. **Datsenko, K. A. and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6640-6645.
60. **Delibas, N. and S. Forst.** 2001. *MicF*: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *J. Mol. Biol.* **313**:1-12.
61. **Demple, B.** 1996. Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* *soxRS* oxidative stress regulon-a review. *Gene.* **179**:53-57.
62. **Dinh, T., I. T. Paulsen, and M. H. Saier, Jr.** 1994. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **176**:3825-3831.
63. **Domagala, J. M., L. D. Hanna, C. L. Heifetz, M. P. Hutt, T. F. Mich, J. P. Sanchez, and M. Solomon.** 1986. New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *J. Med. Chem.* **29**:394-404.
64. **Dong, Y., C. Xu, X. Zhao, J. Domagala, and K. Drlica.** 1998. Fluoroquinolone action against mycobacteria: effects of C-8 substituents on growth, survival, and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2978-2984.
65. **Dorman, C. J.** 1991. DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infect. Immun.* **59**:745-749.
66. **Dorman, C. J.** 1995. DNA topology and the global control of bacterial gene expression: implications for the regulation of virulence gene expression. *Microbiology* **141**:1271-1280.
67. **Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale.** 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**:6127-6145.
68. **Drlica, K.** 1999. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:504-508.
69. **Drlica, K. and X. Zhao.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:377-392.
70. **Eaves, D. J., L. Randall, D. T. Gray, A. Buckley, M. J. Woodward, A. P. White, and L. J. Piddock.** 2004. Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella enterica*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4012-4015.
71. **Elkins, C. A. and L. B. Mullis.** 2007. Substrate Competition Studies Using Whole-Cell Accumulation Assays with the Major Tripartite Multidrug Efflux Pumps of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:923-929.
72. **Elkins, C. A. and H. Nikaido.** 2002. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J. Bacteriol.* **184**:6490-6498.
73. **Ellis, H. M., D. Yu, T. DiTizio, and Court DL.** 2001. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:6742-6746.

74. **Elease, S. H., P. R. McGuirk, T. D. Gootz, M. Moynihan, and N. Osheroff.** 1993. Drug features that contribute to the activity of quinolones against mammalian topoisomerase II and cultured cells: correlation between enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage in vitro and cytotoxic potential. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:2179-2186.
75. **Escribano, I., J. C. Rodriguez, V. Pertegas, L. Cebrian, and G. Royo.** 2006. Relation between induction of the mar operon and cyclohexane tolerance and reduction in fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella* spp. *J. Infect. Chemother.* **12**:177-180.
76. **Fang, F. C., A. Vazquez-Torres, and Y. Xu.** 1997. The transcriptional regulator SoxS is required for resistance of *Salmonella typhimurium* to paraquat but not for virulence in mice. *Infect. Immun.* **65**:5371-5375.
77. **Ferrero, L., B. Cameron, and J. Crouzet.** 1995. Analysis of *gyrA* and *grlA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1554-1558.
78. **Ferrero, L., B. Cameron, B. Manse, D. Lagneaux, J. Crouzet, A. Famechon, and F. Blanche.** 1994. Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol. Microbiol.* **13**:641-653.
79. **Fournier, B., X. Zhao, T. Lu, K. Drlica, and D. C. Hooper.** 2000. Selective targeting of topoisomerase IV and DNA gyrase in *Staphylococcus aureus*: different patterns of quinolone-induced inhibition of DNA synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2160-2165.
80. **Fralick, J. A.** 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:5803-5805.
81. **Frost, J. A., A. Keller, and B. Rowe.** 1996. Increasing ciprofloxacin resistance in salmonellas in England and Wales 1991-1994. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**:85-91.
82. **Furukawa, H., J. T. Tsay, S. Jackowski, Y. Takamura, and C. O. Rock.** 1993. Thiolactomycin resistance in *Escherichia coli* is associated with the multidrug resistance efflux pump encoded by *emrAB*. *J. Bacteriol.* **175**:3723-3729.
83. **Galan, J. E. and R. Curtiss.** 1990. Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect. Immun.* **58**:1879-1885.
84. **Gallardo, F., J. Ruiz, F. Marco, K. J. Towner, and J. Vila.** 1999. Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloramphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance. *J. Med. Microbiol.* **48**:367-374.
85. **Gambino, L., S. J. Gracheck, and P. F. Miller.** 1993. Overexpression of the MarA positive regulator is sufficient to confer multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:2888-2894.
86. **Gaudu, P., N. Moon, and B. Weiss.** 1997. Regulation of the soxRS oxidative stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**:5082-5086.
87. **Gay, K., A. Robicsek, J. Strahilevitz, C. H. Park, G. Jacoby, T. J. Barrett, F. Medalla, T. M. Chiller, and D. C. Hooper.** 2006. Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin. Infect. Dis.* **43**:297-304.
88. **George, A. M., R. M. Hall, and H. W. Stokes.** 1995. Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: a novel gene, *ramA*, confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli*. *Microbiology* **141**:1909-1920.
89. **George, A. M. and S. B. Levy.** 1983. Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol, and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid-determined efflux of tetracycline. *J. Bacteriol.* **155**:531-540.
90. **Ghisalberti, D., M. Masi, J. M. Pages, and J. Chevalier.** 2005. Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**:1113-1118.

91. **Gillespie, S. H., O. J. Billington, A. Breathnach, and T. D. McHugh.** 2002. Multiple drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: evidence for changing fitness following passage through human hosts. *Microb. Drug Resist.* **8**:273-279.
92. **Giraud, E., A. Brisabois, J. L. Martel, and E. Chaslus-Dancla.** 1999. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2131-2137.
93. **Giraud, E., A. Cloeckaert, D. Kerboeuf, and E. Chaslus-Dancla.** 2000. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1223-1228.
94. **Gmuender, H., K. Kuratli, K. Di Padova, C. P. Gray, W. Keck, and S. Evers.** 2001. Gene expression changes triggered by exposure of *Haemophilus influenzae* to novobiocin or ciprofloxacin: combined transcription and translation analysis. *Genome Res.* **11**:28-42.
95. **Gootz, T. D. and K. E. Brighty.** 1996. Fluoroquinolone antibacterials: SAR mechanism of action, resistance, and clinical aspects. *Med. Res. Rev.* **16**:433-486.
96. **Griffith, J. K., M. E. Baker, D. A. Rouch, M. G. Page, R. A. Skurray, I. T. Paulsen, K. F. Chater, S. A. Baldwin, and P. J. Henderson.** 1992. Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**:684-695.
97. **Griffith, K. L., I. M. Shah, and R. E. Wolf, Jr.** 2004. Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (Mar) regulons. *Mol. Microbiol.* **51**:1801-1816.
98. **Griggs, D. J., K. Gensberg, and L. J. Piddock.** 1996. Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1009-1013.
99. **Griggs, D. J., M. C. Hall, Y. F. Jin, and L. J. Piddock.** 1994. Quinolone resistance in veterinary isolates of *Salmonella*. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**:1173-1189.
100. **Grkovic, S., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 2001. Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. *Semin. Cell Dev. Biol.* **12**:225-237.
101. **Grkovic, S., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:671-701.
102. **Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**:4121-4130.
103. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
104. **Hansen, H.** 2000. Bedeutung der Topoisomerase IV für die Chinolonresistenz bei *Salmonella enterica* subspezies *enterica*. Diplomarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
105. **Hansen, H. and P. Heisig.** 2003. Topoisomerase IV mutations in quinolone-resistant salmonellae selected in vitro. *Microb. Drug Resist.* **9**:25-32.
106. **Hartung, M. H.** 2004. Epidemiologische Situation der Zoonosen in Deutschland im Jahr 2003. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR).
107. **Hegde, S. S., M. W. Vetting, S. L. Roderick, L. A. Mitchenall, A. Maxwell, H. E. Takiff, and J. S. Blanchard.** 2005. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science* **308**:1480-1483.
108. **Heisig, P.** 1993. High-level fluoroquinolone resistance in a *Salmonella typhimurium* isolate due to alterations in both *gyrA* and *gyrB* genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **32**:367-377.
109. **Heisig, P.** 1996. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:879-885.

110. **Heisig, P.** 1997. Fluorchinolonecarbonsäuren. *Arzneimitteltherapie* **15**:14-23.
111. **Heisig, P., B. Kratz, E. Halle, Y. Graser, M. Altwegg, W. Rabsch, and J. P. Faber.** 1995. Identification of DNA gyraseA mutations in ciprofloxacin-resistant isolates of *Salmonella typhimurium* from men and cattle in Germany. *Microb. Drug Resist.* **1**:211-218.
112. **Heisig, P. and R. Tschorny.** 1994. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1284-1291.
113. **Helling, R. B., H. M. Goodman, and H. W. Boyer.** 1974. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.* **14**:1235-1244.
114. **Helling, R. B., B. K. Janes, H. Kimball, T. Tran, M. Bundesmann, P. Check, D. Phelan, and C. Miller.** 2002. Toxic waste disposal in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**:3699-3703.
115. **Helms, M., J. Simonsen, and K. Molbak.** 2006. Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. *Clin. Infect. Dis.* **42**:498-506.
116. **Helmuth, R., B. Guerra, B. Malorny, A. Miko, und A. Schroeter.** 2004. Erfassung phänotypischer und genotypischer Resistenzeigenschaften bei *Salmonella*- und *E. coli*-Isolaten vom Tier, Lebensmitteln, Futtermitteln und der Umwelt. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR).
117. **Heurtin-Le Corre, C., P. Y. Donnio, M. Perrin, M. F. Travert, and J. L. Avril.** 1999. Increasing incidence and comparison of nalidixic acid-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype typhimurium isolates from humans and animals. *J. Clin. Microbiol.* **37**:266-269.
118. **Higgins, C. F., C. J. Dorman, D. A. Stirling, L. Waddell, I. R. Booth, G. May, and E. Bremer.** 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**:569-584.
119. **Higgins, M. K., E. Bokma, E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis.** 2004. Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:9994-9999.
120. **Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh, and R. Griffith.** 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* **10**:413-417.
121. **Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson.** 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **11**:1026-1030.
122. **Hill, T. M., B. Sharma, M. Valjavec-Gratian, and J. Smith.** 1997. *sfi*-independent filamentation in *Escherichia coli* is *lexA* dependent and requires DNA damage for induction. *J. Bacteriol.* **179**:1931-1939.
123. **Hirai, K., H. Aoyama, T. Irikura, S. Iyobe, and S. Mitsuhashi.** 1986. Differences in susceptibility to quinolones of outer membrane mutants of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**:535-538.
124. **Hirai, K., H. Aoyama, S. Suzue, T. Irikura, S. Iyobe, and S. Mitsuhashi.** 1986. Isolation and characterization of norfloxacin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**:248-253.
125. **Hirakata, Y., R. Srikumar, K. Poole, N. Gotoh, T. Suematsu, S. Kohno, S. Kamiyama, R. E. Hancock, and D. P. Speert.** 2002. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.* **196**:109-118.
126. **Holland, I. B. and M. A. Blight.** 1999. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* **293**:381-399.
127. **Holland, I. B., M. A. Blight, and B. Kenny.** 1990. The mechanism of secretion of hemolysin and other polypeptides from gram-negative bacteria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**:473-491.
128. **Holland, I. B., B. Kenny, and M. Blight.** 1990. Haemolysin secretion from *E. coli*. *Biochimie* **72**:131-141.

129. **Hooper, D. C., J. S. Wolfson, M. A. Bozza, and E. Y. Ng.** 1992. Genetics and regulation of outer membrane protein expression by quinolone resistance loci *nfxB*, *nfxC*, and *cfxB*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1151-1154.
130. **Hooper, D. C., J. S. Wolfson, K. S. Souza, E. Y. Ng, G. L. McHugh, and M. N. Swartz.** 1989. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli*: characterization of *nfxB* and *cfxB*, two mutant resistance loci decreasing norfloxacin accumulation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:283-290.
131. **Howard, B. M., R. J. Pinney, and J. T. Smith.** 1993. Function of the SOS process in repair of DNA damage induced by modern 4-quinolones. *J. Pharm. Pharmacol.* **45**:658-662.
132. **Ibelgaufts, H.** 1993. *Gentechnologie von A bis Z*. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
133. **Itakura, K., J. J. Rossi, and R. B. Wallace.** 1984. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.* **53**:323-356.
134. **Jack, D. L., N. M. Yang, and M. H. Saier, Jr.** 2001. The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* **268**:3620-3639.
135. **Jacoby, G. A., K. E. Walsh, D. M. Mills, V. J. Walker, H. Oh, A. Robicsek, and D. C. Hooper.** 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1178-1182.
136. **Jair, K. W., W. P. Fawcett, N. Fujita, A. Ishihama, and R. E. Wolf, Jr.** 1996. Ambidextrous transcriptional activation by SoxS: requirement for the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit in a subset of *Escherichia coli* superoxide-inducible genes. *Mol. Microbiol.* **19**:307-317.
137. **Jair, K. W., X. Yu, K. Skarstad, B. Thony, N. Fujita, A. Ishihama, and R. E. Wolf, Jr.** 1996. Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by Rob, a binding protein of the *Escherichia coli* origin of chromosomal replication. *J. Bacteriol.* **178**:2507-2513.
138. **Jellen-Ritter, A. S. and W. V. Kern.** 2001. Enhanced Expression of the Multidrug Efflux Pumps AcrAB and AcrEF Associated with Insertion Element Transposition in *Escherichia coli* Mutants Selected with a Fluoroquinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1467-1472.
139. **Kaczmarek, F. S., T. D. Gootz, F. Dib-Hajj, W. Shang, S. Hallowell, and M. Cronan.** 2004. Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1630-1639.
140. **Khodursky, A. B., E. L. Zechiedrich, and N. R. Cozzarelli.** 1995. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11801-11805.
141. **Komatsu, T., M. Ohta, N. Kido, Y. Arakawa, H. Ito, and N. Kato.** 1991. Increased resistance to multiple drugs by introduction of the *Enterobacter cloacae* *romA* gene into OmpF porin-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:2155-2158.
142. **Koronakis, V.** 2003. TolC-the bacterial exit duct for proteins and drugs. *FEBS Lett.* **555**:66-71.
143. **Koronakis, V. and C. Hughes.** 1993. Bacterial signal peptide-independent protein export: HlyB-directed secretion of hemolysin. *Semin. Cell Biol.* **4**:7-15.
144. **Koronakis, V. and C. Hughes.** 1996. Synthesis, maturation and export of the *E. coli* hemolysin. *Med. Microbiol. Immunol.* **185**:65-71.
145. **Koronakis, V., J. Li, E. Koronakis, and K. Stauffer.** 1997. Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. *Mol. Microbiol.* **23**:617-626.
146. **Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, and C. Hughes.** 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**:914-919.
147. **Koronakis, V., P. Stanley, E. Koronakis, and C. Hughes.** 1992. The HlyB/HlyD-dependent secretion of toxins by gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Immunol.* **5**:45-53.

148. **Koutsolioutsou, A., E. A. Martins, D. G. White, S. B. Levy, and B. Demple.** 2001. A *soxRS*-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical isolate of *Salmonella enterica* (Seroovar typhimurium). *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:38-43.
149. **Koutsolioutsou, A., S. Pena-Llopis, and B. Demple.** 2005. Constitutive *soxR* mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2746-2752.
150. **Kozak, M.** 1992. A consideration of alternative models for the initiation of translation in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**:385-402.
151. **Kugelberg, E., S. Lofmark, B. Wretling, and D. I. Andersson.** 2005. Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**:22-30.
152. **Kunonga, N. I., R. J. Sobieski, and S. S. Crupper.** 2000. Prevalence of the multiple antibiotic resistance operon (*marRAB*) in the genus *Salmonella*. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**:155-160.
153. **Kühn, H., R. Falta, und H. Rische.** 1973. Infektionskrankheiten und ihre Erreger.
154. **Lacroix, F. J., A. Cloeckaert, O. Grepinet, C. Pinault, M. Y. Popoff, H. Waxin, and P. Pardon.** 1996. *Salmonella typhimurium* *acrB*-like gene: identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**:161-167.
155. **Lage, H.** 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:188-199.
156. **Le Minor, L. und M. Y. Popoff.** 1988. Kauffmann-White-Schema. Antigen-Formeln der *Salmonella*-Serovare. WHO Referenz- und Forschungszentrum für *Salmonella*. Behring Diagnostika.
157. **Lecomte, S., M. H. Baron, M. T. Chenon, C. Coupry, and N. J. Moreau.** 1994. Effect of magnesium complexation by fluoroquinolones on their antibacterial properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2810-2816.
158. **Lee, A., W. Mao, M. S. Warren, A. Mistry, K. Hoshino, R. Okumura, H. Ishida, and O. Lomovskaya.** 2000. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *J. Bacteriol.* **182**:3142-3150.
159. **Lee, E. H., E. Collatz, I. Podglajen, and L. Gutmann.** 1996. A *rob*-like gene of *Enterobacter cloacae* affecting porin synthesis and susceptibility to multiple antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2029-2033.
160. **Leshner, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey, and R. P. Brundage.** 1962. 1,8-Naphthyridine derivatives, a new class of chemotherapy agents. *J. Med. Chem.* **5**:1063-1065.
161. **Lewis, K.** 2000. Translocases: a bacterial tunnel for drugs and proteins. *Curr. Biol.* **10**:R678-R681.
162. **Li, X. Z. and H. Nikaido.** 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* **64**:159-204.
163. **Li, X. Z., H. Nikaido, and K. Poole.** 1995. Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1948-1953.
164. **Lin, J., L. O. Michel, and Q. Zhang.** 2002. *CmeABC* functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2124-2131.
165. **Lin, J., O. Sahin, L. O. Michel, and Q. Zhang.** 2003. Critical role of multidrug efflux pump *CmeABC* in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* **71**:4250-4259.
166. **Linde, H. J., F. Notka, M. Metz, B. Kochanowski, P. Heisig, and N. Lehn.** 2000. In vivo increase in resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of *marR*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:1865-1868.
167. **Linz, U. und H. Degenhardt.** 1990. Die Polymerase-Kettenreaktion. *Naturwissenschaften* **77**:515-530.

168. **Livak, K. J. and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25** :402-408.
169. **Lomovskaya, O. and K. Lewis.** 1992. Emr, an Escherichia coli locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:8938-8942.
170. **Lomovskaya, O., K. Lewis, and A. Matin.** 1995. EmrR is a negative regulator of the Escherichia coli multidrug resistance pump EmrAB. *J. Bacteriol.* **177**:2328-2334.
171. **Lomovskaya, O., H. I. Zgurskaya, and H. Nikaido.** 2002. It takes three to tango. *Nat. Biotechnol.* **20**:1210-1212.
172. **Ma, D., M. Alberti, C. Lynch, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of acrAB genes of Escherichia coli by global stress signals. *Mol. Microbiol.* **19**:101-112.
173. **Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1993. Molecular cloning and characterization of acrA and acrE genes of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **175**:6299-6313.
174. **Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1995. Genes acrA and acrB encode a stress-induced efflux system of Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* **16**:45-55.
175. **Mandel, M. and A. Higa.** 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**:159-162.
176. **Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
177. **Mariam, D. H., Y. Mengistu, S. E. Hoffner, and D. I. Andersson.** 2004. Effect of rpoB mutations conferring rifampin resistance on fitness of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1289-1294.
178. **Martin, R. G., W. K. Gillette, N. I. Martin, and J. L. Rosner.** 2002. Complex formation between activator and RNA polymerase as the basis for transcriptional activation by MarA and SoxS in Escherichia coli. *Mol. Microbiol.* **43**:355-370.
179. **Martin, R. G., W. K. Gillette, S. Rhee, and J. L. Rosner.** 1999. Structural requirements for marbox function in transcriptional activation of mar/sox/rob regulon promoters in Escherichia coli: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Mol. Microbiol.* **34**:431-441.
180. **Martin, R. G., W. K. Gillette, and J. L. Rosner.** 2000. Promoter discrimination by the related transcriptional activators MarA and SoxS: differential regulation by differential binding. *Mol. Microbiol.* **35**:623-634.
181. **Martin, R. G., K. W. Jair, R. E. Wolf, Jr., and J. L. Rosner.** 1996. Autoactivation of the marRAB multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **178**:2216-2223.
182. **Martin, R. G. and J. L. Rosner.** 1995. Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to mar operator sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** :5456-5460.
183. **Martin, R. G. and J. L. Rosner.** 2001. The AraC transcriptional activators. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:132-137.
184. **Martin, R. G. and J. L. Rosner.** 2002. Genomics of the marA/soxS/rob regulon of Escherichia coli: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data. *Mol. Microbiol.* **44**:1611-1624.
185. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, I. Garcia, J. Tran, and G. A. Jacoby.** 2003. Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:1037-1039.
186. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**:797-799.

187. **Mascellino, M. T., S. Farinelli, F. Iegri, and E. Iona.** 1998. The influence of the SOS response on the activity of 4-quinolones and zidovudine against some strains of Enterobacteria. *New Microbiol.* **21**:31-40.
188. **Mazzariol, A., J. Zuliani, G. Cornaglia, G. M. Rossolini, and R. Fontana.** 2002. AcrAB Efflux System: Expression and Contribution to Fluoroquinolone Resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3984-3986.
189. **McCarthy, J. E. and C. Gualerzi.** 1990. Translational control of prokaryotic gene expression. *Trends Genet.* **6**:78-85.
190. **McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**:852-856.
191. **McMurry, L., R. E. Petrucci, Jr., and S. B. Levy.** 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:3974-3977.
192. **Miller, P. F. and M. C. Sulavik.** 1996. Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**:441-448.
193. **Mitsuyama, J., Y. Itoh, M. Takahata, S. Okamoto, and T. Yasuda.** 1992. In vitro antibacterial activities of tosufloxacin against and uptake of tosufloxacin by outer membrane mutants of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2030-2036.
194. **Mordoch, S. S., D. Granot, M. Lebendiker, and S. Schuldiner.** 1999. Scanning cysteine accessibility of EmrE, an H⁺-coupled multidrug transporter from *Escherichia coli*, reveals a hydrophobic pathway for solutes. *J. Biol. Chem.* **274**:19480-19486.
195. **Morita, Y., K. Kodama, S. Shiota, T. Mine, A. Kataoka, T. Mizushima, and T. Tsuchiya.** 1998. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1778-1782.
196. **Morrison, T. B., J. J. Weis, and C. T. Wittwer.** 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**:954-8, 960, 962.
197. **Munk, K. H.** 2001. *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.
198. **Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, T. Matsumoto, and A. Yamaguchi.** 2006. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* **443**:173-179.
199. **Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, and A. Yamaguchi.** 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**:587-593.
200. **Murphy, K. C.** 1998. Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**:2063-2071.
201. **Murphy, K. C., K. G. Campellone, and A. R. Poteete.** 2000. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene*. **246**:321-330.
202. **Muth, T. R. and S. Schuldiner.** 2000. A membrane-embedded glutamate is required for ligand binding to the multidrug transporter EmrE. *EMBO J.* **19**:234-240.
203. **Mühlhardt, C.** 2002. *Der Experimentator: Molekularbiologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
204. **Nagakubo, S., K. Nishino, T. Hirata, and A. Yamaguchi.** 2002. The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *J. Bacteriol.* **184**:4161-4167.

205. **Nakajima, H., K. Kobayashi, M. Kobayashi, H. Asako, and R. Aono.** 1995. Overexpression of the *robA* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2302-2307.
206. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2001. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.
207. **Nikaido, H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* **264**:382-388.
208. **Nikaido, H. and H. I. Zgurskaya.** 2001. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:215-218.
209. **Nishino, K. and A. Yamaguchi.** 2001. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:5803-5812.
210. **Notka, F., H. J. Linde, A. Dankesreiter, H. H. Niller, and N. Lehn.** 2002. A C-terminal 18 amino acid deletion in MarR in a clinical isolate of *Escherichia coli* reduces MarR binding properties and increases the MIC of ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:41-47.
211. **Nunoshiba, T., E. Hidalgo, C. F. Amabile Cuevas, and B. Demple.** 1992. Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. *J. Bacteriol.* **174**:6054-6060.
212. **Nunoshiba, T., E. Hidalgo, Z. Li, and B. Demple.** 1993. Negative autoregulation by the *Escherichia coli* SoxS protein: a dampening mechanism for the *soxRS* redox stress response. *J. Bacteriol.* **175**:7492-7494.
213. **O'Byrne, C. P., N. N. Bhziain, and C. J. Dorman.** 1992. The DNA supercoiling-sensitive expression of the *Salmonella typhimurium* *his* operon requires the *his* attenuator and is modulated by anaerobiosis and by osmolarity. *Molecular Microbiology* **6**:2467-2476.
214. **Oethinger, M., I. Podglajen, W. V. Kern, and S. B. Levy.** 1998. Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2089-2094.
215. **Ogretmen, B., H. Ratajczak, A. Kats, B. C. Stark, and S. M. Gendel.** 1993. Effects of staining of RNA with ethidium bromide before electrophoresis on performance of northern blots. *Biotechniques* **14**:932-935.
216. **Okusu, H., D. Ma, and H. Nikaido.** 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.* **178**:306-308.
217. **Old, R. W. and S. B. Primrose.** 1992. *Gentechnologie*. Thieme Verlag Stuttgart, New York.
218. **Olliver, A., M. Valle, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2004. Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of in vitro-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**:267-272.
219. **Olliver, A., M. Valle, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2005. Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with IS1 or IS10 elements in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:289-301.
220. **Osheroff, N.** 1989. Biochemical basis for the interactions of type I and type II topoisomerases with DNA. *Pharmacol. Ther.* **41**:223-241.
221. **Ouabdesselam, S., J. Tankovic, and C. J. Soussy.** 1996. Quinolone resistance mutations in the *gyrA* gene of clinical isolates of *Salmonella*. *Microb. Drug Resist.* **2**:299-302.
222. **Pages, J. M., M. Masi, and J. Barbe.** 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol. Med.* **11**:382-389.
223. **Pan, W. and B. G. Spratt.** 1994. Regulation of the permeability of the gonococcal cell envelope by the *mtr* system. *Mol. Microbiol.* **11**:769-775.

224. **Pan, X. S., J. Ambler, S. Mehtar, and L. M. Fisher.** 1996. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2321-2326.
225. **Pan, X. S. and L. M. Fisher.** 1997. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:471-474.
226. **Paulsen, I. T.** 2003. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:446-451.
227. **Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**:575-608.
228. **Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi, and M. H. J. Saier.** 1997. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **156**:1-8.
229. **Paulsen, I. T. and R. A. Skurray .** 1993. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes-an analysis. *Gene* **124**:1-11.
230. **Paulsen, I. T., R. A. Skurray, R. Tam, M. H. J. Saier, R. J. Turner, J. H. Weiner, E. B. Goldberg, and L. L. Grinius.** 1996. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol.* **19** :1167-1175.
231. **Phillips, I., E. Culebras, F. Moreno, and F. Baquero.** 1987. Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**:631-638.
232. **Piddock, L. J.** 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:382-402.
233. **Piddock, L. J., V. Ricci, I. McLaren, and D. J. Griggs.** 1998. Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant salmonella serotypes isolated from animals in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**:635-641.
234. **Piddock, L. J., D. G. White, K. Gensberg, L. Pumbwe, and D. J. Griggs.** 2000. Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3118-3121.
235. **Pimenta, A. L., J. Young, I. B. Holland, and M. A. Blight.** 1999. Antibody analysis of the localisation, expression and stability of HlyD, the MFP component of the *E. coli* haemolysin translocator. *Mol. Gen. Genet.* **261**:122-132.
236. **Poirel, L., T. V. Nguyen, A. Weintraub, C. Leviandier, and P. Nordmann.** 2006. Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS* in *Enterobacter cloacae*. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:1021-1023.
237. **Pomposiello, P. J. and B. Demple.** 2000. Identification of SoxS-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* **182**:23-29.
238. **Poole, K.** 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:12-26.
239. **Poole, K.** 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:20-51.
240. **Poteete, A. R. and A. C. Fenton.** 1993. Efficient double-strand break-stimulated recombination promoted by the general recombination systems of phages lambda and P22. *Genetics* **134**:1013-1021.
241. **Poteete, A. R. and A. C. Fenton.** 2000. Genetic requirements of phage lambda red-mediated gene replacement in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **182**:2336-2340.
242. **Pradel, E. and J. M. Pages.** 2002. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2640-2643.

243. **Prouty, A. M., I. E. Brodsky, S. Falkow, and J. S. Gunn.** 2004. Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* **150**:775-783.
244. **Pumbwe, L., L. P. Randall, M. J. Woodward, and L. J. Piddock.** 2004. Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni*. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**:341-347.
245. **Putman, M., H. W. van Veen, and W. N. Konings.** 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:672-693.
246. **Randall, L. P., D. J. Eaves, S. W. Cooles, V. Ricci, A. Buckley, M. J. Woodward, and L. J. Piddock.** 2005. Fluoroquinolone treatment of experimental *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 infections in chickens selects for both *gyrA* mutations and changes in efflux pump gene expression. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:297-306.
247. **Randall, L. P. and M. J. Woodward.** 2001. Multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1190-1197.
248. **Reece, R. J. and A. Maxwell.** 1991. DNA gyrase: structure and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**:335-375.
249. **Reid, T. M.** 1992. The treatment of non-typhi salmonellosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **29**:4-8.
250. **Renau, T. E., J. W. Gage, J. A. Dever, G. E. Roland, E. T. Joannides, M. A. Shapiro, J. P. Sanchez, S. J. Gracheck, J. M. Domagala, M. R. Jacobs, and R. C. Reynolds.** 1996. Structure-activity relationships of quinolone agents against mycobacteria: effect of structural modifications at the 8 position. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2363-2368.
251. **Rex, G., B. Surin, G. Besse, B. Schneppe, and J. E. McCarthy.** 1994. The mechanism of translational coupling in *Escherichia coli*. Higher order structure in the *atpHA* mRNA acts as a conformational switch regulating the access of de novo initiating ribosomes. *J. Biol. Chem.* **269**:18118-18127.
252. **Reyna, F., M. Huesca, V. Gonzalez, and L. Y. Fuchs.** 1995. *Salmonella typhimurium gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1621-1623.
253. **Rhee, S., R. G. Martin, J. L. Rosner, and D. R. Davies.** 1998. A novel DNA-binding motif in *MarA*: the first structure for an *AraC* family transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:10413-10418.
254. **Ricci, V., P. Tzakas, A. Buckley, and L. J. Piddock.** 2006. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains are difficult to select in the absence of *AcrB* and *TolC*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:38-42.
255. **Ridley, A. and E. J. Threlfall.** 1998. Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104. *Microb. Drug Resist.* **4**:113-118.
256. **Rische, H.** 1973. *Infektionskrankheiten und ihre Erreger*. Fischer Verlag, Jena.
257. **RKI.** 2006. *Epidemiologisches Bulletin. Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health*.
258. **Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, P. C. Hye, K. Bush, and D. C. Hooper.** 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* **12**:83-88.
259. **Robinson, M. J. and N. Osheroff.** 1991. Effects of antineoplastic drugs on the post-strand-passage DNA cleavage/religation equilibrium of topoisomerase II. *Biochemistry* **30**:1807-1813.
260. **Rodriguez, R. L. and R. C. Tait.** 1983. *Recombinant DNA techniques: an introduction*. Addison-Wesley Publishing Company, London, Amsterdam, Sidney, Tokyo.
261. **Rosenberg, E. Y., D. Bertenthal, M. L. Nilles, K. P. Bertrand, and H. Nikaido.** 2003. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* *AcrAB* multidrug efflux pump through their interaction with *Rob* regulatory protein. *Mol. Microbiol.* **48**:1609-1619.

262. **Rosner, J. L.** 1985. Nonheritable resistance to chloramphenicol and other antibiotics induced by salicylates and other chemotactic repellents in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:8771-8774.
263. **Rosner, J. L., B. Dangi, A. M. Gronenborn, and R. G. Martin.** 2002. Posttranscriptional activation of the transcriptional activator Rob by dipyrindyl in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**:1407-1416.
264. **Rotem, D., N. Sal-man, and S. Schuldiner.** 2001. In vitro monomer swapping in EmrE, a multidrug transporter from *Escherichia coli*, reveals that the oligomer is the functional unit. *J. Biol. Chem.* **276**:48243-48249.
265. **Rouquette-Loughlin, C., S. A. Dunham, M. Kuhn, J. T. Balthazar, and W. M. Shafer.** 2003. The NorM efflux pump of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* recognizes antimicrobial cationic compounds. *J. Bacteriol.* **185**:1101-1106.
266. **Ruiz, J., L. Capitano, L. Nunez, D. Castro, J. M. Sierra, M. Hatha, J. J. Borrego, and J. Vila.** 1999. Mechanisms of resistance to ampicillin, chloramphenicol and quinolones in multiresistant *Salmonella typhimurium* strains isolated from fish. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:699-702.
267. **Ruiz, J., D. Castro, P. Goni, J. A. Santamaria, J. J. Borrego, and J. Vila.** 1997. Analysis of the mechanism of quinolone resistance in nalidixic acid-resistant clinical isolates of *Salmonella* serotype Typhimurium. *J. Med. Microbiol.* **46**:623-628.
268. **Ruzin, A., M. A. Visalli, D. Keeney, and P. A. Bradford.** 2005. Influence of transcriptional activator RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1017-1022.
269. **Sanders, C. C.** 1988. Ciprofloxacin: in vitro activity, mechanism of action, and resistance. *Rev. Infect. Dis.* **10**:516-527.
270. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
271. **Schedletzky, H., B. Wiedemann, and P. Heisig.** 1999. The effect of moxifloxacin on its target topoisomerases from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:31-37.
272. **Schneeberger, C., P. Speiser, F. Kury, and R. Zeillinger.** 1995. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl.* **4**:234-238.
273. **Schneiders, T., S. G. Amyes, and S. B. Levy.** 2003. Role of AcrR and ramA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2831-2837.
274. **Schneiders, T. and S. B. Levy.** 2006. MarA-mediated transcriptional repression of the rob promoter. *J. Biol. Chem.* **281**:10049-10055.
275. **Schuldiner, S., D. Granot, S. S. Mordoch, S. Ninio, D. Rotem, M. Soskin, C. G. Tate, and H. Yerushalmi.** 2001. Small is mighty: EmrE, a multidrug transporter as an experimental paradigm. *News Physiol. Sci.* **16**:130-134.
276. **Schulte, A.** 2001. Stabilität hoher Fluorchinolonresistenz bei Enterobakterien ohne Selektionsdruck. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
277. **Seoane, A. S. and S. B. Levy.** 1995. Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**:3414-3419.
278. **Shaw, K. J., N. Miller, X. Liu, D. Lerner, J. Wan, A. Bittner, and B. J. Morrow.** 2003. Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **5**:105-122.
279. **Shea, M. E. and H. Hiasa.** 2000. Distinct effects of the UvrD helicase on topoisomerase-quinolone-DNA ternary complexes. *J. Biol. Chem.* **275**:14649-14658.

280. **Shen, L. L., L. A. Mitscher, P. N. Sharma, T. J. O'Donnell, D. W. Chu, C. S. Cooper, T. Rosen, and A. G. Pernet.** 1989. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. *Biochemistry* **28**:3886-3894.
281. **Soto, S. M., J. Ruiz, M. C. Mendoza, and J. Vila.** 2003. In vitro fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: analysis of mechanisms involved in resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:537-540.
282. **Spott, S., F. Dong, B. Kisters-Woike, and B. Muller-Hill.** 2000. Dimerisation mutants of Lac repressor. II. A single amino acid substitution, D278L, changes the specificity of dimerisation. *J. Mol. Biol.* **296**:673-684.
283. **Stone, B. J. and V. L. Miller.** 1995. *Salmonella enteritidis* has a homologue of *tolC* that is required for virulence in BALB/c mice. *Mol. Microbiol.* **17**:701-712.
284. **Su, C. C., M. Li, R. Gu, Y. Takatsuka, G. McDermott, H. Nikaido, and E. W. Yu.** 2006. Conformation of the AcrB multidrug efflux pump in mutants of the putative proton relay pathway. *J. Bacteriol.* **188**:7290-7296.
285. **Sulavik, M. C., M. Dazer, and P. F. Miller.** 1997. The *Salmonella typhimurium* *mar* locus: molecular and genetic analyses and assessment of its role in virulence. *J. Bacteriol.* **179**:1857-1866.
286. **Sulavik, M. C., C. Houseweart, C. Cramer, N. Jiwani, N. Murgolo, J. Greene, B. DiDomenico, K. J. Shaw, G. H. Miller, R. Hare, and G. Shimer.** 2001. Antibiotic Susceptibility Profiles of *Escherichia coli* Strains Lacking Multidrug Efflux Pump Genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1126-1136.
287. **Tanaka, T., T. Horii, K. Shibayama, K. Sato, S. Ohsuka, Y. Arakawa, K. Yamaki, K. Takagi, and M. Ohta.** 1997. RobA-induced multiple antibiotic resistance largely depends on the activation of the AcrAB efflux. *Microbiol. Immunol.* **41**:697-702.
288. **Thanassi, D. G., L. W. Cheng, and H. Nikaido.** 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:2512-2518.
289. **Thorns, C. J.** 2000. Bacterial food-borne zoonoses. *Rev. Sci. Tech.* **19**:226-239.
290. **Tibbetts, R. J., T. L. Lin, and C. C. Wu.** 2005. Insertional mutation of *marA* vitiates inducible multiple antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis*. *Vet. Microbiol.* **109**:267-274.
291. **Tran, J. H., G. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2002. Interaction of the Plasmid-Mediated Quinolone-Resistance Protein Qnr with DNA Gyrase. ASM 102nd General Meeting, Salt Lake City, Abstract A-137.22-5-2002.
292. **Tran, J. H. and G. A. Jacoby.** 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:5638-5642.
293. **Tran, J. H., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2005. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3050-3052.
294. **Turner, A. K., S. Nair, and J. Wain.** 2006. The acquisition of full fluoroquinolone resistance in *Salmonella Typhi* by accumulation of point mutations in the topoisomerase targets. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**:733-740.
295. **Ubukata, K., N. Itoh-Yamashita, and M. Konno.** 1989. Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1535-1539.
296. **van der Straaten, T., R. Janssen, D. J. Mevius, and J. T. van Dissel.** 2004. *Salmonella* gene *rma* (*ramA*) and multiple-drug-resistant *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2292-2294.
297. **van der Straaten, T., L. Zulianello, A. van Diepen, D. L. Granger, R. Janssen, and J. T. van Dissel.** 2004. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* *RamA*, intracellular oxidative stress response, and bacterial virulence. *Infect. Immun.* **72**:996-1003.

298. **Vila, J., J. Ruiz, F. Marco, A. Barcelo, P. Goni, E. Giralt, and T. Jimenez de Anta.** 1994. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:2477-2479.
299. **Walker, G. C.** 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **48**:60-93.
300. **Wang, H., J. L. Dzink-Fox, M. Chen, and S. B. Levy.** 2001. Genetic Characterization of Highly Fluoroquinolone-Resistant Clinical *Escherichia coli* Strains from China: Role of *acrR* Mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1515-1521.
301. **Watt, P. M. and I. D. Hickson.** 1994. Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem. J.* **303**:681-695.
302. **Webber, M. A. and L. J. Piddock.** 2001. Absence of Mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-Overexpressing Fluoroquinolone-Resistant Clinical and Veterinary Isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1550-1552.
303. **Webber, M. A., A. Talukder, and L. J. Piddock.** 2005. Contribution of mutation at amino acid 45 of *AcrR* to *acrB* expression and ciprofloxacin resistance in clinical and veterinary *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4390-4392.
304. **White, D. G., J. D. Goldman, B. Demple, and S. B. Levy.** 1997. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:6122-6126.
305. **Wilfinger, W. W., K. Mackey, and P. Chomczynski.** 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**:474-481.
306. **Willmott, C. J., S. E. Critchlow, I. C. Eperon, and A. Maxwell.** 1994. The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **242**:351-363.
307. **Winnacker, E. L.** 1990. *Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie.* Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel.
308. **Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael, and M. W. Graham.** 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* **17**:3469-3478.
309. **Wu, J. and B. Weiss.** 1991. Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**:2864-2871.
310. **Wu, J. and B. Weiss.** 1992. Two-stage induction of the *soxRS* (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:3915-3920.
311. **Yang, H. L., K. Heller, M. Gellert, and G. Zubay.** 1979. Differential sensitivity of gene expression in vitro to inhibitors of DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:3304-3308.
312. **Yang, S., S. R. Clayton, and E. L. Zechiedrich.** 2003. Relative contributions of the *AcrAB*, *MdfA* and *NorE* efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:545-556.
313. **Yassien, M. A., H. E. Ewis, C. Lu, and A. T. Abdelal.** 2002. Molecular cloning and characterization of the *Salmonella enterica* serovar paratyphi B *rma* gene, which confers multiple drug resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:360-366.
314. **Yerushalmi, H., M. Lebendiker, and S. Schuldiner.** 1995. *EmrE*, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *J. Biol. Chem.* **270**:6856-6863.
315. **Yerushalmi, H., M. Lebendiker, and S. Schuldiner.** 1996. Negative dominance studies demonstrate the oligomeric structure of *EmrE*, a multidrug antiporter from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**:31044-31048.

316. **Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, and S. Nakamura.** 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1271-1272.
317. **Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, L. M. Yamanaka, and S. Nakamura.** 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:1647-1650.
318. **Yu, D., H. M. Ellis, E. C. Lee, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and Court DL.** 2000. An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:5978-5983.
319. **Yu, E. W., G. McDermott, H. I. Zgurskaya, H. Nikaido, and D. E. Koshland, Jr.** 2003. Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. *Science* **300**:976-980.
320. **Zgurskaya, H. I. and H. Nikaido.** 1999. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. *J. Mol. Biol.* **285**:409-420.
321. **Zhang, M. Q. and A. Haemers.** 1991. Quinolone antimicrobial agents: structure-activity relationships. *Pharmazie* **46**:687-700.
322. **Zhang, Q., J. Lin, and S. Pereira.** 2003. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in animal reservoirs: dynamics of development, resistance mechanisms and ecological fitness. *Anim. Health Res. Rev.* **4**:63-71.
323. **Zhao, B. Y., R. Pine, J. Domagala, and K. Drlica.** 1999. Fluoroquinolone action against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: effects of a C-8 methoxyl group on survival in liquid media and in human macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:661-666.
324. **Zhao, X., J. Y. Wang, C. Xu, Y. Dong, J. Zhou, J. Domagala, and K. Drlica.** 1998. Killing of *Staphylococcus aureus* by C-8-methoxy fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:956-958.
325. **Zhong, P. and V. D. Shortridge.** 2000. The role of efflux in macrolide resistance. *Drug Resist.* **3**:325-329.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ac	Acetat
ad	auf (lat.)
Amp ^R /amp	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bla	β-Laktamase
BLAST	engl.: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare (engl.: <i>base pairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy- oder Kohlenstoff-
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca	Calcium
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>complementary</i>)
CT-Wert	Schwellenwert-Zyklus der real-time PCR
Δ	Deletion
D	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelstängige DNA (engl.: <i>double stranded DNA</i>)
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
ed(s).	Herausgeber (engl.: <i>editor(s)</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPI	Effluxpumpeninhibitor
et al.	und andere (lat.: <i>et alii</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	und so weiter (lat.: <i>et cetera</i>)
FQ	Fluorchinolon (eng.: <i>fluoroquinolone</i>)
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigungskonstante
G	Guanin
GSP	genspezifische Primer
h	Stunde
k	kilo (1 x 10 ³)
KAc	Kaliumacetat
KBE	koloniebildende Einheiten
Kan ^R /kan	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
μ	mikro (1 x 10 ⁻⁶)
m	Meter oder milli (1 x 10 ⁻³)
M	molar (mol/l) oder Molekulargewichtsstandard (in Abbildungen)

MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
n	nano (1×10^{-9})
N-	Amino-
n. b.	nicht bestimmt
NCBI	engl.: <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid
$OD_{x \text{ nm}}$	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	offener Leserahmen (engl.: <i>open reading frame</i>)
ori	Replikationsursprung (engl.: <i>origin of replication</i>)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Promotor
p.a.	analysenrein (lat.: <i>pro analysi</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
QRDR	engl.: <i>quinolone resistance determining region</i>
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur (25 °C) oder reverse Transkriptase
σ	Sigmafaktor (Untereinheit des RNA-Polymerase-Holoenzym)
s	Sekunde
S/D	Shine/Dalgarno-Sequenz (Ribosomenbindungsstelle)
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
spec.	Art(en) (lat.: <i>species</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (engl.: <i>single stranded DNA</i>)
T	Thymin
T_A	Anlagerungstemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T_c^R/tet	Tetracyclinresistenz
T_M	Schmelztemperatur (engl.: <i>melting temperature</i>)
Topo	Topoisomerase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ts	temperatursensitiv
U	Uracil oder Einheit(en) (engl.: <i>unit(s)</i>)
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
ÜNK	Übernachtskultur
UV	ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
VF	Verdünnungsfaktor
Vol.	Volumenanteil
v/v	Volumenprozent (engl.: <i>volume per volume</i>)
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent (engl.: <i>weight per volume</i>)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Tab. 8.1: Wichtige in der Arbeit verwendete Gefahrstoffe mit Gefahrensymbol und R- sowie S-Sätze

Gefahrstoff	Gefahrensymbol	Gefahrenhinweise - R-Sätze	Sicherheitsratschläge - S-Sätze
2,2'-Bipyridin	 T	R 21-25 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut. Giftig beim Verschlucken.	S 22-36/37-45 Staub nicht einatmen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen).
Butanol	 Xn	R 10-22-37/38-41-67 Entzündlich. Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Reizt die Atmungsorgane und die Haut. Gefahr ernster Augenschäden. Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.	S 7/9-13-26-37/39-46 Behälter dicht geschlossen an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren. Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen. Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen.
β-Mercaptoethanol	 T  N	R 22-24-34-51/53 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Giftig bei Berührung mit der Haut. Verursacht Verätzungen. Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.	S 26-36/37/39-45-61 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen). Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
Calciumchlorid-Dihydrat	 Xi	R 36 Reizt die Augen.	S 22-24 Staub nicht einatmen. Berührung mit der Haut vermeiden.
DEPC	 Xn	R 22-36/37 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Reizt die Augen und die Atmungsorgane.	S 23.5 Dampf/Aerosol nicht einatmen.
DTT	 Xn	R 22-36/38 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Reizt die Augen und die Haut.	

EDTA	 Xi	R 36-52/53 Reizt die Augen. Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.	S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
Essigsäure	 C	R 10-35 Entzündlich. Verursacht schwere Verätzungen.	S 23.2-26-45 Dampf nicht einatmen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
Ethanol	 F	R 11 Leichtentzündlich.	S 7-16 Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen.
Ethidiumbromid	 Xn	R 68 Irreversibler Schaden möglich. Erbgutverändernd	S 36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.
Isopropanol	 F  Xi	R 11-36-67 Leichtentzündlich. Reizt die Augen. Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.	S 7-16-24/25-26 Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen. Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
Kaliumhydroxid	 C	R 22-35 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. Verursacht schwere Verätzungen.	S 26-36/37/39-45 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen.
Methanol	 F  T	R 11-23/24/25-39/23/24/25 Leichtentzündlich. Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut. Ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.	S 7-16-36/37-45 Behälter dicht geschlossen halten. Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.
Natrium-carbonat	 Xi	R 36 Reizt die Augen.	S 22-26 Staub nicht einatmen. Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
Paraquat	 T+	R 24/25-48/25-26-36/37/38-50/53 Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken. Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer	S (1/2)-22-28-36/37/39-45-60-61 (Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren.) Staub nicht einatmen.

	 N	Exposition durch Verschlucken. Sehr giftig beim Einatmen. Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut. Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (vom Hersteller anzugeben) Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen). Dieser Stoff und/oder sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
Phosphorsäure	 C	R 34 Verursacht Verätzungen.	S 26-45 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei Unfall oder Unwohlsein Arzt hinzuziehen.
Salzsäure	 C	R 34-37 Verursacht Verätzungen. Reizt die Atmungsorgane.	S 26-36/37/39-45 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen. Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen.
SDS	 F  Xn	R 11-21/22-36/37/38 Leichtentzündlich. Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken. Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.	S 26-36/37 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.
Tris-Base	 Xi	R 36/38 Reizt die Augen und die Haut.	
Xylencyanol	 Xi	R 36 Reizt die Augen.	S 24 Berührung mit der Haut vermeiden.

Quelle: <http://www.merck.de/servlet/PB/menu/1409670/index.html>

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter Heisig danke ich für die Vergabe des interessanten Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Durch viele hilfreiche Ratschläge sowie seine stete Diskussionsbereitschaft hat er im Wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Zudem danke ich ihm für die Möglichkeit an einigen Kongressen teilnehmen zu können.

Herrn Prof. Dr. Bernward Bisping danke ich für die freundliche Übernahme der Kokorrektur.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Antje Preisler und Dr. Nina Matthiessen für ihre fachliche und emotionale Unterstützung im Laboralltag. Antje möchte ich zudem herzlich für die konstruktive Kritik während der Fertigstellung dieser Arbeit danken. Dr. Anke Heisig und Antje Schnasse danke ich für die Unterstützung bei der DNA-Sequenzierung. Antje danke ich zudem für die steten kleinen und großen Hilfen während der Zeit im Labor.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern und Dr. Stefan Feuerriegel für ihre emotionale Unterstützung sowie ihr stetes Interesse an meiner Arbeit.

Lebenslauf

Silke Schmidt

geboren am 30. September 1977 in Herford

Schulbildung

1984 - 1988	Grundschule Löhne
1988 - 1997	Städtisches Gymnasium Löhne

Hochschulbildung

1997 - 2003	Studium der Biologie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
Juli - Aug. 2000	Studium (<i>summerterm</i>) an der University of California Berkeley, Studienschwerpunkte: Funktionale Neuroanatomie, Englisch als Fremdsprache
April 2002 - März 2003	Diplomarbeit (Entwicklung eines chromosomal lokalisierten Promotor-Testsystems für <i>Bacillus megaterium</i>) am Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie bei Prof. Dr. F. Meinhardt
April - Okt. 2003	Praktikum (Untersuchung des Genexpressions-musters von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> unter dem Einfluss kationischer antimikrobieller Peptide) an der University of British Columbia, Department of Microbiology & Immunology bei Dr. R. E. W. Hancock
Jan. 2004 - Juni 2007	Promotion (Regulation der Expression von <i>multiple drug resistance</i> (mdr) Effluxpumpen in klinisch relevanten <i>Salmonella</i> -Stämmen) am Institut für Pharmazie, Abteilung für Pharmazeutische Biologie & Mikrobiologie bei Prof. Dr. P. Heisig

Veröffentlichungen und Vorträge

Schmidt, S., P. Heisig. 2007. Development of multidrug efflux mediated fluoroquinolone resistance in *Salmonella* Hadar. Poster. 17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, München.

Schmidt, S., P. Heisig. 2006. Überexpression des Regulators Rma in *Salmonella* und Bedeutung für die multidrug Efflux vermittelte Resistenz. Poster. DPhG-Doktorandentagung, Nürnberg-Heroldsberg.

Schmidt, S., P. Heisig. 2006. Potential of fluoroquinolones to induce the expression of the *acrAB* efflux pump and the global regulator *marA* in *Salmonella* Hadar. Vortrag. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Nizza, Frankreich.

Schmidt, S., N. Wolf, J. Strey, H. Nahrstedt, F. Meinhardt, J. Waldeck. 2005. Test systems to study transcriptional regulation and promoter activity in *Bacillus megaterium*. Appl Microbiol Biotechnol (68):647-655.

Schmidt, S., N. Wolf, J. Waldeck, F. Meinhardt. 2004. Two β -galactosidase-based promoter-test-systems for *Bacillus megaterium*. Poster. VAAM-Tagung, Braunschweig.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Arbeiten entnommen sind, habe ich unter genauer Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

Hamburg, den 18.06.2007

.....

Silke Schmidt