Der Einfluss des Mutatorgens *dnaQ* auf die Resistenzentwicklung gegen Fluorchinolone bei *Escherichia coli*

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Universität Hamburg

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Vorgelegt von

Marco Petschulies

-Hamburg 2014-

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2009 bis März 2013 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig in der Abteilung für Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Heisig

2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Disputationstermin: 26.09.2014

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 *Escherichia coli* 2

1.2 Mutationsrate und DNA-Reparatur in *E. coli* 3

1.2.1 Proofreading der Polymerase III 5

1.2.2 Mismatch-Repair 7

1.2.3 Weitere DNA-Reparaturmechanismen 9

1.2.4 SOS-Antwort 11

1.3 DNA-Topologie und Topoisomerasen 12

1.3.1 Topoisomerasen 15

1.4 Fluorchinolone 17

1.4.1 Fluorchinolonresistenz 20

1.4.1.1 Mutationen in den Topoisomerase-Genen 20

1.4.1.2 Verminderte Akkumulierung 21

1.4.1.3 Gyrase-Schutzproteine 23

1.4.1.4 Enzymatische Modifikation von Fluorchinolonen 23

1.4.1.5 Akkumulierung von chromosomalen Fluorchinolon-Resistenzmutationen 24

1.5 Ziel der Arbeit 25

2. Material & Methoden 27

2.1 Verwendete Materialien 27

2.1.1 Bakterienstämme 27

2.1.2 Plasmide 28

2.1.3 Oligonukleotide 29

2.1.4 Enzyme 32

2.1.5 Kommerzielle Komplettsysteme 33

2.1.6 Puffer & Lösungen 33
2.1.7 Nährmedien 34
2.1.8 Chemikalien 34
2.1.9 Geräte & Verbrauchsmaterialien 36
2.1.10 Software 38
2.2 Methoden 39
2.2.1 Aufbewahrung von Bakterienkulturen 39
2.2.2 Bestimmung der minimale Hemmkonzentration 39
2.2.2.1 Mikrodilutionsverfahren 39
2.2.2.2 Agardilutionsverfahren 40
2.2.3 Bestimmung der Keimzahl 40
2.2.3.1 Photometrische Näherung 40
2.2.3.2 KBE-Bestimmung 41
2.2.4 Bestimmung der Mutationsrate 41
2.2.5 Bestimmung der Generationszeit 42
2.2.6 Transfer von DNA 42
2.2.6.1 Transformation mit $CaCl_2$-kompetenten Zellen 42
2.2.6.2 Elektroporation 43
2.2.7 In vitro Selektion von Mutanten 44
2.2.8 Ortsspezifische Mutagenese 45
2.2.8.1 Nach Datsenko und Wanner 45
2.2.8.2 *Gene Gorging* 46
2.2.8.3 *Gene Doctoring* 47
2.2.9 Morphologische Betrachtung von Bakterien 48
2.2.10 Isolierung von Nukleinsäuren 49
2.2.10.1 Isolierung von RNA (Nucleospin® RNA II Kit) 49

2.2.10.2 Isolierung chromosomaler DNA (Koch-Methode) 50
2.2.10.3 Alkalische Lyse 51
2.2.10.4 HiYield® Plasmid Mini Kit 52
2.2.11 Reinigung und Konzentrierung von DNA 52
2.2.11.1 Nucleospin® Extract II Kit 52
2.2.11.2 Phenol-Chloroform-Extraktion 53
2.2.11.3 Ethanolfällung 53
2.2.12 Sequenzierung von DNA 54
2.2.13 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren 55
2.2.13.1 Restriktionsverdau 55
2.2.13.2 Ligation & Klonierung 56
2.2.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 57
2.2.14.1 Nanodrop-Photometer 57
2.2.14.2 Agilent Bioanalyzer 2100 58
2.2.15 Reverse Transkription 59
2.2.16 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 60
2.2.16.1 Anwendungen der PCR 62
2.2.17 Quantitative Real-Time PCR 64
2.2.18 Agarose-Gelelektrophorese 65

3. Ergebnisse 68

3.1 Mutationsraten von Mutatorstämmen 68
3.1.1 Zusatz von Glyoxal 71
3.2 Ortsspezifische Mutagenese 73
3.2.1 Vorversuche 74
3.2.2 Konstruktion des Templateplasmids pHPMP12-01 75
3.2.3 *Gene Doctoring* 76

3.2.4 Screening der möglichen rekombinanten Kolonien 77
3.2.5 Sequenzanalyse des möglichen rekombinanten Stammes 78
3.3 Charakterisierung des rekombinanten Stammes 79
3.3.1 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus 79
3.3.2 Detektion einer Deletion in *marR* mittels PCR 80
3.3.3 Empfindlichkeitsbestimmung von *E. coli* MIIQ 81
3.3.4 Bestimmung der Mutationsrate von *E. coli* MIIQ 81
3.3.5 Bestimmung der Generationszeit 84
3.3.6 Morphologische Betrachtung 86
3.3.7 Prüfung auf Kompensation der erhöhten Mutationsrate 87
3.4 Selektion ciprofloxacinresistenter Mutanten von *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII 88
3.4.1 MHK-Bestimmung der Mutanten 89
3.4.2 MHK-Bestimmung mit Zusatz von PAβN 90
3.4.3 Sequenzanalyse der Mutanten 92
3.5 Sequenzanalyse von *dnaQ* in klinischen Isolaten 101
3.6 Expression von *dnaQ*-Allelen in *E. coli* MII und Bestimmung der Mutationsrate 106
3.6.1 Mutationsraten von klinischen Isolaten mit *dnaQ*-Mutationen 109
3.7 *dnaQ*-Genexpression in Anwesenheit plasmidcodierter *dnaQ*-Allele 111
3.8 Bestimmung des relativen DNA-Spiralisierungsgrades 113
3.9 Quantitative Bestimmung der *dnaQ*-Expression 118
4. Diskussion 124
4.1 Mutationsraten von Mutatorstämmen 126
4.1.1 Zusatz von Glyoxal 129
4.2 Ortsspezifische Mutagenese 131
4.3 Charakterisierung des rekombinanten Stammes 133
4.4 Selektion ciprofloxacinresistenter Mutanten von *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII 136

4.5 Sequenzanalyse von *dnaQ* in klinischen Isolaten 141

4.6 Expression von *dnaQ*-Allelen in *E. coli* MII 142

4.7 *dnaQ*-Genexpression in Anwesenheit plasmidcodierter *dnaQ*-Allele 145

4.8 Bestimmung des relativen DNA-Spiralisierungsgrades 147

4.9 Quantitative Bestimmung der *dnaQ*-Expression 151

4.10 Ausblick 153

5. Zusammenfassung 156

6. Summary 158

7. Anhänge 160

7.1 Gefahrstoffverzeichnis 160

7.2 Abkürzungsverzeichnis 162

7.3 Gene 165

7.4 Publikationen 167

7.5 Lebenslauf 167

7.6 Danksagung 168

7.7 Eidesstattliche Versicherung 169

7.8 Erklärung über frühere Promotionsversuche 169

8. Literaturverzeichnis 170

1. Einleitung

Der Entwicklung neuer antibiotisch wirksamer Substanzen folgte in ihrer kurzen Geschichte häufig wenige Jahre später die Entdeckung von ersten Keimen, die dagegen resistent waren. Die Bakterien konnten sich unter anderem durch ihre hohe Teilungsrate und durch ihre Fähigkeit fremde Erbinformationen aufzunehmen, sehr schnell an die neuen Substanzen anpassen, Resistenzen entwickeln und verbreiten [1, 2]. Unsachgemäße Verwendung der vorhandenen Präparate und mangelnde Entwicklung neuer Antibiotika führten dazu, dass sich die Resistenzsituation speziesübergreifend nahezu durchgehend verschlechtert hat (siehe Abbildung 1.1).

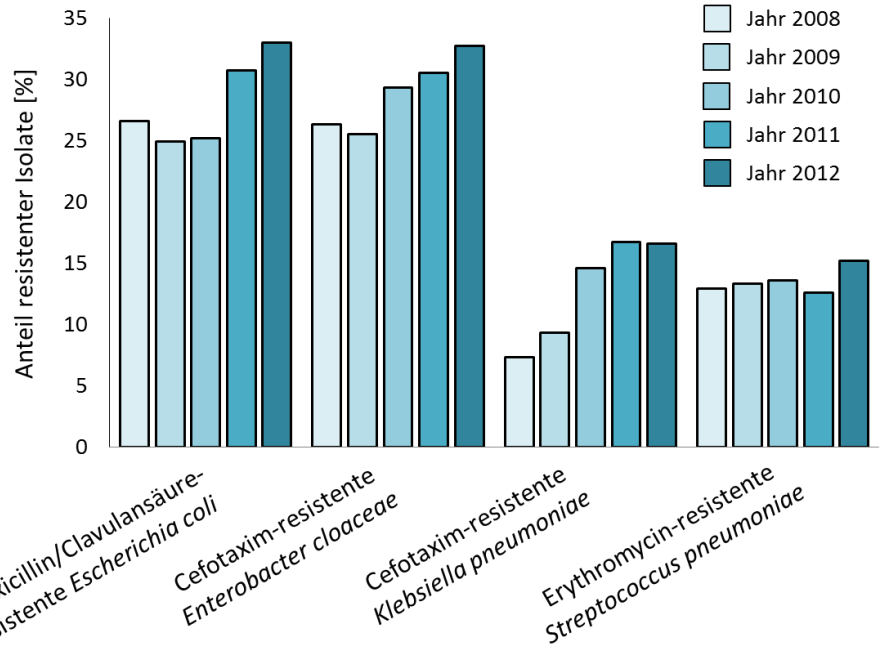


Abbildung 1.1: Entwicklung der Resistenz ausgewählter Bakterienspezies in Deutschland im Zeitraum von 2008 bis 2012 gegenüber häufig verwendeten Antibiotika [3] im stationären Bereich

Der Anteil an fluorchinolonresistenten *Escherichia coli* hat sich beispielsweise in Deutschland von 1999 bis 2006 mehr als versechsfacht [4]. Bei einzelnen Isolaten verschiedener Spezies wird sogar von Panresistenz berichtet [5, 6, 7], der Resistenz gegenüber allen gängigen Antibiotikaklassen. Gleichzeitig wurde die Antibiotikaforschung vieler großer Pharmaunternehmen eingestellt oder nur mit drastisch reduziertem Budget fortgeführt [8]. Für die Entwicklung neuer Wirkstoffe ist es daher von zunehmender Bedeutung, die Mechanismen zu verstehen, durch die Resistenz vermittelt wird. Grundsätzlich gibt es drei übergeordnete Resistenzmechanismen: (I) Die Veränderung der Zielstruktur des

Antibiotikums, (II) die Verringerung der Akkumulierung des Antibiotikums in der Bakterienzelle und (III) die enzymatischen Modifikation mit Funktionsverlust des Arzneistoffes.

Diese Arbeit soll zum Verständnis der molekularen Ursachen der Entwicklung von Resistenz des Bakteriums *E. coli* gegenüber der Antibiotikaklasse der Fluorchinolone beitragen. Da die Fluorchinolone vollsynthetisch hergestellt werden und ein niedriges endogenes Resistenzpotential aufweisen (Mutationen in mehreren Zielstrukturen der Fluorchinolone sind für eine klinische Resistenz notwendig), erhoffte man sich eine ausbleibende oder zumindest langsame Resistenzentwicklung (siehe auch Kapitel 1.4.1).

1.1 Escherichia coli

Escherichia coli (*E. coli*) sind gram-negative, peritrich begeißelte, fakultativ-anaerobe Stäbchenbakterien aus der Familie der Enterobacteriaceae [9, 10]. *E. coli* gehören zur residenten Darmflora von vielen Säugetieren und sind einer der wichtigsten Besiedler der Schleimhaut des humanen Kolons. Diese kommensalen Bakterien rufen nur selten Infektionen hervor, es sei denn, es liegt eine Immundefizienz vor oder die gastro-intestinalen Barrieren sind beschädigt (fakultativ pathogen) [9]. Uropathogene *E. coli* (UPEC) sind für den überwiegenden Anteil der unkomplizierten Harnwegsinfekte verantwortlich [11]. Bei Neugeborenen führen neonatale Meningitis auslösende *E. coli* (NMEC) zu Todesfällen und irreversiblen Hirnschädigungen [12].

Der Erwerb von spezifischen Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren ermöglichte *E. coli* die Besiedlung neuer Habitate und brachte mehrere obligat pathogene Stämme hervor [9]. Definierte Kombinationen der Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren haben sich evolutionär durchgesetzt und werden in Pathotypen zusammengefasst. Die Charakterisierung der Pathotypen erfolgt anhand von Oberflächenmerkmalen, speziell den O-Antigenen der Lipopolysaccharide und den H-Antigenen der Flagellen, die zusammen den Serotyp definieren. Bedeutende Gruppen sind unter anderem enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC) und enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC). Der Serotyp O104:H4, der eine genetische Mischform mit Eigenschaften von EHEC-Stämmen und enteroaggregativen *E. coli* (EAEC) darstellt, war im Jahr 2011 für eine Epidemie in Deutschland verantwortlich, die sich durch besonders schwere Verlaufsformen auszeichnete

[13]. Die Bildung von *shiga-like toxin* in Zusammenspiel mit den Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren führte zu einer überdurchschnittlich häufigen Inzidenz des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS). Der typische Verlauf bei dieser Epidemie begann mit der oralen Aufnahme der Bakterien und deren Ansiedlung im Dickdarm. Durch Adhesine an der Bakterienoberfläche wird eine Bindung an die Darmepithelzellen vermittelt. Das von den Bakterien in der Nähe der Darmwand freigesetzte Shiga Toxin STX2 ruft eine Nekrose des Darmepithels hervor, was zum einen wässrigen, hämorrhagischen Durchfall hervorruft und zum anderen den Übertritt des Toxins in die Blutbahn ermöglicht. STX2 schädigt systemisch unter anderem die Endothelzellen kleiner Blutgefäße, wie sie in den Nierenkörperchen zu finden sind. Die durch den Zelluntergang bedingte Abnahme der Filtrationsleistung der Niere führt teilweise zu einem kompletten Nierenversagen. Durch die Wirkungen von STX2 auf Thrombozyten und der damit einhergehenden Gerinnungsstörungen, sowie durch Wirkungen auf das Zentralnervensystem, wird in besonders schweren Verlaufsformen ein Multiorganversagen beobachtet [14].

Die therapeutischen Optionen zur Behandlung von Infektionen, die von *E. coli* ausgelöst werden, variieren je nach Typus der Infektion. Bei der Indikation HUS sind Antibiotika kontraindiziert [15], da eine vermehrte Toxinfreisetzung möglich ist. Harnwegsinfekte hingegen werden leitliniengemäß [15] meist mit einem β-Lactam-Antibiotikum in Kombination mit einem β-Lactamaseinhibitor und seltener mit einer Kombination aus Sulfamethoxazol und Trimethoprim behandelt. Der Einsatz von Fluorchinolonen wird nicht mehr empfohlen, da die genannten anderen Optionen verfügbar sind und Fluorchinolone in Angesicht der Resistenzentwicklung (siehe Kapitel 1.4.1) für schwerwiegendere Indikationen reserviert bleiben sollen.

Mutationen können bei *E. coli* für die Ausbildung von Resistenz verantwortlich sein. Die Häufigkeit mit der Mutationen auftreten, die Mutationsrate, wird physiologisch kontrolliert und reguliert. Die Funktionsweise dieser Mechanismen soll daher nun vorgestellt werden.

1.2 Mutationsrate und DNA-Reparatur in *E. coli*

"*It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.*"

WATSON UND CRICK [16] erkannten bereits vor 61 Jahren einen Mechanismus, mit dem die genetische Information „originalgetreu“ an die nächste Generation weitergegeben werden kann (siehe Abbildung 1.2).

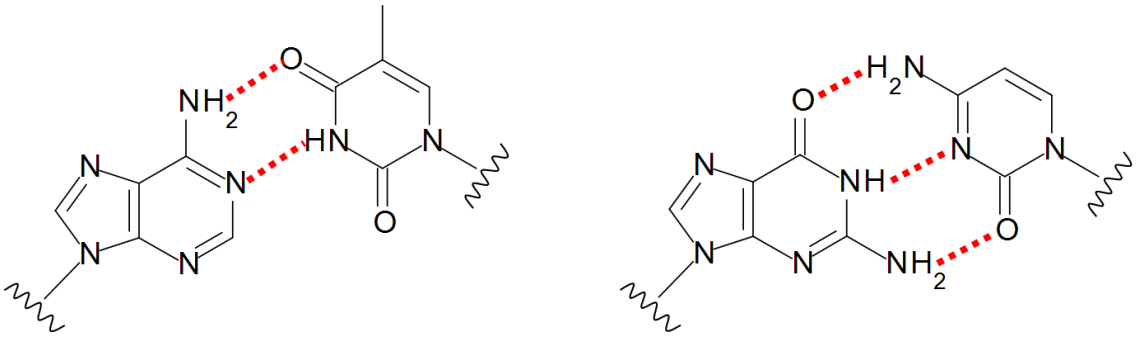


Abbildung 1.2: Komplementäre Basenpaarung; Ausschnitt der Strukturformeln von Adenin und Thymin (links) und von Guanin und Cytosin (rechts); Wasserstoffbrücken in rot eingezeichnet

Die komplementäre Basenpaarung allein reicht jedoch nicht aus, um die Stabilität der genetischen Information zu gewährleisten. Fehlpaarungen können dabei bereits durch Basenpaarung von tautomeren Formen entstehen. Die Enolform von Guanin bildet beispielsweise eine Basenpaarung mit Thymin aus und die Iminoform von Adenin eine Basenpaarung mit Cytosin. In *E. coli* würde die Mutationsrate, wenn sie nur durch die komplementäre Basenpaarung bestimmt würde, bei circa 10^{-5} liegen (pro Basenpaar pro Replikationszyklus) [190]. Tatsächlich liegt die Mutationsrate von *E. coli* im Bereich von 10^{-10}, weshalb es naheliegend ist, dass weitere Mechanismen die Qualität der Weitergabe der genetischen Information mitbestimmen. Drei aufeinanderfolgende Mechanismen sind verantwortlich für die niedrige Mutationsrate: (I) Auswahl der korrekten Base durch die replikative Polymerase, (II) Entfernen falsch eingebauter Basen durch Exonukleasen, die mit der Polymerase assoziiert sind (*proofreading*) und (III) postreplikative Korrektur [17, 190, 192]. Weitere Faktoren haben einen Einfluss auf die Mutationsrate, wenn auch in einem geringeren Umfang. Dazu gehören beispielsweise die *single strand binding* (SSB) Proteine, die während der Replikation das Template stabilisieren [18].

Mutationen sind evolutionär dennoch wichtig, weil sie die Anpassung an veränderte Umwelteinflüsse ermöglichen und die Diversität der Spezies erhöhen [17, 19].

1.2.1 Proofreading der Polymerase III

Die *Proofreading*-Funktion wird in *E. coli* durch die von *dnaQ* codierte, eigenständige ε-Untereinheit der Polymerase III während der Replikation ausgeübt [226]. DnaQ ist Teil des Core-Komplexes der Replikase, die aus den linear verbundenen α-, ε- und θ-Untereinheiten besteht [215]. Die α-Untereinheit wird von *dnaE* codiert und ist für die eigentliche Polymeraseaktivität verantwortlich [20]. Die Funktion der von *holE* codierten θ-Untereinheit ist nicht genau bekannt, doch gibt es Hinweise darauf, dass θ die Funktion von ε unterstützt, den Komplex stabilisiert und die Prozessivität erhöht [215].

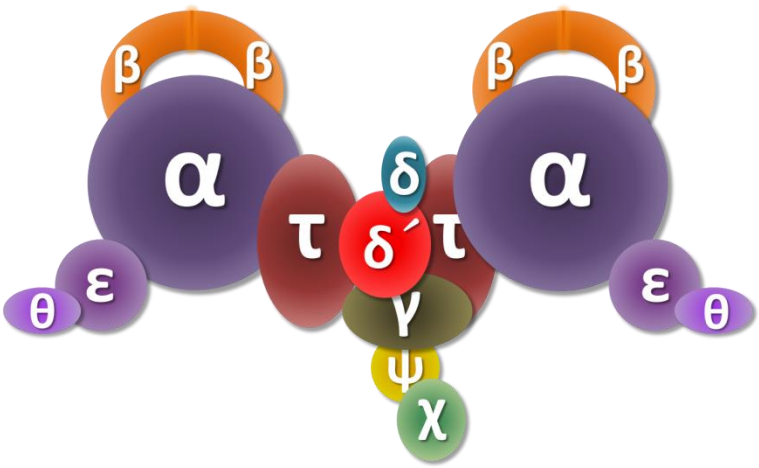


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau des Polymerase III Holoenzyms von *E. coli* mit den verschiedenen Untereinheiten; modifiziert nach [192]; Erläuterungen im Text

Die volle Funktionalität der Polymerase III als Holoenzym am *leading*- und *lagging-strand* wird erst im Zusammenspiel mit weiteren Untereinheiten erreicht. Die vollständige Zusammensetzung des aus zehn verschiedenen Untereinheiten bestehenden Holoenzyms (siehe Abbildung 1.3) ist $(\alpha\varepsilon\theta)_2(\beta_2)_2\tau_2\gamma\delta\delta'\chi\psi$, wobei jede Untereinheit spezifische Funktionen erfüllt [192]. Jeder der beiden Core-Komplexe ist über ein ringförmiges β-Homodimer an die DNA angebunden [21]. Der aus $\tau_2\gamma\delta\delta'\chi\psi$ bestehende DnaX-Komplex enthält das τ-Dimer, das die beiden α-Untereinheiten miteinander verknüpft [22], sodass der *leading*- und der *lagging-strand* simultan repliziert werden können. Die δ- und δ´-Untereinheiten sind wichtig für das Lösen und Binden der β-*sliding-clamp* [23], was insbesondere bei der Synthese der Okazaki-Fragmente am *lagging-strand* von Bedeutung ist [24]. Alle Untereinheiten zusammen ermöglichen es, dass bei der Replikation mehr als 50 kb pro Anlagerung der Polymerase an das DNA-Template synthetisiert werden können, bei einer Geschwindigkeit von bis zu 1000 Basenpaaren pro Sekunde [192].

DnaQ fungiert als 3´-5´-Exonuklease, die präferentiell fehlgepaarte Basen aus dem neu gebildeten Strang der replizierten DNA entfernt [25, 26, 226], da die Bindungsenergien zwischen diesen Paaren niedriger sind. Zwei divalente Metallionen, entweder Mn^{2+} oder Mg^{2+}, sind essentiell für die Reaktion [227] (siehe Abbildung 1.4).

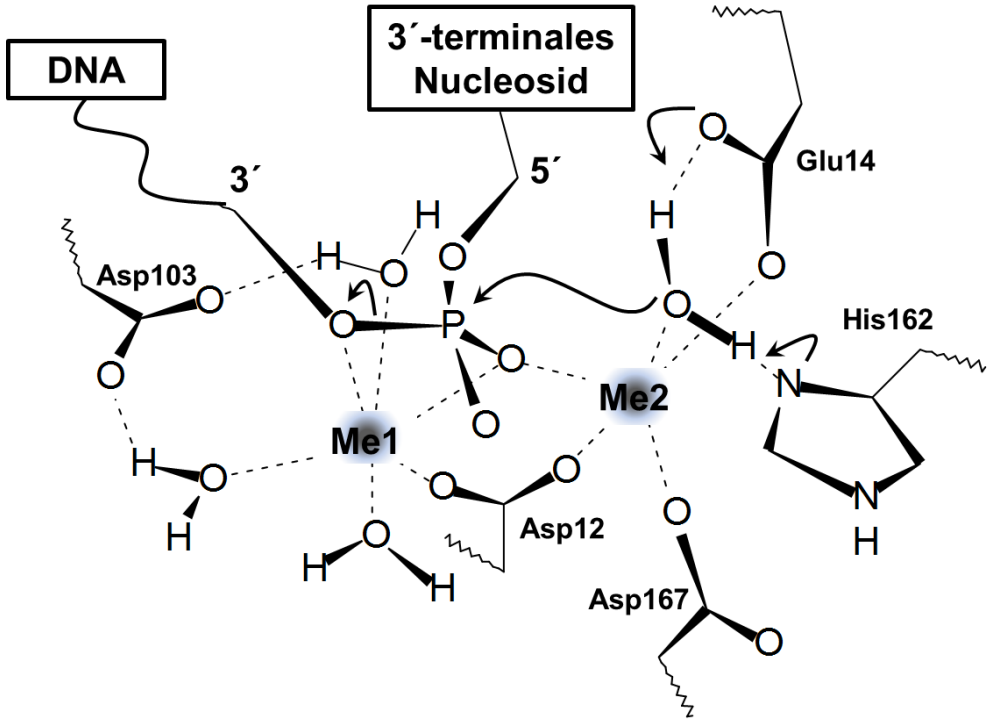


Abbildung 1.4: Reaktionsmechanismus der Epsilon-Untereinheit; modifiziert nach [228]; Me: Metallion, Glu: Glutaminsäure, Asp: Asparaginsäure, His: Histidin; Einzelheiten im Text

His162 von DnaQ deprotoniert ein an das Metallion koordiniertes Wasser und das resultierende Hydroxylanion greift nucleophil eine Phosphodiesterbindung der gebundenen DNA an. Das transiente Phosphoran wird durch Glu14 erneut deprotoniert, wodurch die ehemalige Phosphodiesterbindung gespalten wird. Die Abgangsgruppe wird durch ein über Wasserstoffbrückenbindung an Asp103 gebundenes Wasser protoniert und das abgespaltene Desoxynucleosidmonophosphat koordinativ gebunden [228].

Mutationen an mehreren Positionen von DnaQ (siehe auch Abbildung 3.27) führen zur Ausbildung eines Mutatorphänotyps [27, 162, 143], der durch eine stark erhöhte Mutationsrate definiert ist. Je nach Bindungsaffinität des mutierten DnaQ zur α-Untereinheit der Polymerase III liegen dominante (z.B. *mutD*5, *dnaQ*995) oder rezessive (z.B. *dnaQ*49) Mutatorallele vor [179]. Die Mutation *dnaQ*49 führt zudem zu höheren Mutationsraten bei

steigender Temperatur (Optimum 37°C) und bei Inkubation in reichhaltigem Nährmedium. Die Mutationen betreffen in der Regel den katalytischen N-Terminus und seltener den C-Terminus, der für die Anlagerung an die α-Untereinheit von Bedeutung ist [227, 228, 229]. Mutationen am C-Terminus führen in der Regel (Beispiel *dnaQ*49) zu temperaturabhängigen Mutatorphänotypen, da die Anlagerung dieses Terminus an die α-Untereinheit der Polymerase bei höherer Temperatur stärker gestört wird. Einige Mutatormutationen, wie Veränderungen an Position 12 und 14 (vergleiche Abbildung 3.27), sind nur mit dem Leben vereinbar, wenn zusätzlich kompensatorische Mutationen in *dnaE* vorliegen oder MutL überexprimiert wird [143]. Wird die Expression von *dnaQ* durch Antisense-RNA beeinträchtigt, zeigt sich ein starkes Wachstumsdefizit, dessen Ursache in der verminderten Prozessivität des Polymerase-Holoenzyms liegen könnte [28]. Man geht davon aus, dass eine Restaktivität von DnaQ essentiell für die Lebensfähigkeit ist [29], sofern keine kompensatorischen Mutationen vorhanden sind, wie für bestimmte Mutationen in *dnaE* angenommen [153]. In der Literatur wurde ein Schwellenwert postuliert (circa eine Mutation pro Replikationszyklus in einem essentiellen Gen), ab welchem das Überleben eines Bakteriums (*E. coli*) aufgrund der akkumulierten Mutationen nicht mehr möglich ist [143]. Der Tod infolge der sogenannten *error catastrophe* würde bei *E. coli* mit einer *mutD*5-Mutation (Mutationsrate circa 0,3 Mutationen pro Replikationszyklus in einem essentiellen Gen) demzufolge bereits bei einer dreifachen Erhöhung der Mutationsrate eintreten.

Die bis zu eintausendfache Erhöhung der Mutationsrate durch bestimmte *dnaQ*-Mutationen, wie zum Beispiel die *mutD*5-Mutation [162], kann nicht allein auf die Proofreading-Defizienz zurückgeführt werden. Mehrere Experimente zeigten, dass das auf das Proofreading folgende Mismatch-Repair-System (siehe Kapitel 1.2.2) durch die hohe Fehlerzahl übersättigt ist [27, 29, 30, 189].

1.2.2 Mismatch-Repair

Wird durch die Polymerase III ein Mismatch gebildet und nicht durch DnaQ korrigiert, steht *E. coli* ein postreplikatives Korrektursystem, das *methyl-directed mismatch-repair system* (MDMR), zur Verfügung. Die essentielle Diskriminierung zwischen dem fehlerhaften, neu gebildetem Strang und dem korrekten Template wird durch die transiente Untermethylierung des neu synthetisierten DNA-Strangs vermittelt. Die DNA von *E. coli* wird einige Zeit nach der Replikation am Adenin der Sequenz GATC durch die Dam-Methylase

methyliert [31 , 32]. Direkt nach der Replikation unterscheidet sich folglich der Methylierungsstatus des Template und des synthetisierten Strangs. Der Reaktionsmechanismus des MDMR-Systems ist schematisch in Abbildung 1.5 dargestellt.

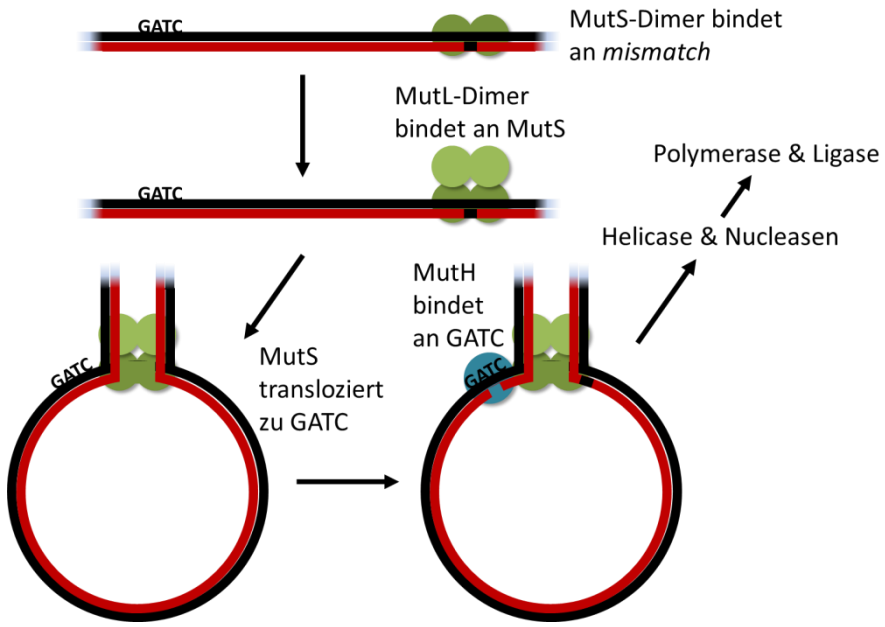


Abbildung 1.5: Ausschnitt aus dem schematischen Mechanismus des MDMR; modifiziert nach [33, 42]; GATC: Methylierungsstelle; MutH, MutL, MutS: Enzyme des MDMR; Einzelheiten im Text

Ein Monomer eines MutS-Dimers bindet spezifisch an eine Fehlpaarung. Es bildet sich ein Komplex mit MutL und ein MutS-Monomer transloziert entlang des Stranges bis es auf eine GATC-Sequenz stößt, wodurch eine Schlaufe in der DNA gebildet wird. Die Endonuklease MutH bindet an den MutSL-Komplex, wird unter ATP-Verbrauch aktiviert und schneidet den unmethylierten DNA-Strang. Der Bereich zwischen der GATC-Sequenz und dem Mismatch wird dann durch RecJ oder die Exonukleasen VII oder I unter Mithilfe der Helicase UvrD entfernt. Die entstandene Lücke wird durch die Polymerase III gefüllt und durch eine Ligase verknüpft [33].

Bestimmte Mutationen in Proteinen des humanen Pendants des MDMR-Systems, die mit einer Funktionseinbuße einhergehen, sind an der Carcinogenese beteiligt [34]. Bei Bakterien können Mutationen in Proteinen des MDMR-Systems zu der Ausbildung eines Mutatorphänotyps führen [35]. Die Prävalenz von *mismatch-repair*-defizienten klinischen Isolaten könnte auf eine Beteiligung dieser Mutatorallele an der Entstehung von Antibiotikaresistenz deuten [36, 37, 38].

1.2.3 Weitere DNA-Reparaturmechanismen

Die effizienteste Methode um DNA-Schäden zu beheben, ist die unmittelbare, auf den lokalen Schaden begrenzte Reparatur, die aber nur für bestimmte Schäden möglich ist. UV-induzierte Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere können zum Beispiel in *E. coli* durch die Photolyase in Gegenwart von Licht einer spezifischen Wellenlänge gespalten werden [39]. O6-Methylguanin kann unter Verbrauch der Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) demethyliert werden und verursacht dadurch keine Fehlpaarungen mehr [40].

Schäden, die nur einen DNA-Strang betreffen, können durch das MDMR (vergleiche Kapitel 1.2.2) behoben werden, sofern nur eine Fehlpaarung vorliegt und die Basen nicht verändert sind. Tritt ein Schaden auf, der die Struktur der DNA ändert, wie zum Beispiel die Dimerisierung benachbarter Thymine, wird die Nukleotidexzisionsreparatur rekrutiert [41]. UvrA bindet dazu an UvrB und führt das Protein zu dem DNA-Schaden. UvrA dissoziiert und UvrC bindet an UvrB. Beide Proteine trennen dann im Abstand von 12 Basenpaaren eine Phosphodiesterbindung der DNA. Die Helicase UvrD entfernt den herausgetrennten Bereich und die resultierende einzelsträngige DNA dient als Template für die Polymerase I. Die Lücke wird gefüllt und durch eine Ligase verknüpft [41, 42].

Schäden, die die Struktur der DNA zu wenig ändern um von UvrA erkannt zu werden, können durch spezifische N-Glykosylasen erkannt werden [43]. Eine Vielzahl an Glykosylasen existiert, die beispielsweise spezifisch für oxidative Schäden, ringoffene Purine oder auch für Uracil sind. Die Glykosylasen trennen die N-glykosidische Bindung der veränderten Base und erzeugen eine abasische AP-Stelle. AP-Endonukleasen führen um dieses Gebiet einen Einzelstrangbruch ein, der wiederum durch die Funktionen einer Exonuklease, der Polymerase I und einer Ligase repariert wird [42].

8-oxo-Guanin entsteht endogen durch reaktive Sauerstoffspezies und dient als Maß für den oxidativen Schaden von Zellen. Für Fehlpaarungen, die durch 8-oxo-Guanin entstehen, existieren in *E. coli* gleich mehrere Mechanismen zur Reparatur und zum Abbau [44]. Die Nucleosidtriphosphatase MutT hydrolysiert 8-oxo-Guanin und entfernt es aus dem dNTP-Pool. Die Glykosylase MutM kann 8-oxo-Guanin aus dem DNA-Strang gegenüber Cytosin entfernen und erzeugt eine AP-Stelle. Diese wird analog zum oben genannten Mechanismus repariert und eine korrekte Basenpaarung gebildet. Persistiert 8-oxo-Guanin und bildet mit Adenin eine Fehlpaarung (siehe Abbildung 1.6) wird das Adenin durch MutY entfernt.

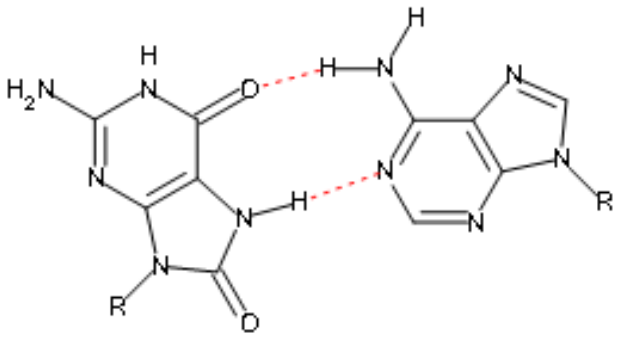


Abbildung 1.6: 8-oxo-Guanin (links) fehlgepaart mit Adenin (rechts); Wasserstoffbrückenbindung in rot; nähere Erläuterungen im Text

Die abasische Stelle wird von Polymerase I präferentiell mit Cytosin belegt, wodurch MutM erneut die Möglichkeit hat 8-oxo-Guanin aus dem DNA-Strang zu entfernen [42]. Der Funktionsverlust einiger dieser Glykosylasen kann ebenfalls einen Mutatorphänotyp erzeugen [45, 46].

Doppelstrangbrüche (DSB) werden in *E. coli* durch verschiedene Mechanismen repariert [42, 47, 48, 49]. Analog zu dem *non-homologous end joining* (NHEJ) der Eukaryoten gibt es bei *E. coli* das *alternative end joining*, das Einzelstrang-DNA mit sehr kurzen homologen Bereichen direkt verknüpfen kann. Dieser Mechanismus ist in der Regel fehleranfällig, trägt aber wesentlich zum horizontalen Gentransfer bei [47].

Ein RecA-abhängiger Mechanismus wird gebraucht, wenn die Polymerase III auf ein Hindernis wie beispielsweise ein Pyrimidindimer stößt [42]. Das Replisom dissoziert dann von der DNA und setzt die Replikation hinter dem Hindernis fort. Zurück bleibt ein Bereich mit einzelsträngiger DNA, an den sich *single strand binding* (SSB) Proteine anlagern. Der RecOR-Komplex lagert sich daran an und vermittelt unter Mithilfe von RecFR die Assoziation von RecA. RecA paart den einzelsträngigen Bereich mit einem homologen, intakten Duplex und ermöglicht das Füllen der Lücken durch eine Polymerase. Im Anschluss wird die gebildete *Holliday-Junction* durch das RuvABC-Resolvasom oder die RecG-Helikase aufgelöst [48, 49]. Steht keine intakte Vorlage zur Verfügung, gibt es die Möglichkeit der *translesion synthesis* (siehe Kapitel 1.2.4) zur Reparatur. Ein weiterer RecA-abhängiger Mechanismus involviert den RecBCD-Komplex, der vor Allem bei einer Arretierung der Replikationsgabel und sekundär daraus entstehenden DSBs von Bedeutung ist [50, 51]. RecBCD bindet an doppelsträngige DNA und entwindet und degradiert diese bis der Komplex auf eine *chi site*

stößt, ein Bereich mit bestimmter, konservierter Sequenz (in *E. coli*: GCTGGTGG). Das Erkennen der spezifischen Sequenz der *chi site* durch RecBCD ändert die Aktivität des Komplexes, wodurch entweder ein Einzelstrang geschnitten wird oder statt des 5´-3´-Strangs der 3´-5´-Strang degradiert wird. In jedem Fall bleibt einzelsträngige DNA zurück. RecBCD vermittelt dann die *strand invasion* und *branch migration* durch RecA wodurch nach Auflösung der *Holliday-Junction* die Replikation neu gestartet werden kann (siehe Abbildung 1.7) [49, 50, 51].

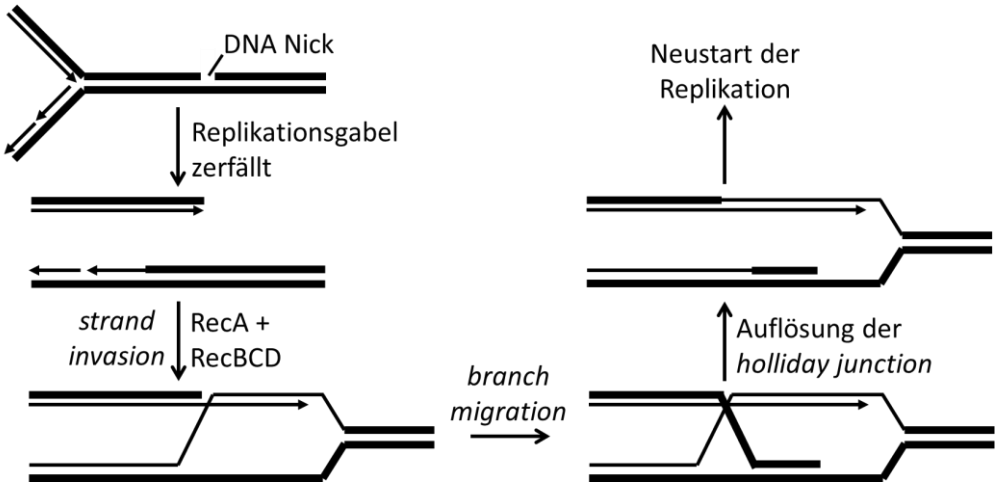


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Neustarts der Replikation nach Reparatur durch RecA-RecBCD; modifiziert nach [50]; nähere Erläuterungen im Text

RecA ist zusätzlich entscheidend an der Aktivierung der prokaryotischen Stressantwort von *E. coli* beteiligt, der *SOS response* (siehe Kapitel 1.2.4).

1.2.4 SOS-Antwort

Die Bindung von RecA an einzelsträngige DNA in Gegenwart von ATP ist nicht nur ein Initiator für die in Kapitel 1.2.3 beschriebenen Reparaturmechanismen. Das aktivierte RecA-Nukleoproteinfilament induziert darüber hinaus die autokatalytische Proteolyse von LexA [52, 53]. LexA inhibiert die Transkription von etwa 70 Genen [54], indem es an eine circa 20 Basenpaare umfassende Sequenz in der Promotorregion dieser Gene bindet, der SOS-Box. Die Proteolyse von LexA dereprimiert die SOS-Gene, darunter auch *recA* und *lexA* selbst. Die Induktion der *recA*-Expression stellt eine ausreichende Menge an RecA für die Reparaturmechanismen und für die quantitative Induktion der LexA-Autoproteolyse bereit. Bilden sich keine RecA-Filamente mehr, ermöglicht die große Menge an LexA-Protein die schnelle Beendigung der SOS-Antwort [42].

Die Gene, die eine SOS-Box in der Promotorregion aufweisen, werden nicht alle gleichzeitig dereprimiert [53]. Wenige Minuten nach Induktion werden zunächst *uvrA*, *uvrB* und *uvrD* vermehrt exprimiert, die für Teile der Nukleotidexzisionsreparatur-Proteine (siehe Kapitel 1.2.3) codieren. In Verbindung mit den RecA-vermittelten Rekombinationsreparaturmechanismen und der induzierten Expression des Zellteilungsinhibitors SfiA wird der Zelle dadurch Zeit eingeräumt um die DNA-Schäden zu beheben [55]. Nach circa 40 Minuten und bei andauernder SOS-Aktivierung werden *error-prone* Polymerasen zur *translesion synthesis* vermehrt gebildet [56]. Vor allem Polymerase V wird nur nach SOS-Induktion in signifikanten Mengen produziert. Dazu wird UmuD in dem Komplex $UmuD_2UmuC$ durch das RecA-Filament gespalten und UmuD´ erhalten. Die aktivierte Polymerase V $(UmuD'_2)UmuC$ weist, wie die übrigen *error-prone* Polymerasen, ein vergrößertes aktives Zentrum auf [192]. Läsionen, die die Polymerase III blockieren, können dadurch prozessiert werden und die Replikation kann fortgesetzt werden. Der Preis der erhöhten Toleranz gegenüber DNA-Schädigungen ist jedoch die Fehleranfälligkeit dieser Polymerasen. Intaktes Template wird von Polymerase V mit einer Fehlerrate von 10^{-1} bis 10^{-3} pro Basenpaar repliziert [54], im Vergleich zu der Fehlerrate von 10^{-10} von Polymerase III (vergleiche Kapitel 1.2). Die erhöhte Fehleranfälligkeit bei anhaltender SOS-Aktivierung ermöglicht eine Anpassung an die stressauslösenden Gegebenheiten und ist an der Entwicklung von Antibiotikaresistenz beteiligt [42, 53, 54, 57, 58].

1.3 DNA-Topologie und Topoisomerasen

Das Chromosom von *E. coli* ist ein ringförmiges Molekül, umfasst circa 4,6 Millionen Basenpaare und enthält mehr als 4300 Gene, die für Proteine codieren [236]. In geöffnetem Zustand hätte dieses Molekül einen Umfang von 1,5 mm und dementsprechend einen Radius von fast einem halben Millimeter. Die Bakterienzelle selbst ist in der logarithmischen Wachstumsphase jedoch nur circa 2 µm lang bei einem Durchmesser von einem Mikrometer [236]. Das Chromosom muss daher stark kondensiert sein, ohne jedoch den essentiellen Zugang von Proteinen zu den darin enthaltenen Informationen zu blockieren.

Durch die Watson-Crick-Basenpaarung [16] ergibt sich ein relaxierter Zustand der DNA bei dem ein DNA-Strang eines Doppelstrangs alle 10,5 Basenpaare den anderen kreuzt. Wird davon abgewichen, entsteht Torsionsspannung in der DNA. Die Torsionsspannung kann abgebaut werden, indem eine Konformationsänderung im dreidimensionalen Raum

durchgeführt wird, zum Beispiel indem die zuvor ringförmige DNA in Form einer Acht vorliegt (siehe Abbildung 1.8).

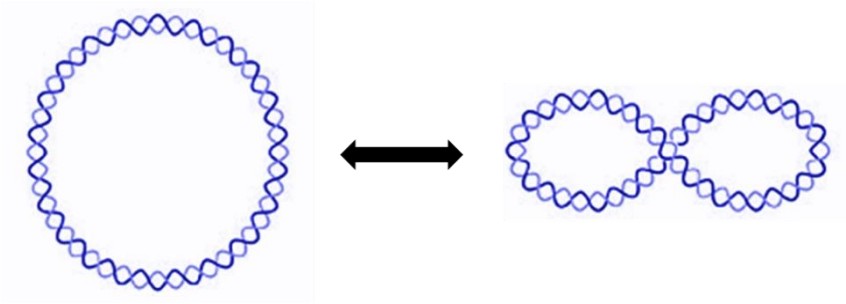


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung relaxierter DNA (links) und superspiralisierter DNA (rechts); modifiziert nach [59]; Erläuterungen im Text

Ein Maß für die Torsionsspannung eines geschlossenen DNA-Moleküls ist die *linking number* [42]. Die *linking number* gibt die Anzahl an, wie oft ein Strang geöffnet und der andere Strang durchgereicht werden müsste, um die beiden Einzelstränge komplett voneinander zu trennen. Um die *linking number* zu ändern muss also eine kovalente Bindung geöffnet werden. Die *linking number* ist definiert als die Summe der *twists* und *writhes*. Der *twist* gibt die Anzahl der Überkreuzungen der beiden Stränge an; der *writhe* die Anzahl der Überkreuzungen des Doppelstrangs im dreidimensionalen Raum (siehe Abbildung 1.9).

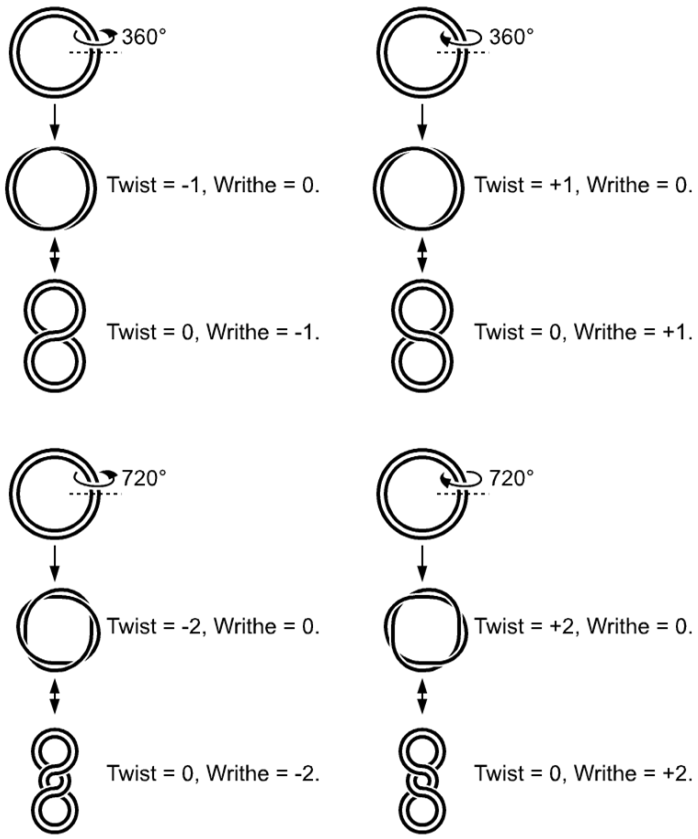


Abbildung 1.9: Schematische Beispiele für verschiedene DNA-Topologien (Änderung von twist und writhe); modifiziert nach [60]; links: negative Superspiralisierung, rechts: positive Superspiralisierung; Erläuterungen im Text

Superspiralisierung liegt folglich vor, wenn die DNA-Doppelhelix selbst spiralisiert ist. Positive Superspiralisierung ergibt sich (*linking number* erhöht), wenn die DNA-Doppelhelix in derselben Richtung im dreidimensionalen Raum superspiralisiert vorliegt wie der Doppelstrang spiralisiert ist, also physiologischerweise im Uhrzeigersinn; umgekehrt ergibt sich negative Superspiralisierung (*linking number* verringert).

Die Superspiralisierung ermöglicht die Kondensierung des Chromosoms und speichert in Form der Strukturspannung Energie, die für viele physiologische Funktionen gebraucht werden kann. Wichtige Funktionen, die von der Superspiralisierung abhängen, sind die Replikation und die Transkription. Beide Vorgänge haben auch selbst einen Einfluss auf die lokale Superspiralisierung [61]. Bei der Replikation entsteht vor der Replikationsgabel durch die Helikase-Funktion ein Bereich mit positiver Superspiralisierung, während hinter dem Replisom negative Superspiralisierung entsteht [62]. Zudem sind die beiden gebildeten DNA-Stränge ineinander verwunden und müssen vor der Teilung der Zelle getrennt werden [236]. Die Bindung von DNA an Proteine und andere Prozesse in der Zelle ändern ebenfalls die

Superspiralisierung und bedürfen der Relaxierung durch spezialisierte Enzyme, die Topoisomerasen.

1.3.1 Topoisomerasen

Topoisomerasen sind Enzyme, die die *linking number* eines DNA-Moleküls durch die Einführung von Einzelstrangbrüchen (Typ I Toposiomerasen) oder Doppelstrangbrüchen (Typ II Topoisomerasen) verändern können [169, 170]. *E. coli* besitzt vier Topoisomerasen (Topoisomerasen I-IV), die aufgrund der transienten, kovalenten Bindung über einen Tyrosinrest an den 5´-Phosphatrest der Desoxyribose alle dem Subtyp A zugeordnet werden.

Topoisomerase I von *E. coli* ist eine Typ Ia Topoisomerase, deren Hauptfunktion die Relaxierung von negativ superspiralisierter DNA ist [63]. Die Anlagerung der Topoisomerase an die DNA trennt den Doppelstrang, woraufhin ein Einzelstrangbruch eingeführt wird. Das 5´-Phosphatende der DNA wird kovalent an Tyr319 des Enzyms gebunden und das 3´-Ende nichtkovalent an einer Nucleosidbinde-Domäne fixiert [169, 170]. Dieser Mechanismus wird *enzyme-bridging model* genannt. Durch Konformationsänderung wird eine Lücke gebildet, durch die der intakte Strang geleitet wird. Nach temporärer Trennung der Proteindomänen und Religation wird der DNA-Strang entlassen und die Topoisomerase kehrt in die Ausgangskonfiguration zurück [169, 170, 171]. Deletionsmutanten des für das Enzym codierenden Gens *topA* weisen stark negative Superspiralisierung auf und können ohne Kompensationsmutanten, zum Beispiel in *gyrB,* nicht isoliert werden [64].

Topoisomerase II (Gyrase) von *E. coli* ist eine heterotetramere (A_2B_2) Typ IIa Topoisomerase und wird von *gyrA* und *gyrB* codiert [65, 66]. Die Funktion der Gyrase ist die Relaxierung positiv superspiralisierter DNA und die Einführung negativer Superspiralisierung, jeweils durch Einführung transienter DNA-Doppelstrangbrüche [67]. Der Reaktionsmechanismus beginnt mit der Bindung eines DNA-Segments (*gate segment*) an die A-Untereinheit, unter Ausbildung einer DNA-Schleife und einer Konformationsänderung, unterstützt durch die B-Untereinheit. ATP-Bindung induziert durch eine weitere Konformationsänderung die Trennung beider DNA-Stränge mit einem 5´-Phosphat-Überhang von vier Basenpaaren [68]. Die Hydroxygruppe von Tyr122 der beiden A-Untereinheiten greift dazu als nukleophiles Agens die 5´-Phosphatgruppen an und die freien 3´-OH-Gruppen der DNA-Stränge werden nichtkovalent fixiert. Ein weiteres Segment desselben DNA-Strangs wird gebunden und nach Konformationsänderung durch den Doppelstrangbruch transportiert (Transfer-Segment).

Der Doppelstrangbruch des *gate segments* wird religiert und die DNA vom Enzym gelöst. Die Gyrase kehrt unter ATP-Verbrauch in die Ausgangskonfiguration zurück [169, 170, 171].

Topoisomerase III ist strukturell mit Topoisomerase I verwandt und gehört wie diese zu Klasse Ia. Der N-Terminus beider Topoisomerasen weist Homologien auf, nicht jedoch der C-Terminus [169]. Das Substrat beider Topoisomerasen ist negativ superspiralisierte DNA, doch ist die Effizienz von Topoisomerase III bei der Auflösung von Precatenanen, die bei der Transkription entstehen, deutlich höher. Topoisomerase III ist in der Lage RNA-Moleküle zu schneiden und zu dekatenieren und assistiert beim Voranschreiten der Replikationsgabel [69, 70]. Diese Topoisomerase ist nicht essentiell, da *topB*-Deletionsmutanten ohne Kompensationsmutationen lebensfähig sind [69].

Topoisomerase IV von *E. coli* weist strukturelle Ähnlichkeiten mit der Gyrase auf und liegt ebenfalls als Heterotetramer (C_2E_2) vor, codiert von den Genen *parC* und *parE* [71, 169]. Während der Replikation entstehende Catenane werden hauptsächlich von der Topoisomerase IV aufgelöst, doch ist das Enzym auch in der Lage negativ superspiralisierte DNA zu relaxieren [69]. Die Prozessivität von Topoisomerase IV ist deutlich geringer als die von Topoisomerase I aber die Relaxierung wird weiter vorangetrieben [72]. Der genaue molekulare Reaktionsmechanismus ist nicht bekannt, ist aber vermutlich vergleichbar mit dem der Gyrase [169, 170].

Physiologisch liegt die DNA in der Zelle negativ superspiralisiert vor und wird durch die gegenläufigen Effekte vor Allem der Topoisomerase I (und IV) und der Gyrase im Gleichgewicht gehalten (homöostatische Kontrolle) [73, 171]. Dies wird erreicht durch unterschiedliche Substrataffinitäten der Enzyme und die reziproke Transkriptionskontrolle [72, 73]. Liegt relaxierte DNA vor wird *gyrA* und *gyrB* vermehrt exprimiert; liegt stark negativ spiralisierte DNA vor wird vermehrt *topA* exprimiert. Die Superspiralisierung zeigt Einfluss auf die Transkription vieler weiterer Gene. Der zugrunde liegende Mechanismus ist unter anderem die Veränderung der Topologie der Bindestelle für die RNA-Polymerase [74, 235, 236]. Die essentielle Funktion der Topoisomerasen wird als Angriffspunkt von Chemotherapeutika und Antibiotika, vor allem den Fluorchinolonen, ausgenutzt.

1.4 Fluorchinolone

Die Fluorchinolone sind eine vollsynthetisch hergestellte Antibiotikaklasse. Vor mehr als 50 Jahren wurde der erste, noch unfluorierte, Vorläufer Nalidixinsäure (siehe Abbildung 1.10) zufällig bei der Synthese des Malariawirkstoffes Chloroquin entdeckt und von LESHER 1962 patentiert [75]. Die schlechte systemische Verfügbarkeit nach oraler Resorption beschränkte den Gebrauch auf die Behandlung von Harnwegsinfekten, ausgelöst durch gramnegative Erreger.

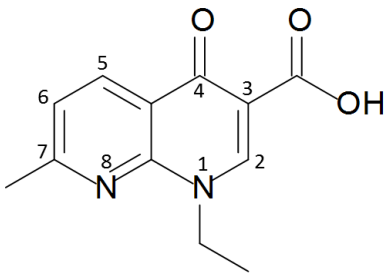
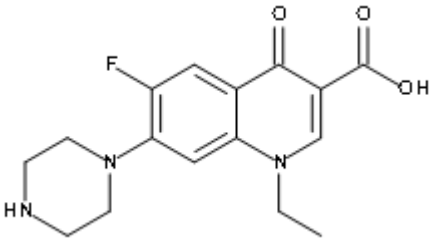


Abbildung 1.10: Chemische Strukturformel von Nalidixinsäure

Gezielte Untersuchungen der Struktur-Aktivitätsbeziehungen ermöglichten die Entwicklung von Derivaten mit erhöhter antimikrobieller Wirksamkeit, besseren pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften und vor allem mit einem erweiterten Erregerspektrum (siehe Tabelle 1.1) [76, 77]. Das Naphthyridingrundgerüst wurde durch ein Chinolingrundgerüst ersetzt, Position 6 des Heterozyklus wurde fluoriert und an Position 7 ein Piperazinylrest angefügt. Dadurch entstand Norfloxacin, das erste Fluorchinolon, mit Wirksamkeit gegen viele gram-negative und einige gram-positive Erreger. Der Ethylrest an Position 1 des Chinolingrundgerüsts wurde anschließend durch Cyclopropyl ersetzt, wodurch die Wirksamkeit und orale Bioverfügbarkeit mit Ciprofloxacin signifikant verbessert wurden (2. Generation). Verbesserte Wirksamkeit gegen Pneumokokken, Pseudomonaden, Anaerobier und andere atypische Erreger wurde durch die Veränderung des N7-Piperazinylrests und durch Substitution an C8 erreicht (siehe Tabelle 1.1) [78, 79].

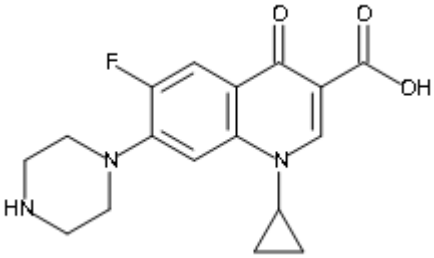
Tabelle 1.1: Entwicklung der Fluorchinolone und deren Eigenschaften bis zur vierten Generation; modifiziert nach [78, 79]

Erste Generation
Norfloxacin



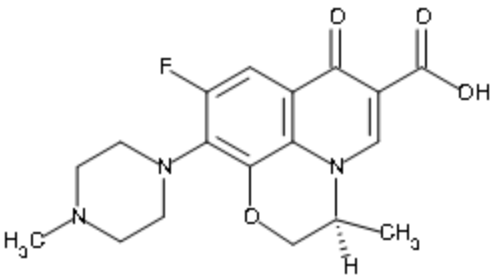
Erregerspektrum: Enterobacteriaceae
Charakteristika: Niedrige Serum- und Gewebekonzentration; Wirksam gegen gram-negative und wenige gram-positive Erreger
Indikationen: Unkomplizierte Harnwegsinfekte; nicht für systemische Infektionen
Weitere Vertreter: Pefloxacin

Zweite Generation
Ciprofloxacin



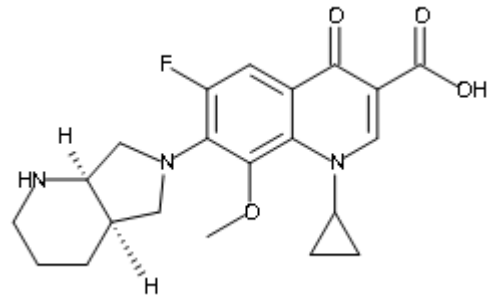
Erregerspektrum: Enterobacteriaceae, atypische Erreger, *P. aeruginosa*
Charakteristika: Höhere Serum- und Gewebekonzentration; orale und intravenöse Gabe
Indikationen: Komplizierte Harnwegsinfekte; Prostatitis, Gastroenteritis, Pneumonien, nosokomiale Infektionen, sexuell übertragbare Krankheiten, Anthrax-Prophylaxe
Weitere Vertreter: Ofloxacin, Enoxacin

Dritte Generation
Levofloxacin



Erregerspektrum: Enterobacteriaceae, atypische Erreger, Streptokokken
Charakteristika: Vergleichbar mit Ciprofloxacin, erhöhte hepatische Eliminierung
Indikationen: Komplizierte Harnwegsinfekte; Prostatitis, Gastroenteritis, ambulant erworbene Pneumonien, nosokomiale Infektionen, sexuell übertragbare Krankheiten
Weitere Vertreter: Sparfloxacin

Vierte Generation
Moxifloxacin



Erregerspektrum: Enterobacteriaceae, atypische Erreger, Streptokokken, Anaerobier
Charakteristika: Vergleichbar mit Ciprofloxacin, weiter erhöhte hepatische Eliminierung
Indikationen: Prostatitis, Gastroenteritis, ambulant erworbene Pneumonien, nosokomiale Infektionen, sexuell übertragbare Krankheiten
Weitere Vertreter: Gatifloxacin, Trovafloxacin

Die Wirkung der Fluorchinolone beruht auf der Bindung an den Komplex aus Gyrase beziehungsweise der Topoisomerase IV und DNA [80 , 81 , 82]. Die Bindung der Fluorchinolone an den Komplex induziert eine Konformationsänderung des Enzyms. Die Topoisomerase bindet kovalent an beide 5´-Phosphatenden der DNA-Stränge und führt dadurch einen transienten DNA-Doppelstrangbruch ein (vergleiche Kapitel 1.3.1). Dieser *cleavage complex* wird in Anwesenheit der Fluorchinolone jedoch stabilisiert und blockiert physiologische Reaktionen wie die Replikation und Transkription. Die Replikationsblockade durch die Fluorchinolone erfolgt bei der Bindung an den DNA-Gyrase-Komplex schneller als bei Bindung an den Komplex aus Topoisomerase IV und DNA [80]. Die Ursache dafür ist, dass die Gyrase hauptsächlich vor der Replikationsgabel arbeitet und die Topoisomerase IV dahinter. Die Stabilisierung des *cleavage complex* ist bei niedrigen Fluorchinolonkonzentrationen reversibel und wird für die bakteriostatische Wirkung verantwortlich gemacht. Hohe Konzentrationen an Fluorchinolonen weisen darüber hinaus vermutlich mehrere davon unabhängige, bakterizide Wirkmechanismen auf [80, 81].

Der *cleavage complex* aus gespaltener DNA, Topoisomerase und Fluorchinolon induziert durch die Entstehung von einzelsträngigen DNA-Bereichen das SOS-System (vergleiche Kapitel 1.2.4). Unvollständige Reparatur durch die SOS-induzierten Enzyme und die damit einhergehende Filamentierung könnten am langsamen Zelltod beteiligt sein [83]. Der schnelle bakterizide Effekt wird zwei unterschiedlichen Mechanismen zugeschrieben, die in Abhängigkeit der Translation auftreten oder unabhängig davon sind. Verschiedene Fluorchinolone scheinen ihre Wirkung bevorzugt durch den einen oder den anderen Mechanismus zu entfalten. Die bakterizide Wirkung von Norfloxacin wird durch den Proteinsyntheseinhibitor Chloramphenicol unterdrückt, nicht aber die Wirkung von Ciprofloxacin und die der neueren Fluorchinolone [80]. Beide Mechanismen beruhen auf der Fragmentierung des Chromosoms durch Freisetzung der gespaltenen DNA aus dem stabilisierten *cleavage complex* [84 , 85]. Die Freisetzung kann entweder durch das Fluorchinolon selbst (translationsunabhängige Dissoziation und Reassoziation von Gryaseuntereinheiten) hervorgerufen werden oder durch Proteinfaktoren. Die Proteinfaktoren können Nukleasen sein, oder Proteine, die die Gyrase proteolytisch abbauen oder denaturieren [80]. Als Ursache für den Zelltod wird die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) postuliert [86]. Es wurde gezeigt, dass die Fluorchinolone die Oxidation von NADH mittels der Atmungskette forcieren [87], die wiederum vom

Citratzyklus abhängig ist. Die Depletion an NADH destabilisiert über Hyperoxide Eisen-Schwefel-Cluster, wodurch Fe^{2+} freigesetzt wird. Eisen(II) wird in der Fenton-Reaktion zu Eisen(III) oxidiert, wobei Hydroxylradikale entstehen, die die DNA, Proteine und Lipide schädigen [86].

1.4.1 Fluorchinolonresistenz

Resistenz gegenüber Fluorchinolonen entsteht schrittweise durch die Akkumulierung mehrerer Mutationen in den verschiedenen Zielstrukturen, Effluxsystemen und auch durch Anwesenheit weiterer Resistenzdeterminanten [88]. Die Anzahl an Resistenzfaktoren korreliert dabei mit der minimalen Hemmkonzentration. Einzelne Mutationen verringern die Empfindlichkeit in unterschiedlichem Maße, doch sind für klinische Resistenz mehrere Mutationen oder Determinanten erforderlich. Zusätzliche Resistenzmutationen treten häufiger auf, wenn bereits chromosomale Veränderungen stattgefunden haben oder plasmidcodierte Resistenzmechanismen vorliegen [88]. Ein typischer Verlauf der Akkumulierung von chromosomalen Resistenzmutationen wird am Ende dieses Kapitels (Unterkapitel 1.4.1.5) dargestellt.

1.4.1.1 Mutationen in den Topoisomerase-Genen

Resistenz gegenüber Fluorchinolonen kann durch Mutationen in deren Zielstrukturen, der Gyrase und der Topoisomerase IV [88, 89, 90], vermittelt werden. Die primäre Zielstruktur ist bei gram-negativen Bakterien die Gyrase und bei gram-positiven die Topoisomerase IV, doch sind meist beide Zielstrukturen für die Wirkung und die klinische Resistenzentwicklung von Bedeutung [90].

In Gegenwart von Fluorchinolonen tritt bei *E. coli* in der Regel zunächst eine Punktmutation in *gyrA*, zwischen den Codons 51 und 106, auf. Dieser Bereich wird als *quinolone resistance determining region* (QRDR) bezeichnet und liegt im Protein in räumlicher Nähe zu Tyr122, der Aminosäure, die das 5´-Phosphatende der DNA bei der Reaktion der Gyrase temporär bindet [88]. Hotspots für Mutationen sind die eigentlich stark konservierten Codons, die für die Aminosäuren 83 (Serin) oder 87 (Asparaginsäure) codieren. Eine Änderung dieser Aminosäuren führt zu einer geringfügigen Erniedrigung der Fluorchinolonempfindlichkeit [88]. Eine Punktmutation am Codon für Ser83 erhöht die MHK deutlicher als eine Mutation am Codon für Asp87 und wirkt sich weniger auf die Gyrasefunktion aus [88, 91, 155]. Eine

moderate Resistenzsteigerung wird bei manchen Spezies durch Akquisition einer zweiten Mutation, meist in *parC* bei den Positionen der Codons für Ser80 oder Glu84, erreicht. Eine dritte oder vierte Mutation der Targets bewirkt einen Anstieg der minimalen Hemmkonzentration über die maximale Serumkonzentration von Ciprofloxacin, und die Stämme sind hochresistent.

Mutationen in *gyrB* können ebenfalls an der Resistenzentwicklung beteiligt sein und betreffen dann die zu den QRDRs von *gyrA* und *parC* in ihrer Funktion vergleichbaren Bereiche zwischen den Aminosäuren 426 und 464. Der Einfluss auf die MHK ist dabei geringer als bei Mutationen in *gyrA* und *parC* und Erstschritt-Mutanten mit Veränderungen in *gyrB* sind selten [88, 92].

In *parE* treten bei gram-negativen Stämmen die wenigsten Mutationen auf, da es unter den verschiedenen Zielstrukturen von untergeordneter Bedeutung ist. Beschrieben wurde eine Punktmutation im Codon der Aminosäure 445 (Leu445His) innerhalb des QRDRs [93]. Der Bereich zwischen den Aminosäuren 395 und 446 von ParE weist hohe Homologie zu dem Bereich zwischen Aminosäuren 401 bis 452 von GyrB auf [93]. Die meisten gefundenen Mutationen liegen außerhalb der QRDR und der genaue Beitrag dieser Mutationen zur Resistenzausbildung ist nicht abschließend geklärt [94].

Bei gram-positiven Bakterien wie *S. aureus* ist die Reihenfolge der sequentiellen Resistenzentwicklung umgekehrt und *parC*-Mutationen treten im ersten Schritt häufiger auf als *gyrA*-Mutationen [90].

Die Gemeinsamkeit der verschiedenen Punktmutationen ist, dass sie die Bindungsaffinität der Fluorchinolone zu dem DNA-Gyrase-Komplex senken [90, 91]. Klinische Isolate und auch *in vitro* generierte Mutanten weisen zusätzlich häufig Mutationen außerhalb der Topoisomerase-Gene auf, die die intrazelluläre Akkumulierung der Fluorchinolone erniedrigen.

1.4.1.2 Verminderte Akkumulierung

Die Akkumulierung der Fluorchinolone in der Bakterienzelle kann prinzipiell durch zwei Mechanismen erniedrigt werden: einen verminderten Influx und einen erhöhten Efflux. Bei *E. coli* können beide Mechanismen gleichzeitig durch Veränderungen im Mar-Regulon (*multiple antibiotic resistance*) aktiviert werden [88, 90, 95, 177]. Eine Deletion in MarR, dem

Repressor des *marRAB*-Operons, bedingt eine vermehrte Expression von *marA*. MarA hat als Transkriptionsaktivator einen Einfluss auf die Expression vieler Gene, die an der Ausbildung eines Resistenzphänotyps beteiligt sind [177]. MarA bindet an spezifische Sequenzen in den regulatorischen Bereichen dieser Gene, die *mar box*. Der Mar-Phänotyp ist durch Resistenz nicht nur gegenüber Fluorchinolonen charakterisiert, sondern auch gegenüber strukturell nicht verwandten Antibiotika wie Chloramphenicol und Tetracyclin.

Verminderter Influx wird durch die MarA-induzierte erhöhte Expression von *micF* erreicht. Das Gen codiert für *antisense-RNA*, die komplementär zum 5´-Ende des *ompF*-Transkripts ist, wodurch dessen Expression erniedrigt wird [88, 90, 95]. OmpF ist in *E. coli* eines der beiden Hauptporine und ein wichtiger Transportweg für die unspezifische Aufnahme, unter anderem der Fluorchinolone, in die Zelle.

Erhöhter Efflux wird unter anderem durch MarA-induzierte vermehrte Expression von *acrAB* und *tolC* erreicht. Das AcrB-Protein ist eine *multidrug efflux pump* aus der RND-Familie [88]. Im Komplex mit dem Membranfusionsprotein AcrA und dem *outer membrane proteine* TolC entsteht ein bedeutendes Effluxsystem für viele Stoffe, darunter auch die Fluorchinolone. Eine Aktivierung des AcrAB-TolC-Systems ist zudem durch Deletionen in AcrR möglich, dem Repressor von AcrAB [88].

In *E. coli* existieren zudem Homologe von MarA, die vergleichbare Effekte hervorrufen [90]. Zu diesen Homologen gehören Rob und SoxS. Letzteres ist im Verbund SoxRS an der Zellantwort auf oxidativen Stress beteiligt [90]. Fluorchinolonresistente *E. coli* weisen sehr häufig einen Mar-Phänotyp in Verbindung mit Targetmutationen auf [90].

Zusätzlich zu den chromosomal codierten Effluxsystemen wurden bei *E. coli* plasmidcodierte Varianten entdeckt, *qepA* und *oqxAB*. Die Effluxpumpe OqxAB wurde auf dem Plasmid pOLA52 lokalisiert und verleiht Resistenz unter anderem gegenüber Olaquindox, einem in der Schweinezucht verwendeten, antibiotisch wirksamen Wachstumsförderer [96]. OqxAB gehört zu der Familie der RND-Effluxpumpen und kommt beispielsweise bei *K. pneumoniae* auch chromosomal codiert vor [88]. QepA, von dem es verschiedene Varianten gibt, ist eine Effluxpumpe aus der MFS-Familie, die durch 14 transmembranäre Segmente charakterisiert sind. Die Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen bis zur zweiten Generation und gegenüber Erythromycin wird durch QepA reduziert [88].

1.4.1.3 Gyrase-Schutzproteine

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ [97] entdeckten 1998 in einem klinischen Isolat von *K. pneumoniae* das Plasmid pMG252, das die Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen geringfügig verringert. Auf diesem konjugierbaren Plasmid wurde ein Gen entdeckt, das für ein *pentapeptide-repeat* Protein codiert. Das im Folgenden als Qnr bezeichnete Protein ahmt die Struktur von DNA nach und kann sowohl an die Gyrase als auch an die Topoisomerase IV, sowie deren jeweilige Untereinheiten binden [98]. Die Bindung ist dabei unabhängig von der Anwesenheit von ATP, superspiralisierter DNA oder Fluorchinolonen.

Charakterisiert ist Qnr durch die tandemartige Wiederholung der Konsensussequenz [Ser, Thr, Ala, oder Val][Asp oder Asn][Leu oder Phe][Ser, Thr, oder Arg][Gly]. Keine der fünf Positionen ist jedoch komplett konserviert. Die Isolierung von Qnr-Proteinen aus verschiedensten Spezies führte zu einer Einteilung der Proteine, je nach Sequenzhomologie, in Familien (QnrA, QnrB, QnrC, QnrD und QnrS) und untergeordneten Varianten (zum Beispiel QnrA1 bis QnrA7) [96].

In Gegenwart von Qnr wird die Gyrase vor der Wirkung von Ciprofloxacin geschützt ohne zwingend an Funktionalität einzubüßen [88]. Der genaue Mechanismus der Schutzwirkung in dem Gyrase-Qnr-Komplex ist nicht bekannt, doch wird die Bindungsaffinität der Gyrase zur DNA reduziert. Es wurde gezeigt, dass weitere Fluorchinolon-Resistenzmutationen in Gegenwart von Qnr gehäuft auftreten und dass sich der Effekt auf die MHK mit dem anderer Mutationen addiert [88].

1.4.1.4 Enzymatische Modifikation von Fluorchinolonen

Die Untersuchung von Qnr-Plasmiden offenbarte einige Jahre nach deren Entdeckung ein weiteres Enzym, das die Empfindlichkeit gegenüber einigen Fluorchinolonen verringert [96, 99]. Es wurde gezeigt, dass der Effekt durch eine Aminoglykosid-Acetyltransferase (AAC) hervorgerufen wird. Dabei handelte es sich um eine Variante von AAC(6´)-Ib, die zwei Punktmutationen aufweist, Trp102Arg und Asp179Tyr. AAC(6´)-Ib acetyliert Tobramycin, Amikacin und Kanamycin, wodurch deren Wirkung verloren geht [96]. Die als AAC(6´)-Ib-cr bezeichnete Variante des Enzyms ist durch die beiden Punktmutationen in der Lage, das sekundäre Amin des C7-Piperazinylrests zu acetylieren. Nur Norfloxacin und Ciprofloxacin weisen diesen Substituenten auf und sind daher auch nur betroffen. Die Gegenwart von

AAC(6´)-Ib-cr erleichtert analog zu Qnr die Akkumulierung weiterer Resistenzmutationen [96, 99]. Der Effekt auf die MHK ist genauso wie bei Qnr gering und führt nicht einzeln zu einer klinischen Resistenz.

1.4.1.5 Akkumulierung von chromosomalen Fluorchinolon-Resistenzmutationen

Fluorchinolonresistenz entsteht bei *E. coli* durch die schrittweise Akkumulierung von Resistenzmutationen. Als Beispiel für einen möglichen Verlauf der Resistenzentwicklung wird die Entstehung von *E. coli* MIII (siehe Kapitel 2.1.1) dargestellt. *E. coli* MIII ging aus einem Wildtyp (*E. coli* WT) hervor, der sequentiell drei Mal mit Fluorchinolonkonzentrationen oberhalb seiner minimalen Hemmkonzentration inkubiert wurde. Eine nach der ersten Selektion charakterisierte Mutante (*E. coli* MI) weist eine *gyrA*-Punktmutation im Codon für Aminosäure 83 auf (S83L). Nach der zweiten Selektion wurde eine Deletion in *marR* in einer von *E. coli* MI ausgehenden Mutante (*E. coli* MII) identifiziert. Die nach dem darauffolgenden Selektionsschritt identifizierte Mutante *E. coli* MIII weist zwei zusätzliche Mutationen (g*yrA* im Codon für Aminosäure 87 (D87G) und in *parC* im Codon für Aminosäure 80 (S80I)) auf. Der beschriebene Ablauf ist in Abbildung 1.11 schematisch dargestellt.

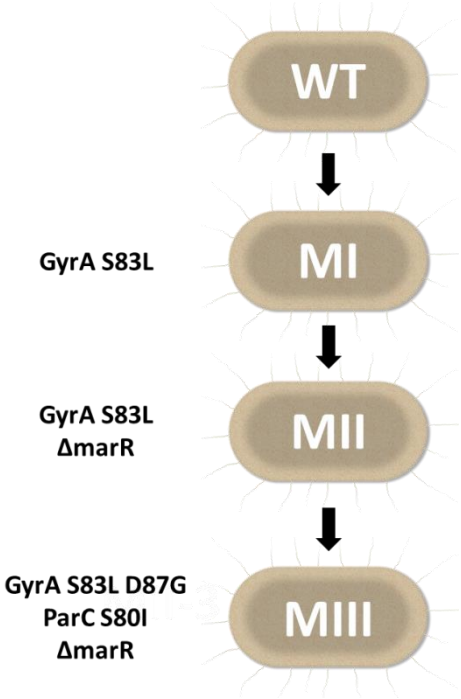


Abbildung 1.11: Entstehung von *E. coli* MIII ausgehend von *E. coli* WT unter Angabe der Fluorchinolon-Resistenzmutationen; Erläuterungen im Text

1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss des Mutatorgens *dnaQ* auf die Entstehung von Fluorchinolonresistenz bei *E. coli* zu untersuchen.

Die Grundlage für die vorliegende Arbeit war die in Kapitel 1.4.1.5 dargestellte simultane Mutation in beiden Zielstrukturen der Fluorchinolone. Die physiologische Mutationsrate von Bakterien wird jedoch durch verschiedene Mechanismen, wie die Basenauswahl der Polymerase, das Proofreading und die postreplikative Korrektur soweit reduziert, dass das zufällige Auftreten einer Doppelmutation äußerst unwahrscheinlich ist. Eine konstitutiv erhöhte Mutationsrate von *E. coli* MII, die die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Doppelmutation erhöhen könnte, liegt nicht vor. Eine mögliche Erklärung dafür, dass solche Mutationsereignisse dennoch festgestellt wurden, könnte eine kurzfristig erhöhte Mutationsrate sein. Die erhöhte Mutationsrate muss aber kompenisert worden sein, da auch in der resultierenden Mutante *E. coli* MIII keine erhöhte Mutationsrate vorliegt.

Es existieren generelle Mechanismen zur Kompensation einer zeitweilig erhöhten Mutationsrate, wie zum Beispiel der Austausch eines Nukleinsäureabschnitts durch Rekombination. Voraussetzung dafür ist, dass der ausgetauschte Nukleinsäureabschnitt für den transienten Mutatorphänotyp verantwortlich ist oder für das dafür verantwortliche Protein codiert. Eine andere Kompensationsmöglichkeit ist eine Mutation in funktionell vor- oder nachgeschalteten Genen mit Kompensationseffekt. So wird beispielsweise die Mutationsrate eines DnaQ-Mutators (*dnaQ*49-Allel) durch bestimmte Mutationen in *dnaE* reduziert (siehe Kapitel 1.2.1.) Eine weitere theoretische Möglichkeit zur Generierung eines transienten Mutatorphänotyps besteht durch eine innerhalb des Bakteriums veränderte Genregulation eines Mutatorgens.

Ein solches Mutatorgen ist beispielsweise *dnaQ*. Durch die Exonuklease-Funktion von DnaQ wird die Mutationsrate um den Faktor 10^2-10^4 reduziert, weshalb in einem ersten Schritt gezeigt werden sollte, welchen Einfluß Mutationen im *dnaQ*-Strukturgen auf die Mutationsrate ausüben. Im Anschluss wurde ein Selektionsversuch mit zwei isogenen Stämmen durchgeführt, die sich nur durch zwei Punktmutationen in *dnaQ* unterscheiden. Die Lokalisation der unterschiedlichen, nach diesem Selektionsversuch identifizierten Fluorchinolon-Resistenzmutationen und die Auswirkung derer auf die

Fluorchinolonempfindlichkeit sollten dann untersucht werden.

Zudem sollte ein kleines Kollektiv fluorchinolonresistenter klinischer Isolate auf die Anwesenheit von Mutationen im Strukturgen von *dnaQ* oder in dessen regulatorischen Bereichen untersucht werden. Dadurch sollte geprüft werden, ob *dnaQ*-Mutationen auch in fluorchinolonresistenten Patienten-Isolaten vorkommen. Für den Fall, dass derartige Mutationen vorkommen, sollten dieses anschließend charakterisiert werden.

Im weiteren Teil der vorliegenden Arbeit sollten die Effekte der erwähnten Doppelmutation an zwei vorhandenen Zwischenstufen (Mutanten *E. coli* MII-3 und *E. coli* MII-4), mit jeweils nur einer einzelnen Mutation untersucht werden [100, 155]. Der globale Spiralisierungsgrad und die Fitness dieser beiden Mutanten sind teilweise stark verändert, ohne dass eine starke Erniedrigung der Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen vorliegt [100, 155, 171]. Hinweise für einen Einfluss der globalen Superspiralisierung auf die Expression von *dnaQ* liegen vor [140]. Daher wurde zum einen der Einfluss verschiedener Fluorchinolonresistenzmutationen auf den globalen Spiralisierungsgrad und zum anderen dessen Einfluss auf die Expression von *dnaQ* unter verschiedenen Bedingungen mittels quantitativer RT-PCR untersucht.

2. Material & Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Enterobacteriaceae der Spezies *E. coli* verwendet. Deren Bezeichnung, Genotyp, interne Nummerierung und Herkunft sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Bakterienstämme

Bezeichnung	GK-Nr.	Charakteristika	Referenz
JM109	623	*end*A1; *rec*A1; *gyr*A96; *thi; hsd*R17 des ; *rel*A1; *sup*E44; #(*lac-pro*AB); [F´ *tra*D36, *pro*AB, *laq*IqZ#M15]	Promega
WT	571	Stuhlisolat eines gesunden Probanden, der nie FQ eingenommen hatte (Wildtyp)	[155]
MII	573	GyrA S83L, Δ*marR* 175 bp (aus WT $Nal_{128\ \mu g/mL}$ und $Cip_{4\ \mu g/mL}$)	[155]
MII-3	645	GyrA S83L D87G, Δ*marR* 175 bp	[100]
MII-4	1222	GyrA S83L, ParC S80I, Δ*marR* 175 bp	[100]
MIII	574	GyrA S83L D87G, ParC S80I, Δ*marR* 74 bp (aus MII $Cip_{16\ \mu g/mL}$)	[155]
MIII-300	733	MIII nach 300 Generationen ohne Selektionsdruck	[101]
WT3	644	GyrA S83L D87G	[155]
WT3-1-M4	903	GyrA S83L D87G, ParC S80R	[102]
MI-4	168	GyrA S83L, ParC S80I	P. Heisig
MIIQ	-	GyrA S83L, Δ*marR* 175 bp, DnaQ T15I E220D	diese Arbeit
MIIQ-CS9	-	wie MIIQ + GyrA D87N, ParC S80R	diese Arbeit
MIIQ-CS10	-	wie MIIQ + GyrA D87N, ParC E84K	diese Arbeit
MIIQ-CS12	-	wie MIIQ + GyrA D87G, ParC S80R	diese Arbeit
MIIQ-CS20	-	wie MIIQ + GyrA D87N, ParC E84K	diese Arbeit
MIIQ-CS23	-	wie MIIQ + GyrA D87G, ParC E84K	diese Arbeit
MIIQ-CS45	-	wie MIIQ	diese Arbeit
MIIQ-CS15	-	wie MIIQ + GyrB S464Y, ParC S80R	diese Arbeit
MIIQ-CS32	-	wie MIIQ + GyrA D87N, ParC S80R	diese Arbeit
Eo80	2791	klinisches Isolat	R. Hope, London
Eo88	2795	klinisches Isolat	R. Hope, London
Eo100	2796	klinisches Isolat	R. Hope, London

Bezeichnung	GK-Nr.	Charakteristika	Referenz
Eo320	2829	klinisches Isolat	R. Hope, London
Eo333	2830	klinisches Isolat	R. Hope, London
Eo342	2831	klinisches Isolat	R. Hope, London
Eo457	2847	klinisches Isolat	R. Hope, London
Eo652	2880	klinisches Isolat	R. Hope, London
Eo977	2955	klinisches Isolat	R. Hope, London
Eo999	2964	klinisches Isolat	R. Hope, London
CSH107	3103	F$^-$, *ara-600, Δ(gpt-lac)5, λ$^-$, relA1, spoT1, thi-1*	[163]
CSH114	3104	F$^-$, *ara-600, Δ(gpt-lac)5, λ$^-$, relA1, spoT1, thi-1, mutT1, rpsL$^-$*	[163]
CSH115	3105	F$^-$, *ara-600, Δ(gpt-lac)5, λ$^-$, relA1, spoT1, thi-1, mutS104::*mini-Tn*10*	[163]
CSH116	3106	F$^-$, *ara-600, yafC502::*Tn*10, dnaQ905, Δ(gpt-lac)5, λ$^-$, relA1, spoT1, thi-1*	[163]
CSH117	3107	F$^-$, *ara-600, Δ(gpt-lac)5, λ$^-$, relA1, spoT1, thi-1, mutY101::*mini-Tn*10, rpsL267*	[163]
JTT1	711	Wildtyp; normaler Qsc	[103]
KD112	712	GyrB226; erniedrigter, negativer Qsc	[104]
RS2	713	TopA10; erhöhter, negativer Qsc	[103]

2.1.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.2 vollständig aufgeführt. Konstruierte Plasmide wurden nach der arbeitskreisinternen Nomenklatur benannt: pHPMPXX-YY (p = Plasmid; HP = Hamburg, pharmazeutische Biologie; MP = Initialen Marco Petschulies; XX = interne Plasmidnummer; YY = eigene Projektnummer)

Tabelle 2.2: Liste der verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Größe [bp]	Charakteristika	Referenz
pBR322	4362	Amp^R, Tet^R	[105]
pUC19	2686	Amp^R, *lacZ*α	Invitrogen
pKD4	3267	Amp^R, Kan^R	[147]
pKD46	6329	Amp^R; *repA*101-ts; *araC*-P*arab*; λ-Red Rekombinasesystem (*gam, bet*, *exo*)	[147]
pACBSCE	ca. 5500	Clm^R, *I-SceI*, λ-Red Rekombinasesystem (*gam, bet*, *exo*)	[149]
pDOC-K	7233	Amp^R, Kan^R, *sacB*, FRT sites	[149]
pHPMP12-01	8532	pDOC-K mit *dnaQ*-Fragment (-534 bis +709) aus *E. coli* K12 CSH116 in *EcoR*I-Schnittstelle	diese Arbeit

Bezeichnung	Größe [bp]	Charakteristika	Referenz
pHPMP12-02	7295	pDOC-K mit *dnaQ*-Fragmenten aus *E. coli* WT vor (-1 bis -45) und hinter (+732 bis +777) Kan^R	diese Arbeit
pHPMP03-01	4700	pBR322 mit *dnaQ*-Fragment (-214 bis +912) aus *E. coli* Eo100 in *Pst*I- und *Cla*I-Schnittstelle	diese Arbeit
pHPMP03-02	4700	pBR322 mit *dnaQ*-Fragment (-214 bis +912) aus *E. coli* Eo320 in *Pst*I- und *Cla*I-Schnittstelle	diese Arbeit
pHPMP03-03	4700	pBR322 mit *dnaQ*-Fragment (-214 bis +912) aus *E. coli* Eo333 in *Pst*I- und *Cla*I-Schnittstelle	diese Arbeit
pHPMP03-04	4700	pBR322 mit *dnaQ*-Fragment (-214 bis +912) aus *E. coli* Eo977 in *Pst*I- und *Cla*I-Schnittstelle	diese Arbeit
pHPMP03-05	4700	pBR322 mit *dnaQ*-Fragment (-214 bis +912) aus *E. coli* MII in *Pst*I- und *Cla*I-Schnittstelle	diese Arbeit
pHPMP03-06	4700	pBR322 mit *dnaQ*-Fragment (-214 bis +912) aus *E. coli* MIIQ in *Pst*I- und *Cla*I-Schnittstelle	diese Arbeit
pHPMP03-07	4700	pBR322 mit *dnaQ*-Fragment (-214 bis +912) aus *E. coli* Eo88 in *Pst*I- und *Cla*I-Schnittstelle	diese Arbeit
pHPMP03-08	4700	pBR322 mit *dnaQ*-Fragment (-214 bis +912) aus *E. coli* Eo342 in *Pst*I- und *Cla*I-Schnittstelle	diese Arbeit
pHPMP03-09	4700	pBR322 mit *dnaQ*-Fragment (-214 bis +912) aus *E. coli* Eo999 in *Pst*I- und *Cla*I-Schnittstelle	diese Arbeit

2.1.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen oder wurden im Arbeitskreis synthetisiert. Die Bezeichnung, Sequenz und der Verwendungszweck sind in Tabelle 2.3 dargestellt. Selbst konstruierte Oligonukleotide wurden in der Regel nach einheitlichen Nomenklaturregeln benannt: (I) Bezeichnung des zur Bindungsstelle nächstgelegenen Gens, (II) Position der Bindung, berechnet ausgehend vom Start des Strukturgens und (III) fw für Bindung am Antisense-Strang oder rv für Bindung am Sensestrang. Aus der Differenz der Bindungspositionen lässt sich die Fragmentgröße berechnen.

Tabelle 2.3: Liste der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Länge [bp]	Sequenz (5´-3´)	Verwendung
ARMS_dnaQ_wt	20	ATCGTTCTCGATACCGACAC	ARMS-PCR
ARMS_dnaQ_mut	20	ATCGTTCTCGATACCGACAT	ARMS-PCR
marR_+7_for	20	AGTACCAGCGATCTGTTCAA	*marR*-PCR
marA_+42_rev	21	ATGAATGGTAATAGCGTCAGT	*marR*-PCR

Bezeichnung	Länge [bp]	Sequenz (5´-3´)	Verwendung
gyrA_5-1	29	CCGAATTCGGGATACAGTAGAGGGATAGC	RFLP, Seq.
gyrA_3-1	27	GGAATTTTGGTTGGCATGACGTCCGGA	RFLP, Seq.
dnaQ_+709_rv_EcoRI	39	GTACGAACGAATTCATTTATGCTCGCCAGAGGCAACTTC	Klonierung
dnaQ_-201_fw_PstI	36	TCCGTAAGCTGCAGAACTCCATACGGTTGTTGGTGG	Klonierung
dnaQ_-534_fw_EcoRI	39	TGATAATCGAATTCCACCCGGCAATGTCGTAAACCACAG	Klonierung
dnaQ_+901_rv_ClaI	36	CTTCTGCAATCGATACAGGCAGGTATTCTAACCGAC	Klonierung
K-FWD+HR+EcoRI	80	TTCGTGCCAGAATTCATTGAATCGAACTGTAAAACGACAAGTCTGACATAAATGACCGCTGACCGGTCAATTGGCTGGAG	Klonierung
P-REV+HR+XhoI	78	TGACGTATCCTCGAGGCAAAAATCGCCCAAGTCGCTATTTTTAGCGCCTTTCACAGGTATAATATCCTCCTTAGTTCC	Klonierung
pDOC-K_+2178_fw	22	CACACAGGAAACAGCTATGACC	PCR
pDOC-K_+2365_rv	21	TACGTGTTCCGCTTCCTTTAG	PCR
dnaQ_+557_fw_RT	18	CTTTTGCGATGGAAGGAG	qRT-PCR
dnaQ_+641_rv_RT	18	ACGCGTAACTTACTTGCC	qRT-PCR
topA_+1677_fw_RT	21	GTGGCAAATCACGAAGCAGAG	qRT-PCR
topA_+1770_rv_RT	21	ATGCTGGTCAGAACCATCTGG	qRT-PCR
gyrA_+1478_fw_RT	23	GCGGAACTGTTGCGTATTCTTGG	qRT-PCR
gyrA_+1549_rv_RT	21	TGGCGGTGATTTCAGTACGAC	qRT-PCR
cysG_+932_fw_RT	22	GCGAAGAGCTGGAAACACTGTG	qRT-PCR
cysG_+1019_rv_RT	23	GAATAGGCAGAGCAACCAGAAGC	qRT-PCR
rpoE_for_+147_EK12	21	CCCTCCCGGAAGATTTACGCA	qRT-PCR
rpoE_rev_+76_EK12	21	TACCGGACAATCCATGATAGC	qRT-PCR
mdoG_+950_fw_RT	20	TCTATTGCAGCGTGGTCGTG	qRT-PCR
mdoG_+1075_rv_RT	20	TTTCCACCAGCTCAACGCTG	qRT-PCR
yegV_+596_fw_RT	20	GTCACTCAATCGTCAAGAGG	qRT-PCR
yegV_+725_rv_RT	20	CCTTCTTTATCGAGGCGAAC	qRT-PCR
yhcM_+877_fw_RT	20	GCCTCTTTCACACGGTCATG	qRT-PCR
yhcM_+1020_rv_RT	20	ATACAGCGGCACTTCTGCAC	qRT-PCR
dnaQ_5´_-56	20	GACTTCCTGTAATTGAATCG	Sequenzierung
dnaQ_-5´_-108	21	CCCAGACACGAACCATCGGTG	Sequenzierung
dnaQ_5´_+346	22	GCGATATTCCGAAGACCAATAC	Sequenzierung
dnaQ_3´_+367	24	GGCTATCGGTGACCTTACAGAAAG	Sequenzierung
dnaQ_3´_+811	22	TTACGGATTGCCTCGACCTTCG	Sequenzierung
dnaQ_-264_fw	22	GACATACTGGCTGTCGGTACTC	Sequenzierung
dnaQ_3´_+781	19	TGCTGCAAAAATCGCCCAA	Sequenzierung

Bezeichnung	Länge [bp]	Sequenz (5´-3´)	Verwendung
gyrA3_5´_+394	22	CATGAACTGATGGCCGATCTCG	Sequenzierung
gyrA4_3´_+1328	22	ACGCCGAACTCTGGCTCCAGCC	Sequenzierung
gyrA5_5´_+1232	22	TTGCTAATCCGTGGCAGCTGGG	Sequenzierung
gyrA6_3´_+2064	22	GGTCAGGTCAACGCCGATCAGC	Sequenzierung
gyrA7_5´_+1972	23	ACTGTCCTCACCGAGTTCAACCG	Sequenzierung
gyrA_+2985_rv	20	CTGCCAGCATATTGCAACGCCC	Sequenzierung
gyrA_+2771_rv	22	CATTCCTTGTGTATAGCCAGCC	Sequenzierung
gyrA_fw_+345	23	TCTGCGGCGGCAATGCGTTATAC	Sequenzierung
gyrA_rv_+1098	23	AGTACGACGGGTCACCACTTCAC	Sequenzierung
gyrA_fw_+963	23	TCCCAGACCCAGTTGCAGGTTTC	Sequenzierung
gyrA_rv_+1768	23	TATGGTCGTGAGTGTTCGCCACC	Sequenzierung
gyrA_fw_+1627	23	TCTCTCACCAGGGCTACGTTAAG	Sequenzierung
gyrA_rv_+2447	23	CCCACGATGCTGATTTCCGAAAC	Sequenzierung
gyrB3_5´_-404	23	GCTGGAACGTAATTTTGAACGCG	Sequenzierung
gyrB4_3´_+423	22	GTGAATTTTACCCTCGCGCTGG	Sequenzierung
gyrB5_5´_-325	22	TATAAAGTGTCCGGCGGTCTGC	Sequenzierung
gyrB6_3´_+1136	24	GCAGCATCGATAATTTTGCCAACC	Sequenzierung
gyrB7_5´_+1059	23	GAACGAACTGCTGGCAGAATACC	Sequenzierung
gyrB8_3´_+1846	23	TCAACGTCGGCTGATAGATAAGC	Sequenzierung
gyrB9_5´_1756	23	GCGACGCAGAAAATGATCAATCG	Sequenzierung
gyrB10_3´_+2611	23	GATTTGCGGGATGATAATTGCGG	Sequenzierung
gyrB_5B9	19	CGTACGCTGAACGCCTACA	Sequenzierung
gyrB_+344_fw	21	TCTGCACGGCGTTGGTGTTTC	Sequenzierung
gyrB_+1192_rv	22	CACCTTTACGGCGGGTCATTTC	Sequenzierung
parC1_3´_+2456	23	GTCACCTGAAATCAGGTTAGGGC	Sequenzierung
parC2_5´_+1537	23	GCTAAAGGCCATGATATCGACGC	Sequenzierung
parC3_+1631_rv	23	ACTACCGGTTGGTTGCTCTTACC	Sequenzierung
parC4_+704_fw	22	GACGTGGTTCAGTGCGTATGCG	Sequenzierung
parC5_3´_+773	22	GGCAATGCGCTGATAACCACCG	Sequenzierung
parC6_5´_-168	24	CAGCAAAGAGTTGTATATCAAGGC	Sequenzierung
parCS_5´_+138	25	GTATGCGATGTCTGAACTGGGCCTG	Sequenzierung
parCU_3´_+373	25	ACCGGGATTCGGTGTAACGCATTGC	Sequenzierung
parC_fw_+1374	22	AACCTGCTGAAGAAAGAACTGC	Sequenzierung
parC_rv_+2394	22	CGCAACGCATGAATAAACAACG	Sequenzierung
parC_rv_+936	21	CATCACCTGATCCATATCCAC	Sequenzierung
parC_fw_+475	20	CCCGTCTGCCAAACATTTTG	Sequenzierung
parC_fw_+1758	22	ATGGAAAGCGACGATCAGAAAC	Sequenzierung
parE11	22	CTGGTCAACATCACCGTCAGGC	Sequenzierung
parE_1569F	20	GCCACCGCTCTACCGTATTG	Sequenzierung
parE_RT_1679R	21	ACGTTCGGCTTGCCTTTCTTG	Sequenzierung

Bezeichnung	Länge [bp]	Sequenz (5´-3´)	Verwendung
parET_5´_+1189	24	TTGCCTGGCAAACTGGCTGATTGT	Sequenzierung
parE3_3´_+1309	21	TCGCCTGATATTCGCGATCGC	Sequenzierung
parE_5´2	22	GCGGTAAACGCAATACTGGTAC	Sequenzierung
parE5_5´_+569	33	GCTTTCAGCACATGCGTCAGGC	Sequenzierung
parE6_5`_-100	22	AACCACGCATTCACGGGCTTCG	Sequenzierung
parE_fw_+1543	23	AACACGGTCACGTTTACGTTGC	Sequenzierung
parE_rv_+2125	23	TGCCTTCGCCGCATACAAAATG	Sequenzierung

2.1.4 Enzyme

In Tabelle 2.4 sind die Enzyme aufgelistet, die in dieser Arbeit Verwendung fanden.

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Enzyme

Enzym	Puffer	Hersteller
DreamTaq® DNA-Polymerase	10x DreamTaq® Puffer	Fermentas
Phusion® HF DNA-Polymerase	5x GC-Puffer	Fermentas, Finnzymes
T4 DNA-Ligase	10x T4 Ligase Puffer	Fermentas
RiboLock® RNase-Inhibitor	-	Fermentas
Lysozym	-	Carl Roth
I-SceI	10x Puffer Tango	Fermentas
Fast AP Alk. Phosphatase	-	New England Biolabs
Exonuklease I	-	Fermentas
FastDigest® *BamH*I	10x FastDigest Puffer	Fermentas
FastDigest® *Cla*I	10x FastDigest Puffer	Fermentas
FastDigest® *EcoR*I	10x FastDigest Puffer	Fermentas
FastDigest® *Hinc*II	10x FastDigest Puffer	Fermentas
FastDigest® *Hind*III	10x FastDigest Puffer	Fermentas
FastDigest® *Hinf*I	10x FastDigest Puffer	Fermentas
*Nhe*I	10x Puffer 3	Fermentas
FastDigest® *Nde*I	10x FastDigest Puffer	Fermentas
FastDigest® *Pst*I	10x FastDigest Puffer	Fermentas
*Sac*II	10x Puffer 3	Fermentas
FastDigest® *Xba*I	10x FastDigest Puffer	Fermentas
FastDigest® *Xho*I	10x FastDigest Puffer	Fermentas

2.1.5 Kommerzielle Komplettsysteme

In dieser Arbeit wurden verschiedene Komplettsysteme oder Bestandteile daraus verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben (den jeweiligen Handbüchern zu entnehmen) und wird teilweise in Kapitel 2.2 beschrieben.

Tabelle 2.5: Liste der verwendeten Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
NucleoSpin® Extract II	Reinigung von PCR-Produkten, Gelextraktion	Macherey-Nagel
NucleoSpin® RNA II	Isolierung von RNA	Macherey-Nagel
HiYield® Plasmid Mini Kit	Isolierung von Plasmiden	Suedlabor
GenomeLab DTCS QuickStart Kit	Sequenzierung	Beckman-Coulter
Maxima® SYBR Green qPCR Mastermix, Rox provided	qRT-PCR	Fermentas
Maxima® Reverse Transcriptase	Reverse Transkription	Fermentas
RNA Protect Bacteria Reagent	Lagerung von Zellen	Qiagen

2.1.6 Puffer & Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.6 inklusive ihrer Zusammensetzung aufgeführt.

Tabelle 2.6: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Isotone Kochsalzlösung	9 g/L NaCl in Millipore®-Wasser, autoklaviert
TE-Puffer	150 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA; pH 8,0
EB-Puffer	10 mM Tris-HCl; pH 8,5
Fällungslösung	2 µL 3 M Natriumacetat pH 5,2, 2 µL 100 mM EDTA, pH 8, 1 µL Glykogen 20 mg/mL
GTE-Puffer	50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 200 µg/mL RNase A; pH 8,0
Lyse-Puffer	200 mM NaOH, 1 % SDS
Neutralisierungspuffer	3 M KAc; pH 4,8
TFB1-Puffer	0,5 g Kaliumacetat, 1g $MgCl_2$, 0,75 g KCl, 1,6 mL 1M $CaCl_2$, 17 mL Glycerin (87 %), H_2O ad 100 mL
TFB2-Puffer	0,1 g MOPS, 3,8 mL 1 M $CaCl_2$, 37,5 mg KCl, 8,5 mL Glycerin (87%), H_2O ad 50 mL
TAE-Puffer (50x)	2 M Trisacetat, 50 mM EDTA; pH 8,0 mit HCl

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
DNA-Ladepuffer (5x)	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 15 % Polysucrose
RNA-Ladepuffer (5x)	0,25% Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 15 % Polysucrose, 3 % Formamid, 7 M Urea, 150 µg/ mL Ethidiumbromid
Ciprofloxacin-HCl-Lösung	10 mg/mL in LiChrosolv-Wasser, sterilfiltriert
Rifampicin-Stammlösung	50 mg/mL in DMSO
Tetracyclin-HCl-Stammlösung	10 mg/mL in absolutem Ethanol
Kanamycinsulfat-Stammlösung	10 mg/mL in LiChrosolv-Wasser, sterilfiltriert
Novobiocin-Stammlösung	10 mg/mL in LiChrosolv-Wasser, sterilfiltriert
Ampicillin-Na-Stammlösung	50 mg/mL in LiChrosolv-Wasser, sterilfiltriert
Chloramphenicol	10 mg/mL in Ethanol 70% (V/V)

2.1.7 Nährmedien

Die für die Anzucht von Bakterien verwendeten Medien sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

Tabelle 2.7: Liste der verwendeten Nährmedien

Medium	Herstellung	Hersteller
Luria-Bertoni Agar	nach Herstellerangaben	Carl Roth
Luria-Bertoni Medium	nach Herstellerangaben	Carl Roth
SOB-Medium	0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$	eigene Herstellung
SOC-Medium	0,5 % Hefeextrakt. 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Glucose	eigene Herstellung
Standard NI Medium	nach Herstellerangaben	Carl Roth
Standard NI Agar	nach Herstellerangaben	Carl Roth
Müller-Hinton Bouillon	nach Herstellerangaben	Carl Roth

2.1.8 Chemikalien

Die verschiedenen Chemikalien, inklusive der Antibiotika, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2.8 aufgeführt. Die Chemikalien lagen in der Regel in der höchsten verfügbaren Qualitätsstufe vor.

Tabelle 2.8: Liste der verwendeten Chemikalien und Antibiotika

Chemikalie	Hersteller
Agar Agar	Carl Roth
Ammoniumchlorid	Merck
Ampicillin-Natrium	Sigma-Aldrich
LiChrosolv® Wasser	Merck
Bacto™ Trypton	Becton Dickinson
Bovines Serumalbumin	Serva
Bromphenolblau	Bio-Rad
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Ciprofloxacin-HCl	Bayer
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Fermentas
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	New England Biolabs
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck
Essigsäure konz.	Acros Organics
Ethanol 70 %	Merck
Ethanol 99,8 %	Merck
Ethidiumbromid 1 % in H_2O	Merck
Ethylendiamin-Tetra-Acetat (EDTA)	Carl Roth
Formamid aq.	Beckman-Coulter
Glucose Monohydrat	Merck
Glycerin 99,5 %	Carl Roth
Glycerin 87 %	Merck
Glykogen	Fermentas
Granulierter Hefeextrakt	Carl Roth
IPTG	Carl Roth
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Kaliumiodid	Merck
Kanamycin	Sigma-Aldrich
L-Arabinose	Fluka
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck
2-Mercaptoethanol	Merck
MOPS	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Carl Roth

Chemikalie	Hersteller
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogensulfat	Merck
Natriumhydroxid	Grüssing
Natriumsalicylat	Carl Roth
Nickelsulfat	Sigma Aldrich
Novobiocin	Sigma-Aldrich
NuSieve Agarose	BMA
PeqGold Universal Agarose	Peqlab
Phenylalanyl-Arginyl-β-Naphthylamid	Sigma-Aldrich
Polysucrose	Sigma-Aldrich
Rifampicin	Sigma-Aldrich
RNase Away	Carl Roth
Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth
Saccharose	Carl Roth
Safranin	Carl Roth
Salzsäure 37 %	Merck
Tetracylin-HCl	Sigma-Aldrich
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris-Base)	Carl Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Harnstoff	Carl Roth
X-Gal	Sigma-Aldrich
Xylencyanol	Merck

2.1.9 Geräte & Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind mit deren Hersteller in Tabelle 2.9 aufgelistet.

Tabelle 2.9: Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller
Autoklav Systec 3870 ELV	Systec
Autoklav Systec Media prep®	Systec
Bioanalyzer 2100	Agilent
BioDoc Analyze Ti5	Biometra
Biovision 1500/ 3M	Vilber
Brutschrank Heraeus Function line	Heraeus

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller
Einmalküvetten 10 mm	Sarstedt
Einmal-Spritzen Omnifix, 10 mL 5 mL	Merck
Elektroporationsküvetten 2mm	Eurogentec
Feinwaage Sartorius LA120S	Sartorius AG
Gelelektrophoresekammer ComPhor Midi	Bioplastics BV
Gelelektrophoresekammer ComPhor Mini	Bioplastics BV
Gelelektrophoresekammer ComPhor Mt Maxi	Bioplastics BV
GenePulser II	Biorad
Glasperlen	Bastelbedarf
Glasstäbe	Glasbläserei Uni HH
Hitzesterilisator	Heraeus
Impföse	VWR
Kryoröhrchen Cryo Pure	Sarstedt
Magnetrührer MR3001	Heidolph
Magnetrührer RCT basic IKAMAG® safety control	IKA-Werke
Microamp Fast 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems
Mikrotiterplatten 96 well	VWR
Milli-Q RiOs™ 5	Millipore
Milli-Q Synthesis	Millipore
Multistep-Pipette Labopette elektronic 50-1000 µL	Hirschmann
Multistep-Pipette Labopette elektronic 50-1200 µL	Hirschmann
Parafilm M	Peske
Petrischalen mit Nocken	Sarstedt
pH-Meter inolab	WTW
Photometer Varian Cary 100 Spectrophotometer	Varian
Pipette LabMate	Abimed
Pipette Pipetman® P10	Gilson
Pipette Pipetman® P100	Gilson
Pipette Pipetman® P1000	Gilson
Pipette Pipetman® P2	Gilson
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen Biosphere	Sarstedt
Probenröhrchen 0,2 ml, Multiply® -Pro	Sarstedt
Probenröhrchen 0,5 ml, Multiply® -Pro	Sarstedt
Probenröhrchen 1,5 mL SafeSeal Micro Tubes	Sarstedt
Probenröhrchen 15 mL	Sarstedt
Probenröhrchen 2 mL SafeSeal Micro Tubes	Sarstedt
Probenröhrchen 50 mL	Sarstedt
Pulse Controller II	Biorad
Qubit® II	Invitrogen

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller
Schüttelinkubator Certomat®	B. Braun Melsungen
Schüttelinkubator New Brunswick Scientific C25	Eppendorf Vertrieb
Sequenzierautomat GenomeLab™ GeXP	Beckman & Coulter
Spannungsgeber Consort E 143	Biozym
Spannungsgeber PS304 Power Supply	Biometra
Spectrophotometer NanoDrop ND-1000	ThermoFisher Scientific
Sterilfilter Minisart 0,2 µm, 26 mm	Sartorius AG
Sterilwerkbank Herasafe®	Heraeus
Thermocycler Biometra T Gradient	Analytik Jena
Thermocycler Biometra T personal	Analytik Jena
Thermocycler Biometra T3	Analytik Jena
Tischzentrifuge MC_6	Sarstedt
Ultraschallbad Merck Eurolab N.V. USR 18	Merck
Verschlussfolie für RT-PCR	Sarstedt
ViiA™7 qRT-PCR	Invitrogen
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage Kern PLJ 2100-2M	Kern & Sohn
Wasserbad Julabo MWB	Julabo
Wasserbad Julabo Shake Temp SW 22	Julabo
Werkbank Heraguard®	Heraeus
Zentrifuge Biofuge stratos	Heraeus
Zentrifuge Microfuge® 16	Beckman-Coulter
Zentrifuge Pico 11 Centrifuge	Heraeus

2.1.10 Software

Die Software, die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist in Tabelle 2.10 aufgeführt.

Tabelle 2.10: Liste der verwendeten Software

Software	Hersteller
Biodoc Analyze Ti5 Software	Biometra
Nanodrop® ND-1000 V3.5.2	Thermo Scientific
Varian Cary Win UV series	Varian
Vector NTI Advance™ 11	Invitrogen
Zotero V4.0.8	George Mason University, USA
Office 2010	Microsoft
ViiA™ 7 Software	Invitrogen
Agilent Bioanalyzer 2100 Software	Agilent

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbewahrung von Bakterienkulturen

Die langfristige Aufbewahrung von Bakterienkulturen erfolgte in Kryoröhrchen bei -80 °C. Dazu wurde ein Milliliter einer Mischung aus gleichen Teilen von Standard N1-Medium und Glycerin 87% (V/V) in ein Kryoröhrchen gefüllt und mit circa 15 Glasperlen versetzt. Das Röhrchen wurde dann autoklaviert (121 °C, 2 bar, 20 min) und nach Abkühlen mit zwei bis drei Bakterienkolonien beimpft. Alternativ wurden dazu 100 µL einer Bakteriensuspension verwendet. Nach Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand ohne die Glasperlen abgenommen und das Röhrchen tiefgefroren.

Mit einer sterilen Impföse wurde eine Glasperle aus dem Röhrchen entnommen und auf einer LB-Agarplatte fraktioniert verstrichen. Bei Bedarf wurde nach Inkubation bei permissiver Temperatur über Nacht eine Kolonie von dieser Platte auf einer Selektivplatte verstrichen werden. Nach erneuter Inkubation über Nacht konnten einzelne Kolonien für entsprechende Versuche verwendet werden. Die inkubierten Agarplatten wurden bei 4 °C aufbewahrt und für höchstens vier Wochen verwendet. Agarplatten, auf denen Mutatorstämme angezogen wurden, wurden in der Regel für jeden Versuch neu angesetzt.

2.2.2 Bestimmung der minimale Hemmkonzentration

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, die Bakterienwachstum verhindert. Die Bestimmung erfolgte nach Standards, die von dem C*linical And Laboratory Standards Institute* (CLSI) erarbeitet wurden [106, 107].

2.2.2.1 Mikrodilutionsverfahren

Die Empfindlichkeitsbestimmung nach dem Mikrodilutionsverfahren wurde mit Mikrotiterplatten durchgeführt, die 96 Kavitäten mit einem Volumen von je 200 µL besitzen. In jede Kavität wurden 50 µL einer geometrischen Antibiotikumverdünnungsreihe mit dem Faktor zwei vorgelegt. Die Antibiotikumstammlösung wurde für die serielle Dilution mit MH-Bouillon verdünnt. Pro untersuchtem Stamm diente eine Kavität als Wachstumskontrolle und wurde mit dem Nährmedium ohne Antibiotikum befüllt. Die auf diese Weise vorbereiteten Mikrotiterplatten können ein bis zwei Tage bei 4 °C gelagert werden oder je nach Antibiotikum für längere Zeit bei -20 °C aufbewahrt werden.

Die Bestimmung erfolgte ausgehend von frisch inkubierten Flüssigkulturen oder LB-Platten. Sterile, isotone Kochsalzlösung wurde dazu mit Bakteriensuspension oder den Kolonien direkt versetzt, bis eine optische Dichte (bei 550 nm photometrisch gemessen) von 0,125 ± 0,02 eingestellt war. Die eingestellte Suspension wurde 1:100 in MH-Bouillon verdünnt. Jeweils 50 µL der Verdünnung wurde in jede Kavität der Mikrotiterplatte gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie verschlossen und für 16-20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte anschließend visuell.

Erfolgte die Bestimmung in Gegenwart eines weiteren Stoffes mit konstanter Konzentration, wurden die eingesetzten Mengen angepasst, sodass die Endkonzentration in den 50 µL der verdünnten Lösungen korrekt war. Alle Bestimmungen wurden zur Kontrolle parallel mit einem Vergleichsstamm durchgeführt, für den die MHK bekannt war.

2.2.2.2 Agardilutionsverfahren

Die Empfindlichkeitsbestimmung mit dem Agardilutionsverfahren wurde für die parallele Einschätzung der Größenordnung der MHK von mehreren Stämmen verwendet. Mehrere LB-Agarplatten wurden dazu mit unterschiedlichen Mengen Antibiotikum versetzt, sodass verschiedene Endkonzentrationen eingestellt waren.

Die zu untersuchenden Kolonien wurden mit einem sterilen Glasstab in je 100 µL MH-Bouillon überführt, der in 48 Kavitäten einer Mikrotiterplatte vorgelegt wurde. Ein Tropfen der über Nacht bei 37 °C inkubierten Suspensionen wurden mit einem 48-zähnigen Replikator in 100 µL sterile, isotone Kochsalzlösung überführt. Der Replikator wurde dann abgeflammt, in die beimpfte Kochsalzlösung getaucht und auf die hergestellten Agarplatten gestellt. Die Agarplatten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und anschließend visuell ausgewertet. Die Bestimmungen wurden wiederum parallel mit einem Vergleichsstamm durchgeführt, für den die MHK bekannt war.

2.2.3 Bestimmung der Keimzahl

2.2.3.1 Photometrische Näherung

In einer Näherung kann die Anzahl an Bakterienzellen pro Milliliter mit dem Photometer ermittelt werden. Dazu wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Nach McFARLAND [108] entspricht ein Messwert von 0,25 circa $3 \cdot 10^8$

Bakterienzellen und ein Wert von 0,5 circa $6 \cdot 10^8$ Bakterienzellen, jeweils pro Milliliter. Zu beachten ist, dass der lineare Messbereich des Photometers begrenzt ist und dass in den Messwert nicht nur lebende Bakterienzellen eingehen.

2.2.3.2 KBE-Bestimmung

Die Bestimmung der Lebendkeimzahl oder der Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wurde mittels einer Verdünnungsreihe durchgeführt. Von der zu untersuchenden Bakteriensuspension wurde eine serielle Verdünnungsreihe mit dem geometrischen Faktor zehn hergestellt. Je nach Experiment wurden 50 µL von vier Verdünnungsstufen zwischen 10^{-1} und 10^{-9} auf Teile einer LB-Agarplatte verstrichen. Die Kolonien, die sich nach Inkubation bei 37 °C über Nacht gebildet haben, wurden gezählt und die KBE mit Formel 1 berechnet:

Formel 1: Formel zu Berechnung der koloniebildenden Einheiten pro Milliliter

$$\mathrm{KBE}\ (\mathrm{mL}^{-1}) = \frac{\text{Anzahl an Kolonien}}{\text{Verdünnungsstufe} \cdot 20 \cdot \mathrm{mL}}$$

2.2.4 Bestimmung der Mutationsrate

Die Mutationsrate wurde mit LB-Agarplatten bestimmt, die Antibiotikum in einer Konzentration enthielten, die über der MHK für den zu untersuchenden Stamm lag. Je nach Antibiotikum und Effekt der erwarteten Mutation, wurde die Antibiotikumkonzentration ausgewählt. Für die Bestimmung in dem Rifampicin-Forwardassay und dem Ciprofloxacin-Forwardassay wurde in dieser Arbeit Antibiotikum in einer Konzentration zugesetzt, die dem vierfachen MHK-Wert entsprach.

Je nach Experiment wurden 50 bis 100 µL einer inkubierten Suspension auf jeder Platte verstrichen. Die Bakteriensuspension wurde in Abhängigkeit der erwarteten Mutationsrate in Nährmedium verdünnt oder konzentriert. Die Konzentrierung erfolgte durch zweimalige Zentrifugation (5 min, 5000 g) und Resuspendierung des Pellets in einem geringeren Volumen an Nährmedium.

Parallel wurde die Lebendkeimzahl analog zu Kapitel 2.2.3.2 bestimmt. Die Agarplatten von der KBE-Bestimmung und die antibiotikumhaltigen Agarplatten wurden nach dem Ausstreichen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Anzahl der gebildeten Kolonien wurde jeweils erfasst und die Mutationsrate aus dem Quotienten der Mutanten und der KBE berechnet.

2.2.5 Bestimmung der Generationszeit

Die Generationszeit von Bakterien beschreibt den Zeitraum, innerhalb dessen sich ein Kollektiv verdoppelt hat und kann aus einer Wachstumskurve berechnet werden. Für die Aufnahme einer Wachstumskurve wurden 150 mL LB-Medium mit 150 µL einer frischen Übernachtkultur inokuliert. Die Suspension wurde bei 37 °C und 130 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Im Abstand von 20 bis 30 min wurde jeweils ein Milliliter der Suspension entnommen und die Keimzahl photometrisch näherungsweise ermittelt (vergleiche Kapitel 2.2.3.1). Anhand dieses Wertes wurden die Verdünnungen für die Bestimmung der Lebendkeimzahl (vergleiche Kapitel 2.2.3.2) ausgewählt. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Die Auftragung des Logarithmus der jeweiligen KBE gegen die Zeit ergab eine Gerade, aus deren Steigung die Generationszeit ermittelt wurde (siehe Formel 2).

Formel 2: Formel für die Berechnung der Generationszeit von Bakterien; KBE: koloniebildenen Einheiten pro Milliliter; Erläuterungen im Text

$$\text{Generationszeit} = \left(\frac{\frac{(\log \text{KBE}_{t2} - \log \text{KBE}_{t1})}{(t_2 - t_1)}}{\log 2} \right)^{-1}$$

Die in dieser Arbeit ermittelten Generationszeiten wurden in dem Zeitintervall (t_2 - t_1) zwischen mindestens drei Messpunkten berechnet, innerhalb dessen die Steigung der Gerade maximal war.

2.2.6 Transfer von DNA

Bakterien können dazu in der Lage sein, DNA aus der Umgebung in die Zelle aufzunehmen. Dieser Vorgang wird als Transformation bezeichnet. Die Effizienz mit der die Aufnahme geschieht, kann durch chemische Zusätze oder durch physikalische Aufbereitung erhöht werden.

2.2.6.1 Transformation mit $CaCl_2$-kompetenten Zellen

Die von HANNAHAN beschriebene Methode [109] erhöht die natürliche Kompetenz der Bakterien zur Aufnahme von DNA durch den Zusatz von Calciumchlorid. Die zweiwertigen Calcium-Ionen lagern sich an die Bakterienmembran an, die eine negative Nettoladung aufweist. Die Permeabilität der Membran wird dadurch erhöht.

Für die Herstellung von $CaCl_2$-kompetenten Zellen wurde LB-Medium in einem Verhältnis von 1:100 mit einer frischen Übernachtkultur inokuliert. Die Suspension wurde bei 37 °C und 130 rpm inkubiert, bis eine optische Dichte (Wellenlänge 600 nm) von 0,5 bis 0,7 erreicht wurde. Die inkubierte Suspension wurde 10 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 4 °C und 5300 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem Zehntel des Ausgangsvolumens an TFB1-Puffer (siehe Kapitel 2.1.6) resuspendiert und wieder 10 min auf Eis gelagert. Im Anschluss an einen weiteren Zentrifugationsschritt unter den gleichen Bedingungen wurde das Zellpellet in einem Fünfzigstel des Ausgangsvolumens an TFB2-Puffer resuspendiert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden Aliquots á 200 µL abgefüllt und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut und mit 50 bis 100 ng Plasmid-DNA versetzt. Der Ansatz wurde zwischen 30 min und vier Stunden auf Eis inkubiert. Die negativ geladene Plasmid-DNA lagerte sich in dieser Zeit an die membrangebundenen Calcium-Ionen an. Die Aufnahme der DNA erfolgte durch einen Hitzeschritt (42 °C, 2min) und anschließendes Abkühlen auf Eis. Der Ansatz wurde dann mit einem Milliliter SOC-Medium versetzt und 40 bis 60 min bei 37°C und 130 rpm inkubiert. In diesem Zeitraum wurde die Plasmid-DNA etabliert und der Resistenzphänotyp ausgebildet. Volumina zwischen 20 und 300 µL der Zellsuspension wurden anschließend auf antibiotikumhaltigen Agarplatten verstrichen und über Nacht bei permissiver Temperatur inkubiert. Die Kompetenz der Zellen wurde durch Transformation mit pBR322 oder pUC19 kontrolliert. Die Lebensfähigkeit der kompetenten Zellen wurde durch Ausstreichen auf antibiotikafreiem Agar überprüft. Ein Aliquot der kompetenten Zellen wurde nicht mit Plasmid-DNA versetzt und diente durch Ausstreichen auf antibiotikumhaltigen Agarplatten als Kontrolle der Selektivität.

2.2.6.2 Elektroporation

Die Elektroporation macht sich zunutze, dass die Permeabilität der Bakterienmembran durch kurzzeitige Hochspannung stark erhöht werden kann [110]. Die Aufnahme von DNA aus der Umgebung ist dann möglich. Die Effizienz der Elektroporation ist dabei regelhaft deutlich höher als die Transformation mit $CaCl_2$-kompenten Zellen.

Zur Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurde eine Übernachtkultur 1:100 in LB-Medium verdünnt. Das Medium wurde bis zu einer OD_{600nm} von ungefähr 0,5 bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen 10 min bei

5300 rpm und 4 °C zentrifugiert und in einem Fünftel des Ausgangsvolumens an eiskaltem dH_2O resuspendiert. Die Zentrifugation wurde wiederholt und das Pellet in einem Zehntel des Ausgangsvolumens wieder aufgenommen. Nach einem dritten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in einem Hundertstel des Ausgangsvolumens an dH_2O aufgenommen, zu 50 µL aliquotiert und auf Eis bis zur Benutzung gelagert. Die Bakteriensuspension sollte durch die Aufbereitung möglichst salzfrei vorliegen, um später Kurzschlüsse zu vermeiden.

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot der elektrokompetenten Zellen mit 10 bis 50 ng DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in trockene, gekühlte Elektroporationsküvetten überführt, die einen Elektrodenabstand von 2 mm aufwiesen. Für circa 4 ms wurde an die Küvette eine Spannung von 2,5 kV angelegt bei 25 µF und 200 Ω. Der Ansatz wurde in ein steriles Reagenzglas überführt und mit 1 mL SOC-Medium versetzt. Nach Inkubation bei permissiver Temperatur für 30 bis 45 min wurden wiederum Teilmengen auf antibiotikumhaltigen Agar verstrichen (vergleiche Kapitel 2.2.6.1).

2.2.7 In vitro Selektion von Mutanten

Die *in vitro* Selektion wurde in dieser Arbeit für die Generierung von ciprofloxacinresistenten Mutanten ausgehend von *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII (vergleiche Tabelle 2.1) eingesetzt. Dazu wurden 250 mL SOB-Medium mit einem Milliliter einer frischen Übernachtkultur versetzt und über Nacht (circa 18 h) bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend 10 min bei 5000 g zentrifugiert und das entstandene Pellet in 25 mL SOB-Medium resuspendiert. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2,5 mL SOB-Medium aufgenommen. Von dieser Suspension wurde die KBE ermittelt (vergleiche Kapitel 2.2.3.2) und je 100 µL auf Agarplatten verstrichen, die 8 µg/mL Ciprofloxacin enthielten. Für diesen Versuch wurden große Agarplatten mit 15 cm Durchmesser verwendet. Die hohe aufgebrachte Zellzahl sollte dadurch nicht zu Wachstum von Kolonien auf Schichten abgetöteter Zellen führen. Die Agarplatten wurden bei 37 °C inkubiert und nach 24, 48 und 72 Stunden betrachtet. Von *E. coli* MIIQ wurden 95 Mutanten in Mikrotiterplatten mit 100 µL LB-Medium pro Kavität überführt und über Nacht inkubiert. Die 95 Mutanten wurden mit *E. coli* MIIQ-CS bezeichnet und anhand ihrer Position auf der Mikrotiterplatte fortlaufend nummeriert.

2.2.8 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese findet Anwendung bei der gezielten Veränderung des bakteriellen Chromosoms. Die Veränderungen können den *knock-out* oder den Austausch eines Gens umfassen. Die Einführung von Punktmutationen, die beispielsweise ein Stopcodon integrieren, ist ebenso möglich. Die gezielte Veränderung des Chromosoms wird in der Regel über Mechanismen erreicht, die der homologen Rekombination ähnlich sind (vergleiche Kapitel 1.2.3).

2.2.8.1 Nach Datsenko und Wanner

DATSENKO und WANNER publizierten 2000 ein System [147] zur ortsspezifischen Rekombination mit dem Rekombinationssystem des Bacteriophagen λ [111]. Werden Teile dieses Systems auf einem Plasmid in *E. coli* eingebracht und exprimiert, entsteht ein Hyperrekombinations-Phänotyp. In *E. coli* ist die Funktion der eigenen Rekombinationssysteme, wie zum Beispiel RecA-RecBCD, stark reguliert, um die genetische Stabilität aufrechtzuerhalten. Die Expression des λ-Rekombinationssystems in Abhängigkeit der Arabinose-Induktion ermöglichte es diese Regulation zu umgehen und die relevanten Proteine vermehrt zu exprimieren. Dazu wurden die Bacteriophagengene *γ*, β und *exo* unter Kontrolle eines arabinose-induzierbaren Promoters in ein Plasmid mit temperatursensitivem ori (*origin of replication*) kloniert. Das entstandene Plasmid pKD46 codiert somit für Gam, Bet und Exo und für eine Ampicillinresistenz als Selektionsmarker. Gam ist ein Helferprotein, das als Dimer an RecBCD bindet, dessen Funktion inhibiert und somit unter anderem die λ-DNA vor dem Abbau schützt. Exo ist eine 5´-3´-Exonuklease die als Trimer einzelsträngige 3´-Überhange generiert. Bet ist die eigentliche Rekombinase des Systems, bindet an einzelsträngige DNA und vermittelt die Renaturierung komplementärer Bereiche und den Strangaustausch.

Die Vorlage für den Strangaustausch wurde mittels PCR erzeugt (vergleiche Kapitel 3.2.1) und enthielt an beiden Fragmentenden Sequenzen, die komplementär zu Bereichen vor und nach *dnaQ* waren. Der mittlere Abschnitt des Fragments stellte eine aus pKD4 amplifizierte Kanamycinresistenzkassette dar, die von zwei *FRT-sites* flankiert war. Die Resistenzkassettte diente als Selektionsmarker und die *FRT-sites* sollten ermöglichen, dass diese nach der Rekombination in Gegenwart einer Flippase entfernt werden. Das lineare Template wurde mittels Elektroporation in *E. coli* MII eingebracht, der zuvor mit dem Rekombinationsplasmid

pKD46 transformiert wurde. Bei der Herstellung der elektrokompetenten Zellen (vergleiche Kapitel 2.2.6.2) von *E. coli* MII mit pKD46 wurde ab einer OD_{550nm} von 0,4 Arabinose zugegeben, um das Rekombinationssystem zu exprimieren. Nach der Elektroporation (vergleiche Kapitel 2.2.6.2) wurde der Ansatz 30 min lang bei 30 °C inkubiert um anschließend bei dreißigminütiger Inkubation bei 37°C das Plasmid zu entfernen. Der Ansatz wurde auf kanamycinhaltige Agarplatten (50 µg/mL) gestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei erfolgreicher Rekombination kann die Kanamycinresistenz durch Transformation der Zellen mit dem Plasmid pCP20 und Expression der Flippase bei 43 °C über Nacht entfernt werden. Dabei bleibt eine kurze Narbensequenz anstelle der Resistenzkassette zurück.

2.2.8.2 Gene Gorging

HERRING *et al* [148] entwickelten das bisherige System weiter, indem der ineffizienteste Schritt entfernt wurde, die Elektroporation eines linearen DNA-Fragments. Bei dem weiterentwickelten Verfahren wird das Plasmid pACBSR verwendet, das neben den λ-Red-Genen und einer Ampicillinresistenz, die Meganuklease *I-SceI* exprimiert. Die Meganuklease funktioniert prinzipiell wie ein konventionelles Restriktionsenzym, benötigt aber eine deutlich längere Schnittstellensequenz (siehe Abbildung 2.1).

```
5'...T A G G G A T A A↓C A G G G T A A T...3'
3'...A T C C C↑T A T T G T C C C A T T A...5'
```

Abbildung 2.1: Schnittstellensequenz von *I-SceI*

Die 18 bp umfassende Restriktionsschnittstelle kommt im Chromosom von *E. coli* nicht vor, wodurch dieses bei Expression der Meganuklease nicht fragmentiert werden kann.

Das Template für die Rekombination wurde durch Amplifizierung des Bereichs von *dnaQ* hergestellt, der die einzuführende Punktmutation enthielt (vergleiche Kapitel 3.2.1). Das PCR-Fragment wurde in pUC19 kloniert, wobei mittels des Forward-Primers (vergleiche Tabelle 2.3) die Restriktionsschnittstelle von *I-SceI* mit eingeführt wurde.

E. coli MII wurde anschließend mit dem erhaltenen Plasmid und dem Rekombinationsplasmid pACBSCE (vergleiche Kapitel 2.2.8.3) transformiert. Eine Kolonie dieses Stammes wurde in 1 mL SOB-Medium suspendiert, das 10 µL einer Arabinose-Lösung

20 % (m/V), 100 µg/mL Ampicillin und 35 µg/mL Chloramphenicol enthielt und sieben Stunden bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Arabinose induzierte in diesem Zeitraum die Expression des Rekombinationssystems und der Meganuklease. Die Meganuklease erzeugte dann durch Restriktion des Templateplasmids das lineare Fragment für die Rekombination. Die Suspension wurde anschließend auf LB-Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels sequenzspezifischer PCR (Kapitel 2.2.16.1) überprüft.

2.2.8.3 Gene Doctoring

LEE *et al* [149] entwickelten das *Gene Gorging* in zweierlei Hinsicht nochmals weiter. Das Rekombinationsplasmid pACBSCE (siehe Abbildung 2.2 rechts) enthält neben den λ-Red-Genen, einer Chloramphenicolresistenz und der Meganuklease *I-SceI* zusätzlich eine Schnittstelle für die Meganuklease. Das Ausgangsplasmid für das Template, pDOC-K (siehe Abbildung 2.2 links), weist außerdem das Gen *sacB* auf, das für eine Levansucrase codiert. In Gegenwart von Saccharose bildet das aus *B. subtilis* stammende SacB sogenannte Levane, welche für *E. coli* toxische Zuckerderivate darstellen [112].

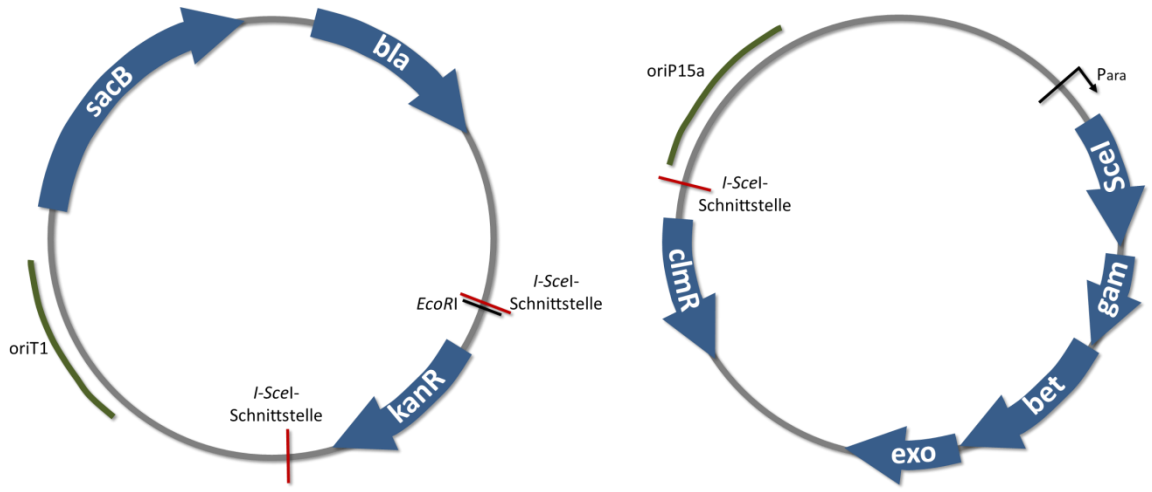


Abbildung 2.2: Schematische Plasmidkarten von pDOC-K (links) und pACBSCE (rechts); ori: origin of replication; gam, bet, exo: Gene des λ-Red Rekombinationssystems, sacB: Gen für die Levansucrase; P_{ara}: Arabinose-induzierbarer Promotor, bla: Beta-Lactamase, kanR: Kanamycinresistenzkassette; weitere Erläuterungen im Text

Das Templateplasmid pHPMP12-01 wurde durch Klonierung eines circa 1300 bp großen, *dnaQ*-umfassenden Bereichs aus *E. coli* K12 CSH116 in die *Eco*RI-Schnittstellen von pDOC-K hergestellt (siehe Kapitel 3.2.2). *E. coli* MII wurde anschließend mit pHPMP12-01 und pACBSCE transformiert.

Eine Kolonie dieses Stammes wurde in einem Milliliter LB-Medium suspendiert, in welchem 100 µg/mL Ampicillin, 50 µg/mL Kanamycin, 35 µg/mL Chloramphenicol und 0,5 % Glukose enthalten waren. Glukose verhindert eine *leaky expression* (Expression ohne Aktivierung) der λ-Red-Gene und der Meganuklease. Die Suspension wurde zwei Stunden bei 37°C und 130 rpm inkubiert und anschließend 5 min bei 5000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal in einem Milliliter LB-Medium gewaschen, erneut zentrifugiert und in einem Milliliter LB-Medium mit 0,5 % Arabinose aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde dann für vier Stunden bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. In diesem Zeitraum wurden durch die Arabinose-Induktion Gam, Bet und Exo gebildet und gleichzeitig das lineare Template durch Restriktion von pHPMP12-01, vermittelt durch *I-SceI*, generiert. Durch die *I-SceI*-Restriktion von pHPMP12-01 konnte das Plasmid nicht repliziert werden und die Tochterzellen enthielten das Plasmid nicht mehr. Die Anwesenheit einer Restriktionsschnittstelle auf pACBSCE führte zu einem Abbau des Rekombinationsplasmids während der Inkubation. Vor der Restriktion wurde bereits eine ausreichende Menge an Gam, Bet und Exo gebildet, um die Rekombination durchzuführen. Der zeitnahe Verdau des Rekombinationsplasmids verhinderte einen dauerhaften Hyperrekombinationsphänotyp mit damit einhergehenden, möglichen unerwünschten Rekombinationen.

Verdünnungen der Bakteriensuspension wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit 5% Saccharose verteilt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Gesetz dem Fall, dass pACBSCE durch die Restriktion nicht vollständig entfernt wurde, findet eine Expression der darauf codierten Levansucrase statt. Die Bildung von Levanen führte in solchen Zellen zum Tod und nur Bakterienzellen ohne pACBSCE bildeten Kolonien. Die erhaltenen Kolonien wurden auf Abwesenheit beider Plasmide geprüft und der Erfolg der Rekombination mittels sequenzspezifischer PCR kontrolliert (siehe auch Kapitel 2.2.16.1 und Kapitel 3.2.4).

2.2.9 Morphologische Betrachtung von Bakterien

E. coli weist eine Länge von 2 µm bei einem Durchmesser von circa einem Mikrometer auf und lässt sich daher lichtmikroskopisch begutachten. Die Form des Bakteriums ist bei 1000-facher Vergrößerung mit einem Ölimmersionsobjektiv zu erkennen. Die Lichtmikroskopie wurde in dieser Arbeit verwendet um mögliche Veränderungen der Zellform durch Filamentierung aufzudecken. Die Anwesenheit von unerwünschten gram-positiven Bakterien (als Verunreinigung) konnte dadurch ebenfalls geprüft werden.

Bei der Gram-Färbung [152] wurden im ersten Schritt alle Bakterien mit dem basischen Karbol-Gentianaviolett angefärbt. Dazu wurde ein Tropfen der Lösung auf einen Objektträger gegeben, auf dem eine eingetrocknete Bakteriensuspension mit einer Flamme fixiert wurde. Nach 15 Sekunden wurde ein Tropfen Lugol´scher Lösung hinzugegeben, wodurch sich innerhalb der zweiminütigen Inkubation große, dunkelblaue Farbstoffkomplexe bildeten. Der Objektträger wurde mehrfach kurz mit Ethanol 96% (V/V) bedeckt. Gram-negative Bakterien wurden dadurch entfärbt, wohingegen der Farbstoffkomplex bei gram-positiven Bakterien in den Zwischenräumen der auf die Membran aufgelagerten Mureinschicht persistieren würde. Der Objektträger wurde mit Leitungswasser vorsichtig abgespült und das Präparat eine Minute lang mit Safranin-Lösung inkubiert. Gram-negative Bakterien wurden durch diesen Schritt rot-orange gefärbt. Der Objektträger wurde abschließend mit Filterpapier getrocknet und ein Deckgläschen aufgelegt.

Für die Mikroskopie wurde ein Tropfen eines Spezialöls auf das Präparat gegeben, das Unschärfen durch unterschiedliche Brechungsindices verhindert. Das Ölimmersionsobjektiv wurde dem Präparat so weit angenähert, dass sich eine Flüssigkeitsbrücke zwischen dem Präparat und dem Objektiv ausbildete. Das verwendete Okular vergrößert zehnfach, wodurch im Zusammenwirken mit dem 100-fach vergrößernden Objektiv eine 1000-fache Vergrößerung erzielt wurde.

2.2.10 Isolierung von Nukleinsäuren

Isolierte Nukleinsäuren dienten in dieser Arbeit als Vorlage für eine Vielzahl von Experimenten, wie der Polymerasekettenreaktion (Isolierung nach 2.2.10.2), der Transformation (Isolierung nach 2.2.10.4 oder nach 2.2.10.3) oder der reversen Transkription (Isolierung nach 2.2.10.1).

2.2.10.1 Isolierung von RNA (Nucleospin® RNA II Kit)

Neben der Trennung von DNA und Proteinen ist es bei der Isolierung von RNA von großer Bedeutung die Integrität der Probe zu wahren. RNA-degradierende Enzyme, RNasen, kommen ubiquitär auf nahezu allen Oberflächen vor und wurden durch Behandlung aller Materialien und Geräte mit RNase-Away® entfernt. Die Lagerung von RNA-Proben bei -80 °C minimierte zudem die Restaktivität von nicht entfernten RNasen.

Das Zellmaterial für die RNA-Isolierung [113] wurde durch Inkubation von 50 mL LB-Medium bis zum Erreichen der gewünschten OD_{600nm} gewonnen (vergleiche Kapitel 2.2.3.1). Ein Volumen von 500 µL der Bakteriensuspension wurden 5 min mit einem Milliliter RNA Protect® Bacteria Reagent bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend 10 min bei 5000g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet maximal einen Monat bei -80°C gelagert.

Für die Isolierung wurde das aufgetaute Pellet in 100 µL TE-Puffer (Tris/EDTA) mit 2 µg/mL Lysozym resuspendiert und durch Inkubation für 10 min bei 37 °C aufgeschlossen. Zu dem Ansatz wurden 350 µL RA1-Puffer und 3,5 µL 2-Mercaptoethanol gegeben. Die chaotropen Salze in dem Puffer inaktivieren RNasen und 2-Mercaptoethanol zerstört übergeordnete Proteinstrukturen durch das Lösen von Disulfidbrücken. Die Viskosität und die Trübung des Ansatzes wurden durch Zentrifugation in einer Säule für eine Minute bei 11000 g reduziert. Der Durchfluss wurde mit 350 µL Ethanol 70% (V/V) versetzt, wodurch geeignete Bedingungen für die Bindung der Nukleinsäuren an eine zweite Silicamembran-Säule geschaffen wurden. Maximal 750 µL der Lösung wurden dazu in die Säule transferiert und für 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert. Alle Nukleinsäuren waren danach an die Säule gebunden. Nach Zugabe von 350 µL MDB-Puffer wurde wieder für eine Minute zentrifugiert, wodurch die Säule entsalzt wurde. Genau 95 µL einer zehnprozentigen rDNase-Lösung im entsprechenden Puffer (*Rxn-buffer for rDNase*) wurden auf die Säule gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert um die DNA möglichst quantitativ abzubauen. Die Aktivität der rekombinanten DNase wurde durch Zugabe von 200 µL RA2-Puffer und einminütiger Zentrifugation beendet. Die an die Membran gebundene RNA wurde mit 600 µL RA3-Puffer gewaschen und 30 s zentrifugiert. Anschließend wurden 250 µL RA3-Puffer zugegeben und die Membran durch Zentrifugation für 2 min bei 11000 g getrocknet. Die Säule wurde in ein neues Sammelgefäß überführt und die RNA durch zweiminütige Zentrifugation mit 60 µL RNase-freiem Wasser eluiert. Die Ausbeute wurde durch erneute Zentrifugation mit dem Eluat erhöht. Die aliquotierte RNA-Lösung wurde bei -80 °C gelagert und nach einmaligem Auftauen nicht wieder verwendet.

2.2.10.2 Isolierung chromosomaler DNA (Koch-Methode)

Eine einfache aber wenig spezifische Methode zur Isolierung chromosomaler DNA bietet die Koch-Methode. Dazu wurden drei bis fünf Kolonien einer über Nacht mit Bakterien

inkubierten Agarplatte in 100 µL dH_2O transferiert. Die Suspension wurde 15 min bei 100°C im Thermocycler inkubiert und anschließend 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Die hohe Temperatur lysierte die Zellen und setzte die DNA frei, welche dann in Lösung ging. Zellwandbestandteile und andere Proteinkomplexe wurden durch Zentrifugation abgetrennt.

2.2.10.3 Alkalische Lyse

Die alkalische Lyse [114] nutzt die unterschiedliche Konformation und das unterschiedliche Verhalten von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA bei verschiedenen pH-Werten für eine Trennung der beiden Nukleinsäurespezies.

Für die Plasmidisolierung wurden 3 mL LB- oder SOB-Medium mit einer Kolonie des plasmid-enthaltenden Stammes beimpft und über Nacht unter Selektionsdruck inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 3 min bei 5000 g zentrifugiert und das Pellet in 100 µL kaltem GTE-Puffer resuspendiert. Die in dem Puffer enthaltene RNase entfernte im Verlauf der Isolierung freigesetzte RNA. EDTA sorgte bei diesem Puffer für die Komplexierung zweiwertiger Kationen, wodurch unter anderem die Bakterienzellwände destabilisiert wurden. Ein Volumen von 200 µL Lysepuffer, der Natrium-Dodecylsulfat (SDS) und Natronlauge enthielt, wurden dem Ansatz zugefügt. Während der maximal dreiminütigen Inkubation auf Eis lysierte SDS die Bakterienzelle und die Natronlauge denaturierte die freigesetzten Nukleinsäuren und Proteine. Die Zugabe von 150 µL Neutralisationspuffer ermöglichte eine Renaturierung der Plasmid-DNA, nicht aber der chromosomalen DNA, die nicht in Lösung gehen konnte. Das in dem Puffer enthaltene Kaliumacetat führte in dem sauren Milieu zu einer Ausfällung von Kaliumdodecylsulfat und entfernte das Detergenz damit aus der Lösung. Zelltrümmer, Proteinkomplexe und chromsomale DNA wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 15000 rpm abgetrennt. Vorsichtig wurden 400 µL des Überstands in ein neues Gefäß überführt, ohne das Präzipitat zu verschleppen. Nach diesem Schritt wurde bei Bedarf eine Phenol-Chloroform-Extraktion (vergleiche Kapitel 2.2.11.2) durchgeführt, um Proteine besser zu entfernen. Zur Konzentrierung der DNA wurde 2 min mit 800 µL Ethanol 99,9% (V/V) inkubiert und 25 min bei 20000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in einem Milliliter Ethanol 70% (V/V) aufgenommen und erneut 5 min bei 20000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstand wurde das Pellet bei 37 °C

getrocknet und anschließend in 15 bis 30 µL e*lution buffer* (10 %) resuspendiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.10.4 HiYield® Plasmid Mini Kit

Das HiYield® Plasmid Mini Kit funktioniert nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Zusätzlich wird sich zunutze gemacht, dass Plasmid-DNA in Gegenwart von chaotropen Salzen an die Glasfasermatrix von Säulen binden kann. Das erhaltene Produkt war weniger verunreinigt als bei der alkalischen Lyse und die Ausbeute war nicht signifikant schlechter. Der Zeitaufwand wurde durch Verwendung des Kits etwa halbiert und es war ohne Zusatzbehandlungen möglich, Plasmide aus Stämmen zu isolieren, die Nukleasen exprimieren. Daher wurde diese Methode gewählt, wenn besondere Reinheit erforderlich war oder der Stammhintergrund die Isolierung erschwerte.

Die Isolierung erfolgte nach den Herstellerangaben der Bedienungsanleitung [115]. Bis zu 4 mL einer Übernachtkultur des plasmidhaltigen Stammes wurde eine Minute bei 14800 rpm zentrifugiert und mit 200 µL PD1-Puffer versetzt. Das Pellet wurde resuspendiert und 200 µL PD2-Puffer zugegeben. Nach zweiminütiger Inkubation wurden 300 µL PD3-Puffer zugegeben und 3 min bei 14800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die mitgelieferte Säule gegeben und 30 s zentrifugiert. In zwei aufeinander folgenden Schritten wurde die auf der Säule gebundene Plasmid-DNA mit 400 µL W1-Puffer und 600 µL Waschpuffer gereinigt. Nach jeweils 30-sekündigen Zentrifugationsschritten wurde 3 min zentrifugiert um die Säule zu trocknen. Eluiert wurde abschließend in 15 bis 30 µL des 1:10 verdünnten, mitgelieferten EB-Puffers (2 min, 14800 rpm). Die Ausbeute wurde durch erneute Zentrifugation mit dem Eluat erhöht.

2.2.11 Reinigung und Konzentrierung von DNA

2.2.11.1 Nucleospin® Extract II Kit

Das Nucleospin® Extract II Kit bietet die Möglichkeit DNA-Lösungen von Oligonukleotiden, Proteinen und Salzen zu befreien. Ebenso kann DNA aus Agaraose-Gelen extrahiert werden [116].

Für die Reinigung von DNA-Lösungen, zum Beispiel PCR-Ansätzen, wurde die Lösung mit zwei Volumenanteilen NTI-Puffer gemischt. Der Ansatz wurde auf die Silica-Säule transferiert und

30 s bei 11000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 700 µL NT3-Puffer beladen. Nach Zentrifugation für 30 s wurde der Durchfluss wiederum verworfen und die Säule eine Minute bei 11000 g getrocknet. Eluiert wurde durch einminütige Zentrifugation mit 15 bis 25 µL des 1:10-verdünnten NE-Puffers. Die Ausbeute wurde durch erneute Zentrifugation mit dem Eluat erhöht.

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde die entsprechende DNA-Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Das Stück wurde gewogen und mit zwei Gewichtsanteilen NTI-Puffer versetzt. Die Agarose wurde durch Inkubation im Wasserbad bei 50°C geschmolzen. Der Ansatz wurde anschließend auf die Säule transferiert und es wurde analog zur Reinigung von DNA-Lösungen verfahren.

2.2.11.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient in erster Linie der Trennung von DNA und störenden Proteinanteilen. Vor Allem bei der DNA-Isolierung nicht entfernte Endonukleasen können *Downstream*-Prozesse, wie die Restriktion, durch Abbau der DNA stören. Phenol und Chloroform denaturieren Proteine und bilden zusammen mit Isoamylalkohol ein Zweiphasen-System.

Für die Extraktion wurde die DNA-Lösung mit einem Volumenanteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) versetzt und gemischt. Durch zehnminütige Zentrifugation bei 13000 rpm wurden die Phasen getrennt. Proteine lagerten sich im Interphasenbereich ab. Die obere, wässrige Phase wurde entnommen und erneut mit einem Volumenanteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol gemischt. Die Zentrifugation wurde wiederholt und die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Die quantitative Entfernung von Phenolresten und eine Reinigung der DNA wurde durch eine anschließende Ethanolpräzipitation erreicht (vergleiche Kapitel 2.2.11.3).

2.2.11.3 Ethanolfällung

Die Ethanolfällung diente der Konzentrierung von DNA-Lösung, der Reinigung und vor Allem der Vorbereitung für die DNA-Sequenzierung.

Ein Volumen von 20 µL der DNA-Lösung wurden mit 5 µL einer Mischung aus 40 % Natriumacetat (3 M, pH 5,2), 40% EDTA (100 mM, pH 8) und 2 % Glycogen versetzt. Zu dem Ansatz wurden 60 µL Ethanol 99,9% (V/V) gegeben und bei 14000 rpm für 12 min

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 200 µL Ethanol 70% (V/V) gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde jeweils 30 Sekunden bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach Trocknen wurde das Pellet in dH_20 aufgenommen oder für die anschließende Sequenzierung in 30 µL *sample loading solution* (SLS).

2.2.12 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden in dieser Arbeit mittels einer Weiterentwicklung [117] des von SANGER *et al* entwickelten Kettenabbruchverfahrens [118] durchgeführt. Analysiert wurden PCR-Produkte, die zuvor mit Exonuklease I und alkalischer Phosphatase enzymatisch gereinigt wurden (siehe Tabelle 2.11).

Tabelle 2.11: Standardansatz und Temperatur-/Zeitprofil für die Reinigung von PCR-Produkten vor der Sequenzierung

Reaktionsansatz		**Temperatur- und Zeitprofil**	
PCR-Produkt	5 µL	37 °C	15 min
Exonuklease I	0,5 µL (10 u)	85 °C	15 min
Alk. Phosphatase	1 µL (1 u)	4 °C	Pause

Die Konzentration des PCR-Produkts wurde durch Vergleich der Bandenintensität mit der definierten Intensität eines Größenstandards in einem Agarosegel abgeschätzt. Zwischen 10 und 100 ng des gereinigten PCR-Produkts dienten als Template für das *cycle sequencing*. Im Anschluss an die Amplifizierung wurde das Produkt mit Ethanol gefällt (vergleiche Kapitel 2.2.11.3).

Beim *cycle sequencing* wurde das Template bei definierten Pufferbedingungen in Gegenwart von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) mit einem einzelnen Oligonukleotidprimer von einer Polymerase amplifiziert. Zusätzlich zu den vier dNTPs befanden sich in dem Ansatz 2´, 3´-Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) in genau eingestellter Konzentration. Die vier ddNTPs waren mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um eine lasergestützte Differenzierung zu ermöglichen. In einem der PCR (Kapitel 2.2.16) vergleichbarem Temperaturprofil wurde das PCR-Template zunächst denaturiert, um eine Anlagerung des Primers zu ermöglichen. Die Polymerase fügte dann entweder ein zum Templatestrang komplementäres dNTP oder ddNTP an die freie 3´-OH-Gruppe des Primers. Wenn ein dNTP eingebaut wurde, konnte die Polymerisierung an dessen 3´-OH-Gruppe fortgesetzt werden, wobei wiederum entweder ein dNTP oder ein ddNTP integriert werden

konnten. Wurde ein ddNTP eingebaut stand für die Kettenverlängerung keine 3´-OH-Gruppe zur Verfügung und die Polymerase dissoziierte ab. Das genau definierte Verhältnis von dNTPs zu ddNTPs führte dazu, dass Produkte jeder möglichen Größe bis zu etwa 500 Basenpaaren entstanden. Ein der HPLC ähnliches Chromatographieverfahren trennte im Anschluss die Produkte nach ihrer Größe und durch zwei Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen wurden die Produkte anhand des 5´-terminalen ddNTP-Farbstoffes unterschieden. Die Abfolge der basenspezifischen Farbstoffe wurde mittels der Software Vector NTI® ausgewertet und die DNA-Sequenz daraus determiniert.

Das Protokoll für einen Standardansatz ist in Tabelle 2.12 aufgeführt.

Tabelle 2.12: Standardansatz für eine DNA-Sequenzierung (*cycle squencing*) mit Temperatur- und Zeitprofil

Reaktionsansatz		**Temperatur- und Zeitprofil**		
PCR-Template	10 – 100 ng	96 °C	20 s	
Primer	10 pmol	50-60 °C	20 s	30 Zyklen
QuickStart Puffer	1-3 µL	60 °C	4 min	
Quickstart Mix	1-3 µL	4 °C	Pause	
DMSO	1 µL			
Demin. Wasser	ad 20 µL			

2.2.13 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren

2.2.13.1 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und schneiden. Im Zusammenspiel mit Methylasen stellen sie ein Abwehrsystem der Bakterien dar, das dem Eindringen von Virus-DNA durch Abbau entgegenwirkt. Die Restriktionsenzyme werden in drei Kategorien unterteilt, je nach Ort der Restriktion, strukturellen Eigenschaften und der benötigten Kofaktoren. Typ I Enzyme schneiden die DNA entfernt von der Erkennungssequenz in Gegenwart von ATP und S-Adenosylmethionin. Typ II Enzyme schneiden DNA innerhalb einer vier bis acht Basenpaar umfassenden, oft palindromischen Erkennungssequenz und sind in der Regel nicht von Kofaktoren abhängig. Typ III Enzyme sind vergleichbar mit Typ I Enzymen, jedoch in geringerem Umfang von Kofaktoren abhängig.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Typ II Restriktionsenzyme verwendet, welche nochmals anhand der generierten Enden unterteilt werden. *Blunt ends* werden generiert, wenn der DNA-Doppelstrang ohne Versatz geschnitten wird. *Sticky ends* entstehen, wenn durch die Aktivität der Enzyme ein 3´- oder 5´-Überhang entsteht.

Ein Standardansatz mit den verwendeten FastDigest® Enzymen der Firma Fermentas ist in Tabelle 2.13 dargestellt.

Tabelle 2.13: Standardansatz einer enzymatischen Restriktion mit Temperatur- und Zeitprofil

Reaktionsansatz		**Temperatur- und Zeitprofil**	
DNA-Template	100 ng – 1 µg	37 °C	10 min – 2 h
FastDigest Puffer	2 µL	optional: thermische Inaktivierung	
FastDigest Enzym	1 µL	4 °C	Pause
Demin. Wasser	ad 20 µL		

Die Aktivität des Restriktionsenzyms konnte in vielen Fällen durch einen Hitzeschritt, zum Beispiel 5 min bei 80 °C, beendet werden. Eine Inaktivierung fand auch statt, wenn der Ansatz aus dem Agarosegel extrahiert wurde (vergleiche Kapitel 2.2.11.1) oder eine Phenol-Chloroform-Fällung durchgeführt wurde (vergleiche Kapitel 2.2.11.2).

Meganukleasen wie *I-SceI* sind durch längere Erkennungssequenzen charakterisiert. Der Verdau mit *I-SceI* wurde wie in Tabelle 2.13 beschrieben durchgeführt, wobei vier Stunden inkubiert wurde.

Eine spezielle Anwendung des Restriktionsverdaus, die in dieser Arbeit eingesetzt wurde (siehe Kapitel 3.3.1), ist der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP). Wenn durch eine Punktmutation der DNA eine Erkennungssequenz verloren geht oder hinzukommt, kann anhand des unterschiedlichen Schnittmusters zwischen Wildtyp und Mutante unterschieden werden.

2.2.13.2 Ligation & Klonierung

Die Ligase des Bacteriophagen T4 ist unter Verbrauch von ATP in der Lage Phosphodiesterbindungen zwischen einer 3´-Hydroxygruppe und einer 5´-Phosphatgruppe eines DNA-Strangs zu bilden. Dadurch können DNA-Doppelstränge mit *blunt-ends* oder kompatiblen *sticky-ends* verbunden werden (vergleiche Kapitel 2.2.13.1). Diese Möglichkeit

wurde in dieser Arbeit dafür benutzt, PCR-Produkte mit Restriktionsschnittstellen in Vektoren zu klonieren. Geeignete Schnittstellen wurden mittels der Primer in das PCR-Produkt eingeführt, welches mittels der Phusion®-Polymerase hergestellt wurde.

Das gereingte PCR-Produkt und der mittels eines Kits isolierte Vektor wurden mit einem oder zwei Restriktionsenzymen inkubiert. Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Enzymen ermöglichte es bei Bedarf, das PCR-Produkt in einer definierten Orientierung einzufügen. Die Restriktionsprodukte wurden mittels des NucleoSpin® Extract II Kits gereinigt (siehe Kapitel 2.2.11.1). Die Konzentration beider Edukte für die Klonierung wurde mit dem Nanodrop®-Photometer bestimmt und im molaren Verhältnis von 3:1 (Insert zu Vektor) gemischt, wobei 100 ng des Vektors in der Regel eingesetzt wurden. Bei der Verwendung von nur einem Restriktionsenzym wurde der Vektor dephosphorylliert (vergleiche Kapitel 2.2.12), um eine Religation im Verlauf des Experiments zu verhindern. Zu dem Ansatz wurde ein Mikroliter (44 u) der T4-Ligase und 2 µL des dazugehörigen, ATP-haltigen Puffers gegeben und das Gesamtvolumen mit demineralisiertem Wasser auf 20 µL eingestellt. Der Ansatz wurde 16 h bei 16 °C inkubiert und die Ligase im Anschluss durch Inkubation für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Ein Teil des Ansatzes wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese auf die Anwesenheit des gebildeten Ligationsprodukts geprüft und der Rest für die Transformation oder Elektroporation von *E. coli* JM109 verwendet (siehe Kapitel 2.2.6.1 und 2.2.6.2). Ein Ligationsansatz ohne Insert wurde mitgeführt, um zu untersuchen, wie quantitativ die Restriktion, beziehungsweise die Dephosphoryllierung abgelaufen ist.

Eine Abwandlung dieser Technik ist das TOPO-TA Cloning [119]. Dabei wird ein linearisierter Vektor mit einem 5´T-Überhang (angefügt durch eine terminale Transferase) eingesetzt, mit einer an diesen Überhang gebundenen Topoisomerase aus dem *Vaccinia* Virus. Mit proofreading-defizienter Taq-Polymerase können dann PCR-Fragmente erzeugt werden, die einen 3´-A-Überhang aufweisen. In Gegenwart der Topoisomerase werden die Fragmente dann kovalent miteinander verbunden.

2.2.14 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.14.1 Nanodrop-Photometer

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch mit dem Nanodrop®-Photometer bestimmt [120]. Dieses System bildet zwischen zwei Photoelementen eine

Flüssigkeitsbrücke definierter Länge, innerhalb derer die Absorption ohne Küvetten gemessen wird. Die Schichtdicke wird automatisch variiert, wodurch hoch konzentrierte Lösungen gemessen werden können. Die Berechnung der Konzentration erfolgte automatisch anhand des Messwerts bei 260 nm mithilfe des Lambert Beer´schen Gesetzes (siehe Formel 3).

Formel 3: Lambert-Beer´sches Gesetz; E_λ: wellenlängenspezifische Extinktion, ε_λ: Extinktionskoeffizient in m^2/mol, c: Konzentration in mol/L, d: Schichtdicke in m

$$E_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

Die Aufzeichnung eines Spektrums und die Bildung von Quotienten der Messergebnisse bei verschiedenen Wellenlängen ermöglichte Rückschlüsse auf die Reinheit der Probe. Reagenzien, die ebenfalls bei 260 nm absorbieren, können das Ergebnis verfälschen, weshalb auf definierte Lösungspuffer geachtet werden musste.

Das Nanodrop®-System wurde in dieser Arbeit zur Konzentrationsbestimmung von dsDNA und einzelsträngigen Oligonukleotiden verwendet.

2.2.14.2 Agilent Bioanalyzer 2100

Die Konzentrationsbestimmung von RNA-Lösungen wurde in dieser Arbeit mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 durchgeführt [121]. In diesem System wird ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der sich spezifisch an Nukleinsäuren anlagert. Die Fluoreszenzintensität der Farbstoff-RNA-Mischung wird mit einem Laser detektiert und anhand eines internen Standards wird die Konzentration bestimmt.

Die Probe wurde zuvor elektrophoretisch in einer Trägermatrix aufgetrennt, wodurch die Bestandteile ihrer Größe nach sortiert wurden. Dadurch konnte bei bakterieller Gesamt-RNA zwischen 16S-rRNA und 23S-rRNA unterschieden werden und Aussagen über die Qualität und Stabilität der RNA waren möglich. Degradierte Proben konnten anhand eines veränderten Elektropherogramms identifiziert werden. Die Trägermatrix wurde nach Herstellerangaben [122] aufbereitet und mit der *priming station* ein RNA-Chip beladen. In die Kavitäten des Chips wurden zudem der interne Standard und die Proben, sowie ein Größenstandard in eine gesonderte Kavität gegeben.

Die Verwendung eines interkalierenden Farbstoffes erbringt genauere Ergebnisse als eine direkte photometrische Messung, da nur die Fluoreszenz der Nukleinsäuren erfasst wird und

keine anderen Bestandteile der Lösung den Messwert verfälschen können. Für Vergleiche der Bestimmungsmethoden wurde zudem das Qubit® II Fluorometer verwendet [123], das ähnlich funktioniert, nur ohne elektrophoretische Trennung.

2.2.15 Reverse Transkription

Die reverse Transkription diente in dieser Arbeit zur Herstellung des DNA-Templates für die quantitative Real-Time PCR. Isolierte, bakterielle Gesamt-RNA wurde dafür mit einem genspezifischen Primer (GSP) mittels einer modifizierten reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) [124, 243] des murinen Leukämievirus in cDNA (*copy* oder *complementary* DNA) umgesetzt. Eine freie 3´-OH-Gruppe wurde durch einen Primer bereitgestellt, der am 3´-Ende des Gens bindet und später auch in der qRT-PCR verwendet wurde. Die Bindung am Ende des Gens gewährleistete, dass nur vollständige mRNA-Transkripte erfasst wurden.

Für jede cDNA-Synthese wurden 150 ng Gesamt-RNA verwendet. Die isolierte RNA wurde dazu in RNase-freiem Wasser verdünnt, sodass jeweils 5 µL der Verdünnung 150 ng enthielten. Durch dieses Vorgehen war es möglich, *master mixes* anzufertigen, deren Verwendung die Vergleichbarkeit erhöhte. Zudem wurden durch das verhältnismäßig große Volumen Pipettierfehler minimiert. Die übrigen Bestandteile eines Ansatzes sind in Tabelle 2.14 aufgeführt.

Tabelle 2.14: Reaktionsansatz mit Temperatur- und Zeitprofil für die cDNA-Synthese; nach [125]

Reaktionsansatz		**Temperatur- und Zeitprofil**	
RNA-Verdünnung	5 µL		
Primer	20 pmol	65 °C	5 min
$dNTPs_{10mM}$	1 µL	4 °C	Pause
$Wasser_{RNase\text{-}frei}$	6,5 µL		
Zugabe der weiteren Bestandteile			
RT-Puffer	4 µL	50 °C	30 min
$RiboLock_{RNase\text{-}I.}$	0,5 µL	85 °C	5 min
Maxima®-RT	1 µL	4 °C	Pause

Der RNase-Inhibitor diente zum Schutz der mRNA vor Abbau während der cDNA-Synthese. Während der ersten Inkubationsphase wurden störende Sekundärstrukturen thermisch gelöst. Die zweite Inkubationsphase diente der quantitativen cDNA-Synthese und anschließend der thermischen Inaktivierung der reversen Transkriptase. Um zu überprüfen,

ob oder in welchem Ausmaß chromosomale DNA in der isolierten RNA enthalten war, wurde eine *no amplification control* (NAC) mitgeführt. In diesem Ansatz fehlte die reverse Transkriptase, wodurch die mRNA nicht umgesetzt wurde. Wurde im Folgenden in diesem Ansatz während der qRT-PCR unerwünschterweise ein Produkt gebildet, bestand das Template dafür aus chromosomaler DNA (vergleiche auch Kapitel 2.2.10.2).

Die cDNA wurde bei -20 °C für maximal einen Monat gelagert.

2.2.16 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

KARY MULLIS revolutionierte 1988 die Molekularbiologie mit der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) [126]. Mit der PCR ist es möglich, *in vitro* gezielt DNA-Bereiche zu amplifizieren ausgehend von sehr wenig Ausgangsmaterial. Dafür notwendig sind ein dsDNA-Template, zwei spezifische Primer, die vier dNTPs (Desoxyribonucleosidtriphosphate), ein geeigneter Puffer und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase. In einem Thermocycler wird dieser Ansatz zunächst bei circa 95 °C inkubiert, wodurch das doppelsträngige DNA-Template denaturiert und Einzelstränge vorliegen (*denaturation*). Bei einer Temperatur zwischen 50 °C und 70 °C lagern sich im nächsten Schritt die Primer komplementär an das Template (*annealing*). Die beiden Primer sind 18-25 bp lange, einzelsträngige Oligonukleotide. Ein Primer bindet durch komplementäre Basenpaarung an den codierenden Strang und der andere Primer an den nicht-codierenden Strang. Durch die Primeranlagerung stehen freie 3´-OH-Gruppen zur Verfügung, an die die Polymerase bei 72 °C dNTPs komplementär anfügt (*extension*). Dieser Zyklus wird circa 30-mal wiederholt, wobei die Menge an Produkt in jeder Wiederholung nahezu verdoppelt wird. Zu Beginn wird die Denaturierungsphase verlängert um eine initial möglichst quantitative Trennung der Stränge zu erzielen. Der letzte Schritt besteht aus einer verlängerten Synthesephase, während der nur teilweise gebildete PCR-Produkte vervollständigt werden. Der Ablauf der PCR ist schematisch in Abbildung 2.3 dargestellt.

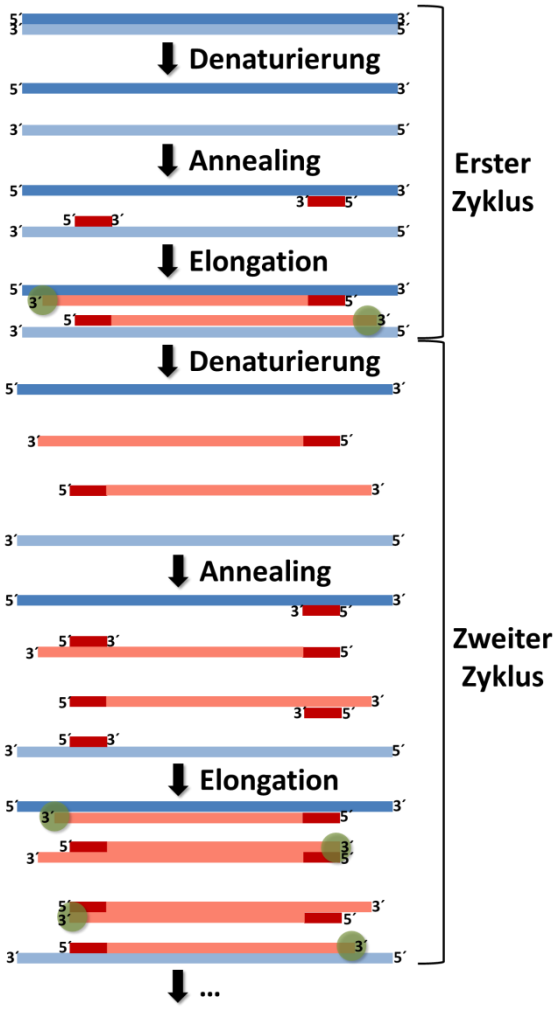


Abbildung 2.3: Schematischer Verlauf der Polymerasekettenreaktion; DNA-Template in blau, Primer in rot, neu synthetisierter DNA-Strang in hellrot, Polymerase in grün; Nähere Erläuterungen im Text

Die DNA-Polymerasen der meisten Organismen würden bei dem notwendigen Denaturierungsschritt bei knapp unter 100°C denaturieren und ihre Funktion verlieren. Aus diesem Grunde werden Polymerasen aus thermophilen Bakterien wie *Thermus aquaticus* oder *Pyrococcus furiosus* verwendet. Die verschiedenen, mittlerweile modifizierten Polymerasen sind strukturell unterschiedlich aufgebaut und weisen deutlich verschiedene Eigenschaften wie Temperaturoptima, Prozessivität oder Fehleranfälligkeit auf (siehe Tabelle 2.15).

Tabelle 2.15: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Polymerasen [127, 128]

	Dream Taq®-Polymerase	Phusion®-Polymerase
Synthesegeschwindigkeit	30 – 60 s/kb	15 – 30 s/kb
Denaturierungstemperatur	95 °C	98 °C
5´-3´-Exonuklease (*proofreading*)	nein	ja
A-Überhang	ja	nein

Die Primer wurden in dieser Arbeit mittels der Software Vector NTI® konstruiert. Dabei wurde beachtet, dass die 3´-terminale Base der möglichst gleichlangen Oligonukleotide G oder C war, wodurch eine stabilere Bindung an das Template erfolgte. Der GC-Gehalt aller konstruierten Primer lag zwischen 45% und 60% und unterschied sich zwischen Primerpaaren um maximal 5%. Sekundärstrukturen, repetitive Sequenzen und unspezifische Bindungen wurden durch gezielte Konstruktion nach Möglichkeit verhindert.

Ein typischer Reaktionsansatz mit dazugehörigem Temperatur- und Zeitprofil der beiden verwendeten Polymerasen ist in Tabelle 2.16 und Tabelle 2.17 dargestellt. Das DNA-Template wurde mittels der Koch-Methode (siehe Kapitel 2.2.10.2) hergestellt.

Tabelle 2.16: Reaktionsansatz mit Temperatur- und Zeitprofil für eine PCR mit der Taq-Polymerase; nach [127]

Reaktionsansatz		**Temperatur- und Zeitprofil**		
DNA-Template	2 µL	95 °C	3 min	
Primer	je 10 pmol	95 °C	1 min	30 Zyklen
$dNTPs_{2mM}$	2,5 µL	50-70 °C	40 s	
DT-Puffer	5 µL	72 °C	60 s/kb	
Dream Taq	0,25 µL	72 °C	5-10 min	
Demin. Wasser	ad 50 µL			

Tabelle 2.17: Reaktionsansatz mit Temperatur- und Zeitprofil für eine PCR mit der Phusion-Polymerase, nach [128]

Reaktionsansatz		**Temperatur- und Zeitprofil**		
DNA-Template	2 µL	98 °C	1 min	
Primer	je 10 pmol	98 °C	30 s	30-35 Zyklen
$dNTPs_{2mM}$	5 µL	50-70 °C	30 s	
GC-Puffer	10 µL	72 °C	30 s/kb	
Phusion	0,5 µL	72 °C	5 min	
Demin. Wasser	ad 50 µL			

2.2.16.1 Anwendungen der PCR

Die optimale Annealing-Temperatur für ein Primerpaar wurde in dieser Arbeit ermittelt, indem eine Gradienten-PCR durchgeführt wurde. In einer Näherung kann die Annealing-Temperatur mit folgender Formel berechnet werden:

Formel 4: Berechnungsformel der Annealing-Temperatur für die PCR

$$T_{Annealing}(°C) = \text{Anzahl GC} \cdot 4 + \text{Anzahl AT} \cdot 2$$

Die experimentelle Bestimmung der Annealingtemperatur erfolgte in speziellen Thermocyclern, bei denen entlang des Probenblocks ein Temperaturgradient eingestellt werden kann. Dadurch wurden parallel bis zu 12 PCR-Programme mit demselben Ansatz durchgeführt, die sich nur in der Annealing-Temperatur unterschieden. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese untersucht, um damit die Annealing-Temperatur, die ein spezifisches Produkt bei maximaler Ausbeute liefert, zu identifizieren.

Eine weitere Variation der PCR, mit der Sequenzeigenschaften untersucht werden konnten, wurde ebenfalls in dieser Arbeit eingesetzt. Mit der *amplification refractory mutation system* PCR (ARMS-PCR) [150] konnte eine spezifische chromosomale Punktmutation identifiziert werden. Dazu wurden zwei Primer konstruiert, deren 3´-Enden exakt an der Position der Punktmutation binden. An der drittletzten Position der Primer wurde jeweils eine Fehlpaarung eingebaut, um die Bindung an das Template zu schwächen. Einer der beiden Primer (wt-Primer) endete mit der zur Wildtypsequenz komplementären Base und der andere Primer (mut-Primer) mit der zur mutierten Sequenz komplementären Base. Lag die Wildtypsequenz vor, bildete nur der wt-Primer mit entsprechendem Reverseprimer in der PCR ein Produkt. Umgekehrt verhielt es sich bei Vorliegen der Punktmutation. Wenn trotz der Fehlpaarungen Produkte gebildet wurden, konnte anhand der unterschiedlichen Intensität der PCR-Produkte auf dem Agarosegel zwischen Wildtyp und Punktmutation diskriminiert werden. Diese PCR wurde als Duplex-PCR ausgelegt, bei der das Kontrollprodukt (*gyrA*-Fragment) in jedem Fall gebildet wurde. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass eine geringe Bandenintensität von anderen Faktoren als der DNA-Sequenz abhängig war.

Die SOEing-PCR [129] wird genutzt, um zwei DNA-Fragmente miteinander zu fusionieren. Dazu werden über die Primer für die Amplfikation der beiden Fragmente komplementäre Bereiche zum jeweils anderen Fragment eingeführt. Nach Reinigung der hergestellten Amplifikate werden diese in Gegenwart einer DNA-Polymerase zusammen inkubiert. Nach Denaturierung im Thermocycler lagern sich die komplementären Fragmente aneinander an und es entsteht ein Fragment mit zwei freien 3´-OH-Enden. Die Polymerase fügt daran komplementäre dNTPs an, wodurch ein Fusionsprodukt entsteht. Dieser Schritt wurde in sieben optimierten PCR-Zyklen durchgeführt. Im nächsten Schritt kann durch Zugabe der für die Synthese der Einzelfragmente verwendeten Außenprimer das Fusionsprodukt

amplifiziert werden. Dafür wurden im Thermocycler 20 bis 25 PCR-Zyklen durchlaufen. Das Fusionsprodukt wurde durch Gelextraktion nach der Agarosegelelektrophorese gereinigt. Über die verwendeten Primer können Mutationen in das Fusionsprodukt eingeführt werden. Zudem kann das Produkt durch Integration von Restriktionsschnittstellen mittels der Außenprimer in nachfolgenden Klonierungsversuchen verwendet werden.

2.2.17 Quantitative Real-Time PCR

Mit der quantitativen Real-Time PCR [130, 131] kann die Expression von Genen in unterschiedlichen Proben miteinander verglichen werden. Dazu wird die mit der Gesamt-RNA isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben und dient dann als Template für eine PCR, deren Verlauf kontinuierlich verfolgt wird.

Der Unterschied zu einer konventionellen PCR besteht in der Gegenwart eines interkalierenden Farbstoffes. In dieser Arbeit wurde SYBR-Green® verwendet, welches sich in die kleine Furche von dsDNA einlagert und nach Anregung durch UV-Licht fluoresziert. Die Fluoreszenz der verschiedenen Proben wurde detektiert und konnte dann verglichen werden. Da für die cDNA-Synthese bei jeder Probe dieselbe Menge RNA und für jede qRT-PCR das gleiche Volumen an cDNA-Lösung verwendet wurde, ergeben sich Unterschiede in der Fluoreszenz nur durch unterschiedliche Ausgangsmengen an mRNA. Die Zusammensetzung eines Standardansatzes für die qRT-PCR ist in Tabelle 2.18 dargestellt. Die cDNA wurde zuvor 1:10 in RNase-freiem Wasser verdünnt. Der SYBR-Green Mix enthielt alle für die PCR notwendigen Bestandteile und wurde durch Rox ergänzt, welches als interner Kalibrierungsfarbstoff diente.

Tabelle 2.18: Reaktionsansatz mit Temperatur- und Zeitprofil für einen qRT-PCR-Ansatz; nach [132]

Reaktionsansatz		**Temperatur- und Zeitprofil**		
$cDNA_{1:10\ dil.}$	2,5 µL	95 °C	10 min	
Primer	je 3,75 pmol	95 °C	15 s	40 Zyklen
Rox	0,025 µL	58 °C	30 s	
SYBR-Green Mix	12,5 µL	72 °C	30 s	
Demin. Wasser	ad 25 µL	Schmelzkurve		

Je höher die Ausgangsmenge an Template war, desto schneller wurde ein festgelegter Fluoreszenzschwellenwert überschritten. Durch Vergleich der C_T-Werte, also der Anzahl an

Zyklen bis der Schwellenwert erreicht war, konnte der Unterschied in der Expression eines Genes in verschiedenen Proben ermittelt werden. Die für die Bindung mit SYBR-Green zur Verfügung stehende Menge an dsDNA wurde in jedem Schritt verdoppelt (vergleiche auch Kapitel 4.9), wodurch ein Unterschied im C_T-Wert von eins gleichbedeutend mit einer Expressionsänderung um den Faktor zwei war. Für die Auswertung der Ergebnisse in Kapitel 3.8 wurde die $\Delta\Delta C_T$-Methode [244] angewendet (allgemeine Gleichung siehe Formel 5). Die übrigen Ergebnisse wurden mit Standardkurven aus definierten Verdünnungen ausgewertet (1:5, 1:10; 1:20; 1:40).

Formel 5: Formel zur Berechnung der relativen Genexpression nach PFAFFL [244]; ohne Referenzgen Berechnung aus dem Zähler

$$\text{Relative Genexpression} = \frac{2^{\Delta C_T\,(\text{Targetgen})}(\text{Referenzstamm-Teststamm})}{2^{\Delta C_T\,(\text{Referenzgen})}(\text{Referenzstamm-Teststamm})} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Neben der NAC-Kontrolle (siehe Kapitel 2.2.15) wurde eine *no template* Kontrolle (NTC) mitgeführt, bei der keine cDNA eingesetzt wurde. Für eine Berücksichtigung der Ergebnisse musste der C_T-Wert der Kontrollen mindestens um sechs Stufen höher liegen als der C_T-Wert der Proben.

Im Anschluss an die qRT-PCR wurde eine automatische Schmelzkurvenanalyse der Produkte durchgeführt. Dadurch konnte erkannt werden, ob nur ein spezifisches Produkt gebildet wurde oder SYBR-Green an weitere dsDNA, wie zum Beispiel Primer-Dimere, gebunden hat. Bei der Schmelzkurvenanalyse wurde das Produkt kontinuierlich erhitzt, bis die DNA denaturierte und die Fluoreszenz von SYBR-Green durch Dissoziation von der DNA abnahm.

2.2.18 Agarose-Gelelektrophorese

DNA weist in schwach alkalischem Puffer aufgrund der Phosphatgruppen eine negative Gesamtladung auf und wandert in einem elektrischen Feld daher zur Anode.

Agarose ist ein aus Rotalgen gewonnenes Polysaccharid aus unterschiedlich verküpften D-Galactose- und 3,6-Anhydro-L-Galactose-Einheiten [133]. Nach Erhitzen im Puffer löst sich die Agarose und bildet beim Erkalten zunächst agglomerierende Helices und schließlich ein poröses Gel aus. Die Größe der Poren ist dabei abhängig von der gewählten Agarosekonzentration [134]. In dieser Arbeit wurden in der Regel einprozentige Agarosegele verwendet.

Suspendiert in TAE-Puffer und in Gegenwart eines elektrischen Feldes wandert die DNA durch diese Poren. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl an Basenpaaren. Eine Trennung nach Fragmentgrößen findet statt, weil die Ladung des DNA-Moleküls von der Anzahl der Basenpaare abhängig ist. Zudem wird die Geschwindigkeit von der DNA-Konformation, von der angelegten Spannung und von interkalierenden Agenzien beeinflusst.

Für einen Ansatz von 50 mL wurden 0,5 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben mit 50 mL TAE-Puffer versetzt und in einem Mikrowellenofen bis zur vollständigen Lösung erhitzt. Der Kolben wurde unter Schwenken mit kaltem Wasser auf circa 40°C abgekühlt. Bei Bedarf wurde Ethidiumbromid zu dem Ansatz gegeben. Die Lösung wurde in eine Elektrophoresekammer transferiert und nach dem Erstarren mit TAE-Puffer bedeckt. Die beschwerten Nukleinsäureproben wurden in die Taschen des Agarosegels pipettiert und durch Anlegen einer Spannung wurde die Elektrophorese gestartet. Die Spannung variierte je nach Experiment zwischen 5 und 10 V/cm.

Verschiedene Größenstandards (siehe Abbildung 2.4) mit den darin enthaltenen Farbstoffen ermöglichten die Kontrolle des Verlaufs der Elektrophorese. Die Nukleinsäureproben wurden zusätzlich zu dem Beschwerer Xylencyanol FF mit Bromphenolblaulösung versetzt. Bromphenolblau zeigt ein ähnliches Laufverhalten wie dsDNA mit einer Länge von 3000 bp.

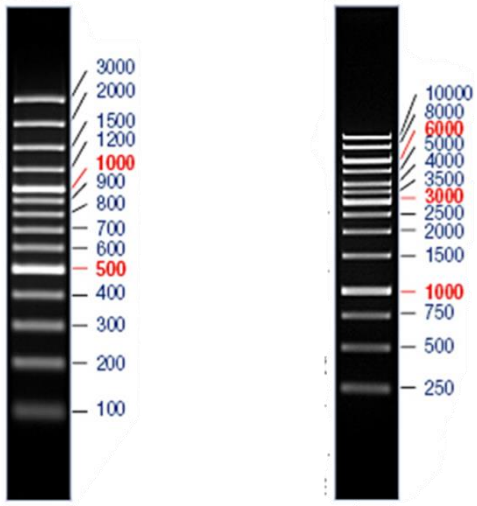


Abbildung 2.4: Gelbild der verwendeten Größenstandards; GeneRuler 100 bp Plus (links) und GeneRuler 1 kb (rechts); modifiziert nach [135] und [136] mit Beschriftung der einzelnen Fragmentgrößen

Nach Beendigung der Elektrophorese konnte die DNA als Alternative zu dem Zusatz zum Gel auch nachträglich mit Ethidiumbromid angefärbt werden. Dazu wurde das Gel 15 min in

einer Ethidiumbromidlösung geschwenkt (0,1 µg/mL) und mit demineralisiertem Wasser gespült. Durch UV-Bestrahlung (254 nm) wurde das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid (siehe Abbildung 2.5) anschließend sichtbar gemacht.

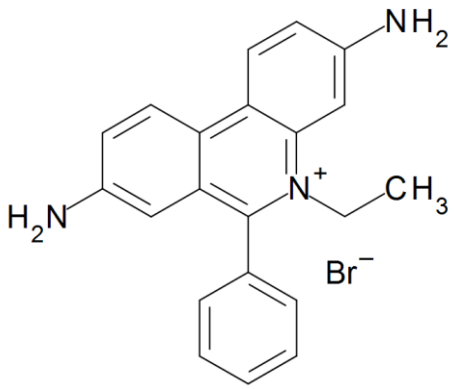


Abbildung 2.5: Chemische Strukturformel von Ethidiumbromid

3. Ergebnisse

Die Zielsetzung dieser Arbeit (siehe Kapitel 1.5) bestand darin, die Möglichkeit einer Beteiligung von DnaQ (siehe Kapitel 1.2.1) am Übergang von moderater Fluorchinolonresistenz zu hochgradiger Resistenz bei *E. coli* zu prüfen. Wie auch in Kapitel 1.5 und Kapitel 3.2 beschrieben, liegt diesem Übergang eine Doppelmutation in zwei Targets zugrunde, zu deren Entstehung eine DnaQ-vermittelte, erhöhte Mutationsrate beitragen könnte, gegebenenfalls bedingt durch eine Veränderung des Spiralisierungsgrads der DNA. Die Mutationsrate eines Stammes mit funktionell beeinträchtigtem DnaQ wurde zunächst im Vergleich zu anderen Mutatorstämmen untersucht. Die mögliche Beteiligung einer auf transient veränderter Genregulation beruhender Beteiligung von DnaQ an der Resistenzentwicklung wurde mittels homologer Rekombination, Selektionsexperimenten und Expressionsmessungen untersucht.

3.1 Mutationsraten von Mutatorstämmen

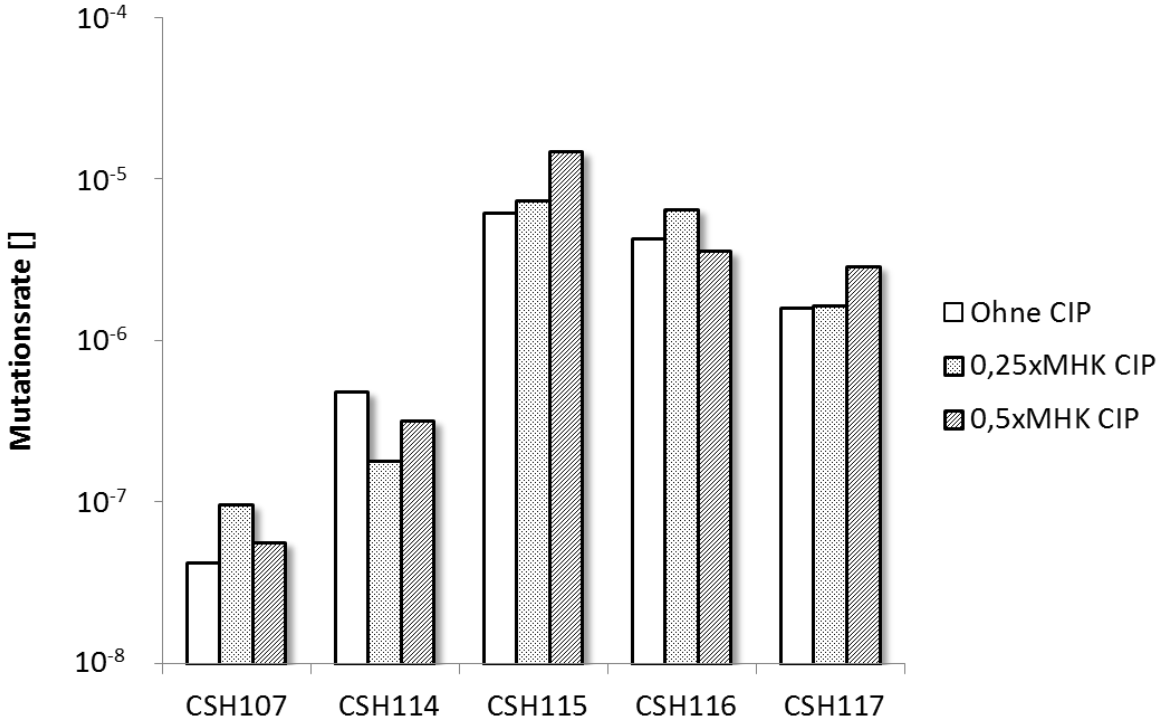
Die Mutationsraten von Mutatorstämmen, darunter ein DnaQ-Mutator, wurden mit und ohne Zusatz von Ciprofloxacin ermittelt. Die Auswirkungen verschiedener Mutatormutationen auf die Mutationsrate wurden dadurch ermittelt. Die Mutationen befinden sich in Genen, die für post-transkriptionale Korrekturmechanismen oder die Proofreading-Untereinheit der Polymerase III codieren. Die jeweiligen Funktionsweisen und die beteiligten Proteine wurden in Kapitel 1.2 vorgestellt. Der vollständige Genotyp der verwendeten Stämme ist in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Ciprofloxacin wurde zur Induktion der SOS-Antwort [137, 138, 139] während des Wachstums in einer Konzentration zugesetzt, die einem Viertel oder dem halben MHK-Wert des jeweiligen Stammes entspricht (MHK-Werte siehe Tabelle 3.1). Das Fluorchinolon senkt durch die Inhibierung der Topoisomerasen (siehe Kapitel 1.3.1) den negativen Superspiralisierungsgrad der DNA des Bakteriums. Ein Einfluss der Superspiralisierung auf die Expression von Genen, zum Beispiel auch für *dnaQ*, wird diskutiert [140]. Ebenso ist die Expression verschiedener Gene bei aktivierter SOS-Antwort verändert [42, 53, 54, 57]. Deshalb wurde auch die Hypothese geprüft, dass die Gegenwart von subinhibitorischen Fluorchinolonkonzentrationen die Entstehung von Fluorchinolonresistenz begünstigt.

Tabelle 3.1: Verwendete Mutatorstämme mit MHK-Werten (Rifampicin und Ciprofloxacin) für die Bestimmung der Mutationsraten

Stamm	Mutatorgen	MHK Rifampicin (µg/mL)	MHK Ciprofloxacin (µg/mL)
***E. coli* K12 CSH107**	-	16	0,015
***E. coli* K12 CSH114**	*mutT*	16	0,125
***E. coli* K12 CSH115**	*mutS*	16	0,015
***E. coli* K12 CSH116**	*dnaQ* (*mutD*)	16	0,0078
***E. coli* K12 CSH117**	*mutY*	16	0,015

Die in Tabelle 3.1 aufgeführten und in Abbildung 3.1 näher bezeichneten Mutatorgen-Mutationen führen zu funktionell beeinträchtigten Proteinen. Dadurch entsteht ein Mutatorphänotyp, der durch eine um mehrere Zehnerpotenzen erhöhte Mutationsrate charakterisiert ist. Die in einer Doppelbestimmung ermittelten Werte der Bestimmung der Mutationsrate sind in Abbildung 3.1 dargestellt.



Stamm	ohne CIP		¼ MHK CIP		½ MHK CIP	
Referenzstamm:						
***E. coli* K12 CSH107**	$4{,}2\cdot10^{-8}$	$\pm\ 0{,}7\cdot10^{-8}$	$9{,}7\cdot10^{-8}$	$\pm\ 0{,}6\cdot10^{-8}$	$5{,}7\cdot10^{-8}$	$\pm\ 4{,}9\cdot10^{-8}$
***mutT*1-Allel:**						
***E. coli* K12 CSH114**	$4{,}8\cdot10^{-7}$	$\pm\ 2{,}0\cdot10^{-7}$	$1{,}8\cdot10^{-7}$	$\pm\ 1{,}2\cdot10^{-7}$	$3{,}2\cdot10^{-7}$	$\pm\ 3{,}1\cdot10^{-7}$
***mutS*104::mini-Tn10:**						
***E. coli* K12 CSH115**	$6{,}2\cdot10^{-6}$	$\pm\ 4{,}7\cdot10^{-6}$	$7{,}4\cdot10^{-6}$	$\pm\ 1{,}9\cdot10^{-6}$	$1{,}5\cdot10^{-5}$	$\pm\ 0{,}1\cdot10^{-5}$
***dnaQ*995-Allel:**						
***E. coli* K12 CSH116**	$4{,}3\cdot10^{-6}$	$\pm\ 2{,}8\cdot10^{-6}$	$6{,}6\cdot10^{-6}$	$\pm\ 2{,}3\cdot10^{-6}$	$3{,}6\cdot10^{-6}$	$\pm\ 3{,}3\cdot10^{-6}$
***mutY*101::mini-Tn10:**						
***E. coli* K12 CSH117**	$1{,}6\cdot10^{-6}$	$\pm\ 1{,}1\cdot10^{-6}$	$1{,}7\cdot10^{-6}$	$\pm\ 0{,}6\cdot10^{-6}$	$2{,}9\cdot10^{-6}$	$\pm\ 1{,}9\cdot10^{-6}$

Abbildung 3.1: Mittelwerte der Mutationsraten von Mutatorstämmen (in grau: Bezeichnung des jeweiligen Mutatorallels) mit Standardabweichung (RIF^F-Assay bei vierfachem MHK-Wert); Erläuterungen im Text

E. coli K12 CSH107 besitzt keine Veränderung in einem Gen, das für einen Mutatorphänotyp verantwortlich sein kann und diente als Referenzstamm in diesem Kollektiv. Die Mutationsrate dieses Stammes dient als Grundlage für den Vergleich mit den anderen Stämmen. Die Mutationsrate von *E. coli* K12 CSH114 ist im Vergleich am wenigsten erhöht. Die Stämme *E. coli* K12 CSH115, mit einem Defekt im *methyl-directed mismatch repair* System (siehe Kapitel 1.2.2), und *E. coli* K12 CSH116, mit eingeschränktem *proofreading*

(siehe Kapitel 1.2.1), zeigen Mutationsraten, die zum Teil mehr als hundertfach erhöht sind. *E. coli* K12 CSH117, mit einer beeinträchtigten N-Glykosylaseaktivität (siehe Kapitel 1.2.3), weist eine um mehr als eine Zehnerpotenz erhöhte Mutationsrate auf.

Der methodenbedingte Schwankungsbereich der Ergebnisse beträgt, wie aus den Standardabweichungen aus Abbildung 3.1 abzuleiten ist, circa 1 Zehnerpotenz (siehe Kapitel 2.2.4 und Kapitel 4.1). Der Einfluss von Ciprofloxacin auf die Mutationsraten liegt in diesem Experiment innerhalb der Schwankungsbreite, wodurch keine statistisch signifikanten (im Sinne eines Wertunterschieds außerhalb des Bereichs der doppelten Standardabweichung der Einzelwerte) Änderungen verzeichnet werden können.

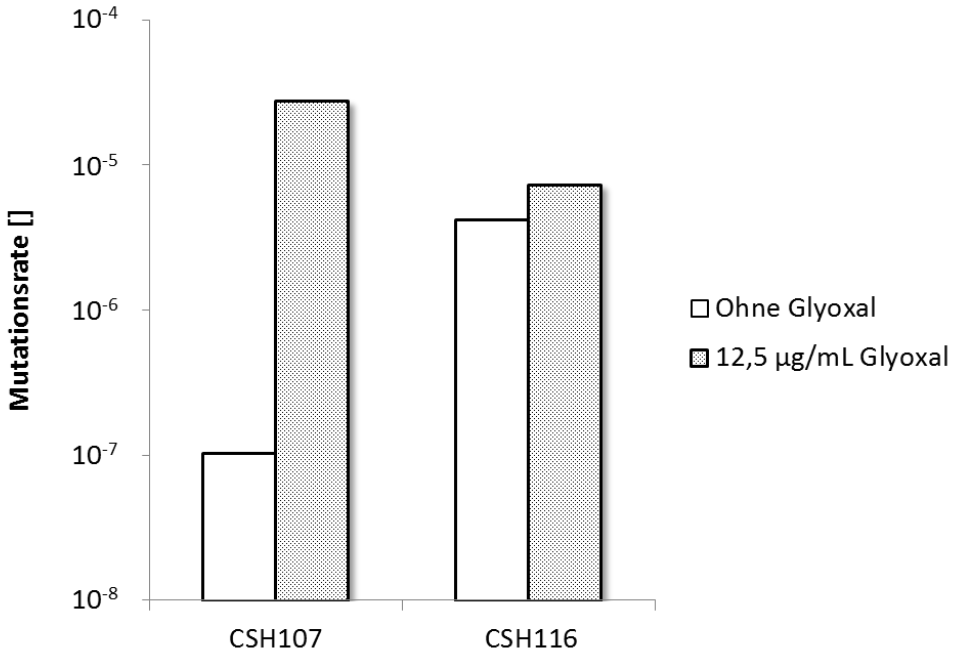
Der Zusammenhang der ermittelten Mutationsraten mit den veränderten Mutatorgenen wird in Kapitel 4.1 diskutiert.

Um weitere Ursachen für einen Mutatorphänotyp zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt die Mutationsrate mit einem mutagenem Agens beeinflusst. Die dadurch erhöhte Mutationsrate wurde mit den bisher ermittelten Werten verglichen.

3.1.1 Zusatz von Glyoxal

Der Zusatz von Glyoxal erhöhte die Mutationsrate von Referenzstamm *E. coli* K12 CSH107 auf das Niveau eines Mutatorstammes. Glyoxal wurde wegen seiner DNA-quervernetzenden Eigenschaften ausgewählt [141,142]. Dadurch sollte artifiziell ein Mutatorphänotyp generiert werden. Als Vergleichsstamm wurde *E. coli* K12 CSH116, mit bereits konstitutiv erhöhter Mutationsrate, parallel mitgeführt.

Die durch den Dialdehyd Glyoxal unter anderem vermittelte Inhibierung der Replikation kann mit den Effekten der Fluorchinolone verglichen werden. Die ermittelten Mutationsraten können durch die Gyrase-inhibierende Wirkung auch mit Experimenten verglichen werden, die mit Coumermycin A durchgeführt wurden [140]. Die Ergebnisse der Doppelbestimmung der Mutationsrate mit 12,5 µg/mL Gyloxal sind in Abbildung 3.2 dargestellt.



Stamm	Ohne Glyoxal		12,5 µg/mL Glyoxal	
***E. coli* K12 CSH107**	$1{,}0 \cdot 10^{-7}$	$\pm\ 0{,}05 \cdot 10^{-7}$	$2{,}7 \cdot 10^{-5}$	$\pm\ 0{,}1 \cdot 10^{-5}$
***E. coli* K12 CSH116**	$4{,}2 \cdot 10^{-6}$	$\pm\ 0{,}1 \cdot 10^{-6}$	$7{,}3 \cdot 10^{-6}$	$\pm\ 0{,}2 \cdot 10^{-6}$

Abbildung 3.2: Mittelwerte der Mutationsraten von Mutatorstämmen mit und ohne Zusatz von Glyoxal (RIF^F-Assay, vierfacher MHK-Wert)

Bei *E. coli* K12 CSH107 ist die Mutationsrate durch Glyoxal über 200-fach erhöht. Der ermittelte Wert liegt im selben Größenbereich wie für die Mutatorstämme *E. coli* K12 CSH115 und *E. coli* K12 CSH116 (vergleiche Kapitel 3.1). Der Stamm *E. coli* K12 CSH116 zeigt mit und ohne Glyoxalzusatz keine signifikanten Unterschiede. Die in diesem Experiment ermittelte Mutationsrate ist mit den zuvor bestimmten Werten für diesen Stamm (siehe Abbildung 3.1) vergleichbar.

Glyoxal erhöht demnach die Mutationsraten möglicherweise nur, wenn diese nicht durch *Proofreading*-Defizienz nahe an dem in der Literatur [143] postulierten Schwellenwert der *error catastrophe* liegen. Dieser Schwellenwert ist sehr variabel und hängt von verschiedenen Einflussgrößen ab, wie der Populationsgröße und anderen Umwelteinflüssen (Nährstoffangebot, Temperatur, etc.) [144, 145]. Der genaue Zusammenhang und die potentiellen Auswirkungen von Glyoxal auf andere Mutatorstämme werden in Kapitel 4.1.1 diskutiert.

Die beiden in diesem Experiment verglichenen Stämme unterscheiden sich konstruktionsbedingt auf molekulargenetischer Ebene. In das Chromosom von *E. coli* K12 CSH116 ist ein Tn10-Transposon in das Gen *yafC* insertiert, das für einen putativen Transkriptionsregulator codiert. Das Transposon vermittelt durch das davon codierte, in seiner Funktion als Transkriptionsaktivator mit MarA verwandtem [146], TetCD unter anderem eine Tetracyclinresistenz. Es besteht die Möglichkeit, dass TetCD die Expression von Genen beeinflusst, wodurch Unterschiede in der Genexpression zwischen *E. coli* K12 CSH107 und *E. coli* K12 CSH116 nicht eindeutig auf die DnaQ-Defizienz zurückgeführt werden können. Eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse aller nachfolgenden Experimente wurde erreicht, indem im nächsten Schritt eine isogene Mutante hergestellt wurde, die sich von ihrem Ausgangsstamm *E. coli* MII nur durch Punktmutationen in *dnaQ* unterscheidet. Ein Einfluss des Transkriptionsaktivators TetD auf die nachfolgenden Ergebnisse konnte damit ausgeschlossen werden.

3.2 Ortsspezifische Mutagenese

Ziel des Versuchs war es, *dnaQ* in *E. coli* MII durch das Mutator-Allel von *dnaQ* aus *E. coli* K12 CSH116 mittels ortsspezifischer Mutagenese (siehe Kapitel 2.2.8) chromosomal zu ersetzen. Der Stamm wurde ausgewählt, da in nachfolgenden Experimenten die Beteiligung von *dnaQ* an dem Schritt untersucht werden sollte, von der Zweitschrittmutante *E. coli* MII hin zu den hochresistenten Mutanten (vergleiche *E. coli* MIII, Tabelle 2.1). Bei diesem Selektionsschritt war eine Doppelmutation nachgewiesen worden. Die zentrale Hypothese (vergleiche Kapitel 1.5), dass eine DnaQ-vermittelte, erhöhte Mutationsrate diesen Schritt begünstigt oder erst ermöglicht, wurde in nachfolgenden Experimenten untersucht.

E. coli MII ging aus einem Wildtyp-Isolat nach zwei Selektionsschritten mit Fluorchinolonen hervor (siehe Tabelle 2.1 und Kapitel 1.4).

Es sollten zwei Punktmutationen in *dnaQ* eingeführt werden: Thymin statt Cytosin an Position +44 (44. DNA-Base des *dnaQ*-Strukturgens) und Cytosin statt Adenin an Position +659 (659. DNA-Base des *dnaQ*-Strukturgens). Dies führt im DnaQ-Protein jeweils zu einem Aminosäureaustausch an Position 15 (T15I) und an Position 220 (E220D). Der so modifizierte Stamm sollte sich möglichst von seinem Ausgangsstamm nur in diesen Mutationen

unterscheiden. Diese beiden Mutationen (*dnaQ*995-Allel, *mutD*5) verursachen bei *E. coli* K12 CSH116 bekanntermaßen einen Mutatorphänotyp (siehe auch Abbildung 3.1).

Die Expression von *dnaQ* sollte nicht durch Restsequenzen („Narbensequenzen“) aus der Rekombination oder durch einen *Copynumber*-Effekt (erhöhte Genexpression durch mehrfache Kopien des Allels), wie bei der Expression von einem Plasmid, verändert sein.

3.2.1 Vorversuche

Vor der erfolgreichen ortsspezifischen Mutagenese nach LEE *et al* [149] wurden verschiedene Methoden versucht, die zu keinem verwertbaren Ergebnis führten. Die Erkenntnisse aus diesen Versuchen wurden in die finale Methode übernommen. Auf die Methodik der Vorversuche wird an dieser Stelle verwiesen und mögliche Gründe für deren Misserfolg kurz aufgeführt.

Die ortsspezifische Mutagenese sollte zunächst mit der von DATSENKO UND WANNER beschriebenen Methode erfolgen [147]. Dabei wird ein lineares DNA-Fragment transformiert, welches dann mittels des λ-Red Rekombinationssystem in das Chromosom integriert werden soll (detaillierte Beschreibung siehe Kapitel 2.2.8.1). Die Ortsspezifizität der Rekombination wird durch DNA-Sequenzen des konstruierten, linearen Fragments sichergestellt, die homolog zum betreffenden Bereich des Chromosoms sind. Bei diesem Versuch wurden keine kanamycinresistenten Mutanten erhalten. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass der über eine SOEing-PCR (siehe Kapitel 2.2.16.1) konstruierte, homologe Bereich vor der Resistenzkassette (ca. 150 bp) zu kurz für eine effiziente Rekombination war. Die Effizienz der Rekombination steigt mit der Länge des linearen Fragments (Maximum bei ca. 1500 bp), da eine sterische Hinderung der beteiligten Proteine vermieden wird. Neue Primer wurden deshalb konstruiert (siehe Tabelle 2.3), mit denen ein größerer Bereich von *dnaQ* amplifiziert werden konnte. Das SOEing wurde analog zu den bisherigen Versuchen durchgeführt, ergab aber auch nach Optimierungsversuchen (Anpassung der Annealing-Temperatur, Elongationszeit, Verwendung unterschiedlicher Polymerasen) kein Fragment in der korrekten Größe.

Ebensowenig konnte mittels Topo®TA-Cloning und Blunt-End-Klonierung ein korrektes Produkt für eine direkte Elektroporation hergestellt werden (siehe Kapitel 2.2.13.2 und 2.2.16.1).

Das von HERRING *et al* entwickelte *Gene Gorging* [148] beruht auf der Methode von DATSENKO und WANNER [147]. Die Methode und die enthaltenen Neuerungen wurden in Kapitel 2.2.8.2 beschrieben. Dieses Verfahren wurde als nächstes versucht, da die Konstruktion des Rekombinations-Templates nur eine Klonierung umfasst. Das Screening im Anschluss an diese Methode (vergleiche auch Kapitel 3.2.4) ergab, dass keine rekombinanten Klone erhalten wurden. Die Ursache dafür könnte darin gelegen haben, dass die einzuführende Mutation nicht mittig im Fragment lag. Ein verkürztes PCR-Fragment von 143 bp wurde daher mit neuen Primern (siehe Tabelle 2.3) amplifiziert. Vorversuche mit diesem konstruierten Plasmid vor der eigentlichen Rekombination zeigten, dass die Restriktion (siehe Kapitel 2.2.13.1) des Plasmids *in vivo* durch *I-SceI* nicht quantitativ abgelaufen ist. Eine effiziente Vorauswahl der möglichen rekombinanten Klone war dadurch nicht möglich. Die unvollständige Restriktion könnte ihre Ursache in der hohen Kopienzahl von pUC19 in dem Bakterium haben. Die Verwendung eines *medium-copynumber* Plasmids kann demnach die Effizienz in diesem Versuch erhöhen (vergleiche auch [148]). Die Methode wurde anhand der neuen Befunde angepasst und um die Optimierungen von LEE *et al* erweitert.

3.2.2 Konstruktion des Templateplasmids pHPMP12-01

Ein ca. 1300 bp großes Fragment von *dnaQ* und dem benachbarten Gen *rnhA* wurde mit der Phusion®-Polymerase amplifiziert (siehe Abbildung 3.3). Die ortsspezifische Mutagenese nach LEE *et al* (*Gene Doctoring*) [149] ist, wie unter anderem aus den Vorversuchen hervorgegangen, am effizientesten, wenn zwischen den homologen Bereichen, innerhalb derer rekombiniert werden soll, etwa 1000 bis 1500 Basenpaare liegen (siehe auch [148]). Die Punktmutation an Position 44 liegt in diesem Fragment mittig, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, dass dieser Bereich bei der Rekombination erfasst wird. Die dafür verwendeten Primer waren dnaQ_-534_fw_EcoRI und dnaQ_+709_rv_EcoRI.

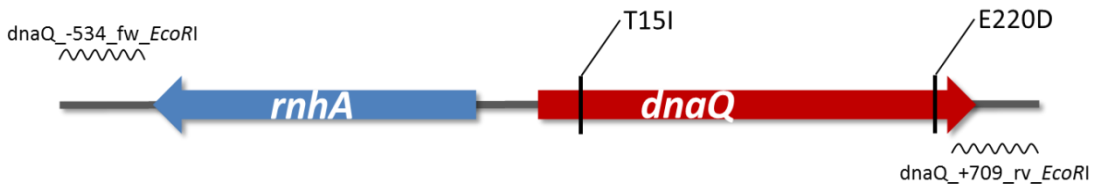


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des PCR-Fragments von *dnaQ* für die Klonierung in pDOC-K für die Rekombination; gewellte Linie: Primerbindungsstellen; T15I und E220D: Position von Punktmutationen; Erläuterungen im Text

Das Insert wurde nach Restriktion mit *EcoR*I (siehe Kapitel 2.2.13.1) und anschließender Reinigung (siehe Kapitel 2.2.11.1) mit dem ebenfalls mit *EcoR*I-verdauten Vektor pDOC-K ligiert (siehe Abbildung 3.4). Der Vektor besitzt eine Schnittstelle für das gewählte Restriktionsenzym in der *multiple cloning site*. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels PCR mit den Primern pDOC-K_+2178_fw und pDOC-K_+2365_rv (1507 bp großes Fragment) sowie durch Restriktion mit *Sal*I und *EcoR*I bestätigt (Fragmente der Größe 5853 bp, 1380 bp und 1299 bp).

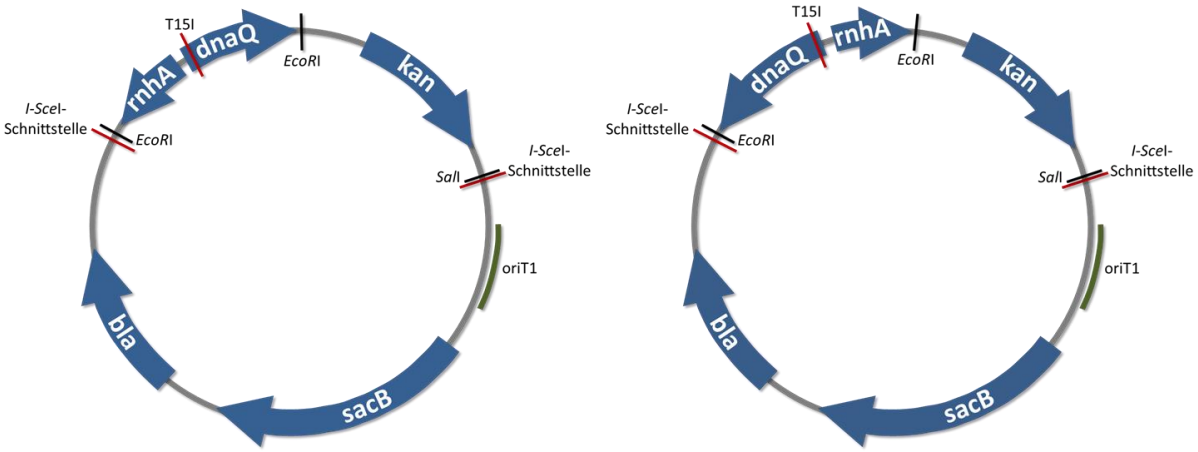


Abbildung 3.4: Plasmidkarte der möglichen Varianten von pDOC-K mit *dnaQ*-Insert (pHPMP12-01); *Sal*I und *EcoR*I: Restriktionsschnittstellen; T15I: Position der Punktmutation, die zum Aminosäureaustausch führt; oriT1: *origin of replication;* bla: Beta-Lactamase-Gen; kan: Kanamycin-Resistenzgen; Erläuterungen im Text

Die Orientierung des Inserts im Vektor wurde nicht ermittelt, da sie für die weiteren Versuche unerheblich ist.

3.2.3 Gene Doctoring

Für das Gene Doctoring wurde *E. coli* MII mit dem Rekombinationsplasmid pACBSCE transformiert (siehe Kapitel 2.2.6.1). Das konstruierte Plasmid pHPMP12-01 wurde anschließend durch Elektroporation übertragen. Nach Induktion wie unter Kapitel 2.2.8.3 beschrieben, wurden 1000 Saccharose-unempfindliche Kolonien gesichert (Kolonien auf neue LB-Agarplatten transferiert). Die große Anzahl an Kolonien war nötig, da bei der gewählten Methode kein Selektionsmarker eingesetzt wird. Eine einfache Methode zur Überprüfung der möglichen Rekombinanten musste daher gefunden werden.

3.2.4 Screening der möglichen rekombinanten Kolonien

Eine sequenzspezifische PCR (ARMS-PCR, siehe Kapitel 2.2.16.1) [150] wurde zur Überprüfung der Kolonien auf eine erfolgreiche Rekombination durchgeführt. Die Methode ermöglicht mit vergleichsweise geringem Aufwand eine große Zahl an Kolonien zu überprüfen. Chromosomale DNA aus jeweils zehn Kolonien (gepoolt) wurde dazu in einem Ansatz isoliert (siehe Kapitel 2.2.10.2) und mit den Primern ARMS_mut_fw und dnaQ_+811_rv amplifiziert (809 bp großes Fragment). Die PCR wurde als Duplex-PCR konzipiert, zusätzlich mit den Primern gyrA_5-1 und gyrA_3-1. Bei Vorliegen des *gyrA* Kontrollprodukts (524 bp) ist sichergestellt, dass alle Reagenzien zugegeben wurden und das Temperaturprofil der PCR eine Amplifizierung ermöglicht hat. Als Positivkontrolle diente DNA aus *E. coli* CSH116 und als Negativkontrolle DNA aus dem Ausgangsstamm *E. coli* MII. In Pool 27 wurde erstmals ein Produkt der korrekten Größe amplifiziert (siehe Abbildung 3.5).

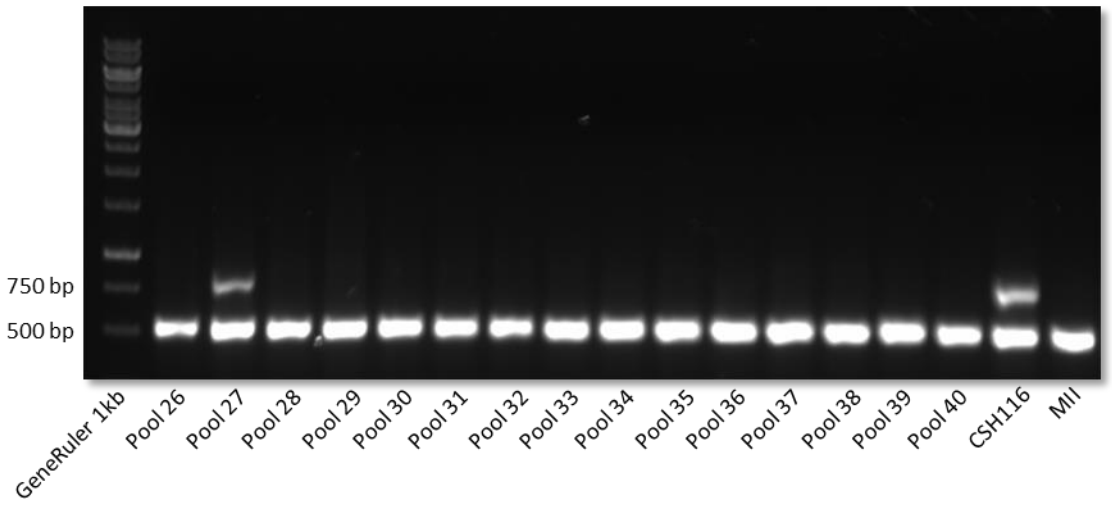


Abbildung 3.5: UV-Aufnahme des Agarosegels mit den Produkten der ARMS-PCR (je 5 µL) von den DNA-Pools; Ladder 3 µL

Chromosomale DNA aus den zehn einzelnen Kolonien, die in Pool 27 zusammengefasst waren, wurde separat isoliert. Die Duplex-PCR wurde mit diesen Templates anschließend wiederholt (siehe Abbildung 3.6).

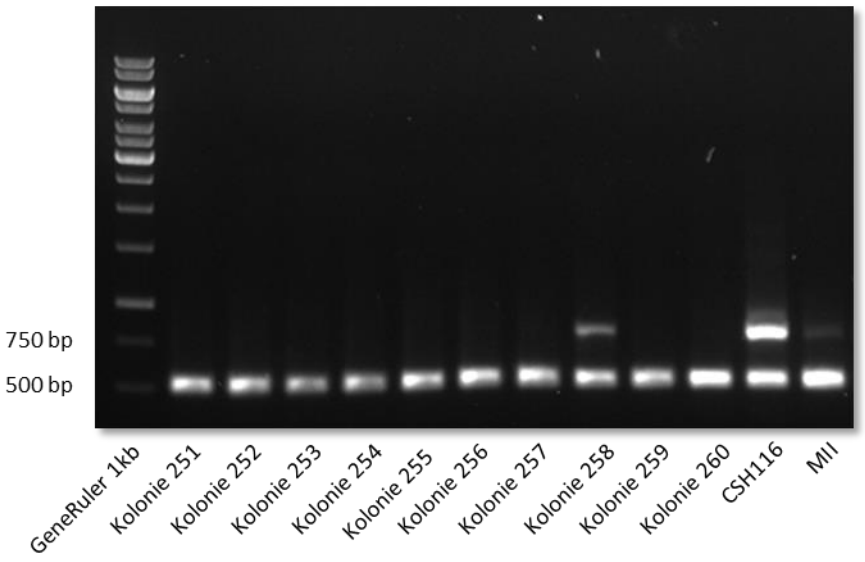


Abbildung 3.6: UV-Aufnahme des Agarosegels mit den Produkten der ARMS-PCR (je 5 µL) von den einzelnen Kolonien; Ladder 3 µL

Die PCR von Kolonie 258 ergab als einzige Probe eine Bande in Höhe von ca. 750 bp. Bei erfolgreicher Amplifizierung mit den Primern ARMS_mut_fw und dnaQ_+811_rv entsteht ein 809 bp großes Produkt. Der Reverseprimer bindet an einen Bereich stromabwärts von *dnaQ*, der nicht Teil des Fragments für die ortsspezifische Rekombination ist. Ein PCR-Produkt wird nicht gebildet, wenn das Templateplasmid amplifiziert wird, ohne dass eine chromosomale Veränderung vorhanden ist.

3.2.5 Sequenzanalyse des möglichen rekombinanten Stammes

Die Sequenzierung des Bereichs um Codon 15 von *dnaQ* unterstützte die bisherigen Befunde und die Anwesenheit der gewünschten *dnaQ*-Punktmutation konnte nachgewiesen werden. Für die Herstellung des Sequenzier-Templates wurden die Primer dnaQ_-108_fw und dnaQ_+367_rv (499 bp großes Fragment) verwendet, wobei Letzterer auch für die Sequenzierung verwendet wurde. Ein Ausschnitt der Ergebnisse der Sequenzierung (siehe Kapitel 2.2.12) von Kolonie 258 und der Positivkontrolle für die Mutation an Position 44, *E. coli* CSH116, sowie des Ausgangsstamms *E. coli* MII ist in Abbildung 3.7 aufgeführt. Kolonie 258 wird im Folgenden als *E. coli* MIIQ bezeichnet. Für Codon 15 von *dnaQ* ist zusätzlich die Basenabfolge dargestellt.

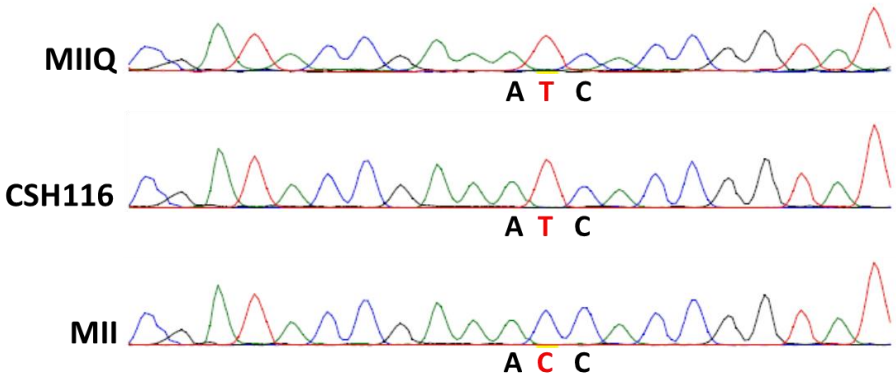


Abbildung 3.7: DNA-Sequenzchromatogramm von *E. coli* MIIQ, *E. coli* MII und *E. coli* CSH116 (Ausschnitt aus *dnaQ* um Codon 15); Erläuterungen im Text

Die Basenabfolge in dem Ausschnitt von *E. coli* MIIQ ist identisch mit *E. coli* CSH116, gleichbedeutend damit, dass die Punktmutation erfolgreich eingeführt wurde. Spätere Sequenzierungen ergaben, dass die Punktmutation an Position +659 ebenfalls in *E. coli* MIIQ zu finden ist (siehe Abbildung 3.27). Die Rekombination ergab ausgehend von *E. coli* MII einen Stamm, der beide für den Mutatorphänotyp verantwortlichen Punktmutationen in *dnaQ* besitzt. Die Abstammung von *E. coli* MII konnte im Anschluss nachgewiesen werden und wichtige Eigenschaften von *E. coli* MIIQ konnten charakterisiert werden.

3.3 Charakterisierung des rekombinanten Stammes

3.3.1 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus

Der Nachweis, dass eine Mutation in den Codons 82 oder 83 von *gyrA* vorliegt, wurde mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP, siehe Kapitel 2.2.13.1) [151] erbracht. Der Versuch diente dazu, weitere Hinweise dafür zu erhalten, dass *E. coli* MIIQ aus *E. coli* MII hervorgegangen ist, welcher in Codon 83 eine Punktmutation aufweist. Ein ca. 530 bp langes Fragment von *gyrA* wurde dazu mit den Primern gyrA_5-1 und gyrA_3-1 amplifiziert. Die Restriktion des PCR-Produkts mit dem Enzym *Hinf*I wurde im Anschluss daran durchgeführt. Die Sequenz der Codons 82 und 83 stimmt bei Wildtyp-*gyrA* mit der Erkennungssequenz von *Hinf*I überein, wodurch das PCR-Produkt Fragmente der Größe 100 bp, 140 bp und 290 bp ergibt. Eine Mutation innerhalb der Erkennungssequenz (GANTC) von *Hinf*I führt dazu, dass diese Schnittstelle nicht mehr vorhanden ist und es resultieren Fragmente der Länge 140 bp und 390 bp. In diesem Versuch wurden sieben Kolonien getestet und die Positivkontrolle MII, sowie die Negativkontrolle *E. coli* CSH116 (siehe Abbildung 3.8).

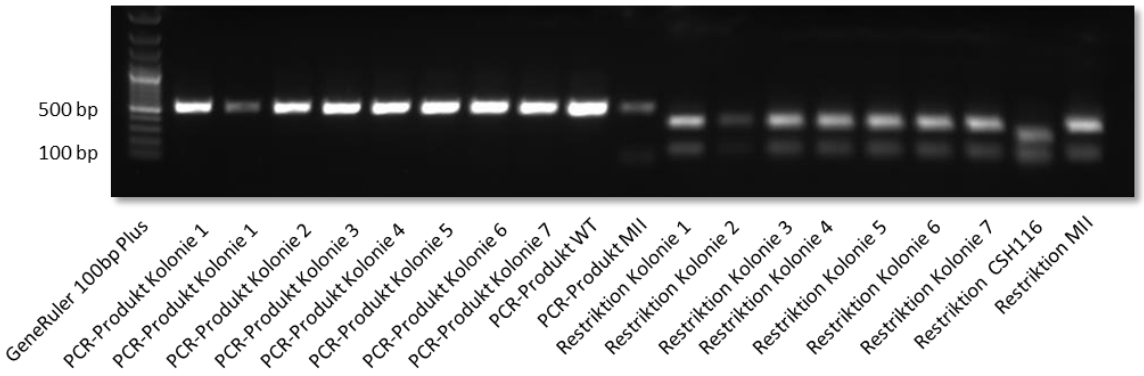


Abbildung 3.8: UV-Aufnahme des Agarosegels mit den PCR-Produkten (je 5 µL) und Restriktionsfragmenten des RFLP-Experiments (je 20 µL); Ladder 3 µL

Die erhaltenen Fragmentgrößen nach der Restriktion der PCR-Produkte der getesteten Kolonien entsprechen denen von *E. coli* MII. Die Restriktion des PCR-Produkts von *E. coli* K12 CSH116, dessen *gyrA*-Allel dem Wildtyp entspricht, ergab drei Fragmente. In *E. coli* MIIQ, genauso wie in *E. coli* MII, liegen demnach eine Punktmutation in den Codons 82 oder 83 von *gyrA* vor. Dieser Befund wurde durch spätere Sequenzierung von *gyrA* bestätigt (siehe Kapitel 3.4.3).

3.3.2 Detektion einer Deletion in marR mittels PCR

Ein weiteres Merkmal von Mutante *E. coli* MII ist eine 175 bp große Deletion in *marR*. Die Anwesenheit einer Deletion in *marR* von *E. coli* MIIQ in vergleichbarer Größe, konnte durch PCR mit den Primern marR_+7_for und marA_+42_rev bestätigt werden (siehe Abbildung 3.9). Es wurden wie zuvor sieben einzelne Kolonien von *E. coli* MIIQ getestet.

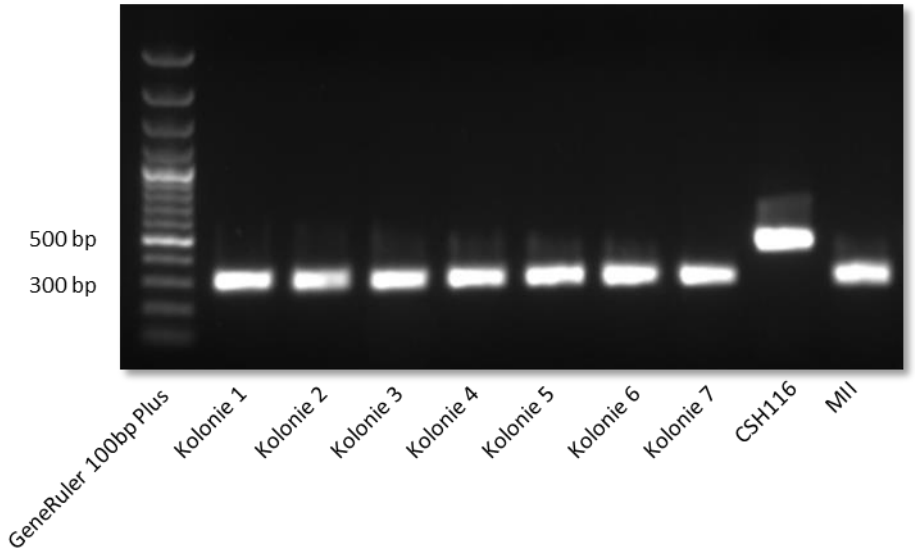


Abbildung 3.9: UV-Aufnahme des Agarosegels mit den PCR-Produkten der *marR*-PCR (je 5 µL); Ladder 3 µL

Die PCR-Produkte der sieben Kolonien von *E. coli* MIIQ können anhand des Größenstandards bei ca. 300 bp eingeordnet werden (berechnete Fragmentgröße 309 bp). *E. coli* K12 CSH116 besitzt keine Deletion in *marR*. Die PCR erbrachte ein Produkt von ca. 500 bp (berechnete Fragmentgröße 484 bp). Eine Deletion in *marR* konnte demnach bei *E. coli* MIIQ nachgewiesen werden und ein weiterer Beleg für die Abstammung von *E. coli* MII erbracht werden.

3.3.3 Empfindlichkeitsbestimmung von E. coli MIIQ

Die in *E. coli* MIIQ eingeführten *dnaQ*-Mutationen sollen keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin und Chloramphenicol besitzen. Die MHK-Werte (siehe Kapitel 2.2.2.1) wurden daher zur Überprüfung bestimmt. Für die anschließende Bestimmung der Mutationsrate wurde zusätzlich die Empfindlichkeit gegenüber Rifampicin bestimmt (siehe Tabelle 3.2). Als Referenzstamm diente für alle drei Bestimmungen *E. coli* MII.

Tabelle 3.2: MHK-Werte für Ciprofloxacin, Chloramphenicol und Rifampicin von *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII

Antibiotikum	*E. coli* MIIQ	Referenz MII
CIP	2 µg/mL	2 µg/mL
CLM	16 µg/mL	32 µg/mL
RIF	8 µg/mL	8 µg/mL

Der um eine Verdünnungsstufe erniedrigte Wert von *E. coli* MIIQ bei Chloramphenicol liegt innerhalb des Schwankungsbereichs der Methode (vergleiche Kapitel 2.2.2.1). Die MHK-Werte für Ciprofloxacin und Rifampicin sind bei beiden Stämmen gleich.

3.3.4 Bestimmung der Mutationsrate von E. coli MIIQ

Die Bestimmung der Mutationsrate (siehe Kapitel 2.2.4) ist der eigentliche Funktionstest der eingeführten Mutationen in *dnaQ*. Wird ein Mutatorphänotyp ausgebildet, ist der Effekt der beiden *dnaQ*-Mutationen in *E. coli* MIIQ nachgewiesen. Dazu wurde die Mutationsrate in einem Rifampicin-Forwardassay (RIF^F-Assay) bei vierfacher MHK bestimmt. Die Ergebnisse der Doppelbestimmung sind in Abbildung 3.10 aufgeführt.

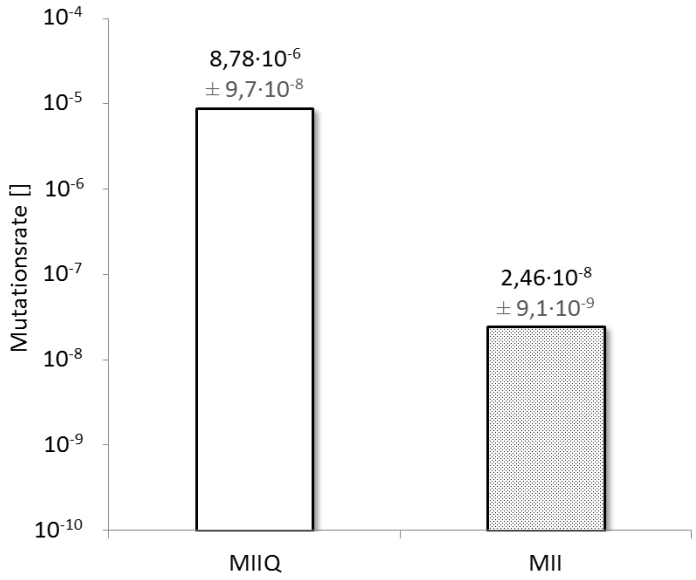


Abbildung 3.10: Mutationsraten mit Standardabweichung (RIF^F-Assay, 4-fach MHK) von *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII

Die Mutationsrate von *E. coli* MIIQ ist ca. 325-fach erhöht gegenüber dem Ausgangsstamm *E. coli* MII. Mutante *E. coli* MIIQ weist eine Mutationsrate auf, die vergleichbar mit der von *E. coli* K12 CSH116 ist (vergleiche Abbildung 3.1). Der Stamm zeigt einen Mutatorphänotyp.

Die Bestimmung der Mutationsrate von *E. coli* MIIQ wurde in Gegenwart von 0,5 µg/mL beziehungsweise 1 µg/mL Ciprofloxacin wiederholt. Ein Einfluss der Ciprofloxacin-induzierten Aktivierung der SOS-Antwort und der Änderung der globalen DNA-Superspiralisierung auf die Mutationsrate wurde damit untersucht (vergleiche Kapitel 3.1). Das Ergebnis der Doppelbestimmung ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

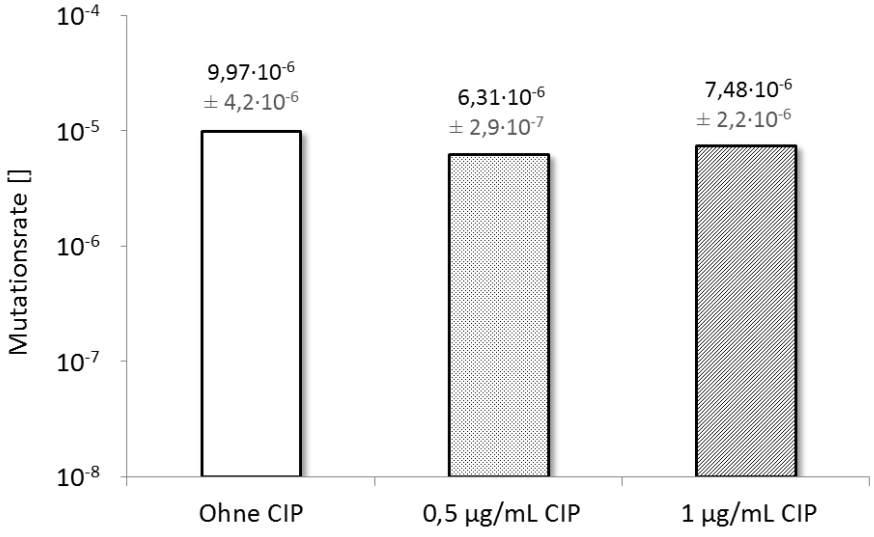
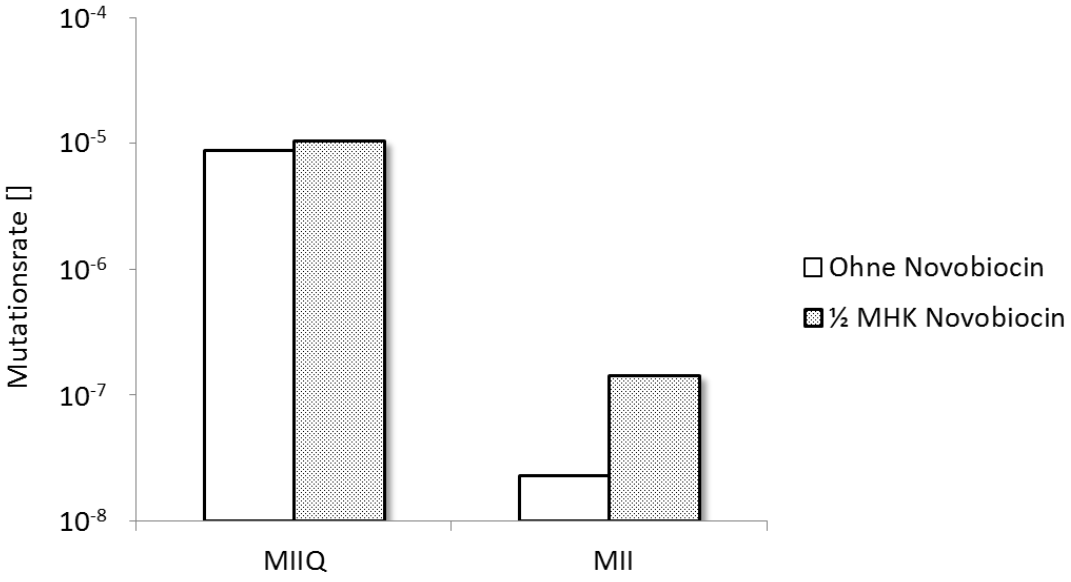


Abbildung 3.11: Mutationsrate mit Standardabweichungen (RIF^F-Assay, 4-fach MHK) von *E. coli* MIIQ bei Ciprofloxacin-Zusatz

Die ermittelten Werte liegen innerhalb einer Zehnerpotenz. Ein Einfluss von Ciprofloxacin auf die Mutationsrate konnte aufgrund der Schwankungsbreite der Methode in diesem Experiment nicht bestimmt werden.

Novobiocin führt bereits in sublethalen Konzentrationen durch Inhibierung von GyrB zu einer starken Änderung des globalen DNA-Spiralisierungsgrads. Eine Bestimmung der Mutationsrate unter Zusatz von Novobiocin wurde zur Untersuchung des Einflusses dieses Effekts auf die Mutationsrate durchgeführt. Die minimale Hemmkonzentration für Novobiocin von *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII wurde dafür zunächst bestimmt. Der MHK-Wert von *E. coli* MIIQ beträgt 1024 µg/mL und der Wert von *E. coli* MII liegt bei 512 µg/mL, jeweils bezogen auf Novobiocin. Die Ergebnisse der Doppelbestimmung der Mutationsrate sind in Abbildung 3.12 dargestellt.



Stamm	Ohne Novobiocin		½ MHK Novobiocin	
MIIQ	$8{,}8 \cdot 10^{-6}$	$\pm\ 5{,}1 \cdot 10^{-6}$	$1{,}0 \cdot 10^{-5}$	$\pm\ 6{,}8 \cdot 10^{-6}$
MII	$2{,}3 \cdot 10^{-8}$	$\pm\ 9{,}1 \cdot 10^{-9}$	$1{,}4 \cdot 10^{-7}$	$\pm\ 8{,}9 \cdot 10^{-8}$

Abbildung 3.12: Mutationsraten und Standardabweichung (RIF^F-Assay, 4-fach MHK) von *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII bei Novobiocin-Zusatz

Die Mutationsrate von *E. coli* MII steigt um nahezu eine Zehnerpotenz durch den Zusatz von Novobiocin. Die Änderung der Mutationsrate von *E. coli* MIIQ liegt innerhalb der Schwankungsbreite der Methode. Eine statistisch signifikante Änderung der Mutationsrate ist bei diesem Stammhintergrund nicht ersichtlich.

3.3.5 Bestimmung der Generationszeit

Ein möglicher Einfluss der in *E. coli* MIIQ eingeführten Mutationen auf die Fitness im Allgemeinen und die Wachstumsgeschwindigkeit im Speziellen wurde durch die Bestimmung der Generationszeit untersucht (siehe Kapitel 2.2.5). FIJALKOWSKA und SCHAAPER [143] berichten von erheblichen Wachstumsbeeinträchtigungen bei ähnlichen Mutatorstämmen. Als Referenz diente der Ausgangsstamm von *E. coli* MIIQ, die Zweitschrittmutante *E. coli* MII. Die Generationszeit wurde aus der Steigung der Gerade berechnet, die bei logarithmischer Auftragung der Lebendkeimzahl (KBE) in der *log*-Phase auftritt. Zur Berechnung wurde die Steigung der Gerade zwischen mindestens drei Messpunkten ermittelt. Diese Messpunkte wurden so ausgewählt, dass die Steigung der erhaltenen Gerade den höchstmöglichen Wert ergibt.

Ein Vergleichswert für die beiden oben genannten Stämme wurde durch die Bestimmung der Generationszeit von *E. coli* K12 CSH116 (vergleiche Kapitel 3.1) mit seinem Ausgangsstamm *E. coli* K12 CSH107 erhalten (siehe Abbildung 3.13).

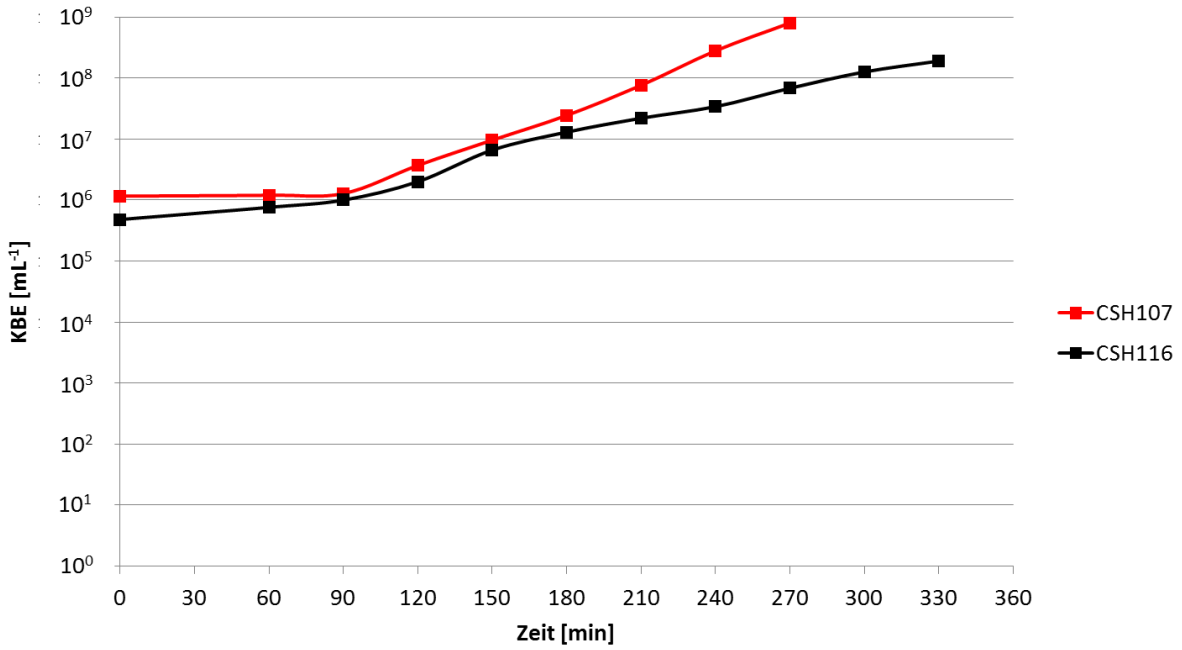


Abbildung 3.13: Auftragung der KBE gegen die Zeit von *E. coli* K12 CSH107 und *E. coli* K12 CSH116 zur Ermittlung der Generationszeit

Die Berechnung der Generationszeit aus den ermittelten Werten zwischen 90 min und 180 min ergab für *E. coli* K12 CSH107 21,2 min und für *E. coli* K12 CSH116 24,3 min. Die Generationszeit ist bei dem *dnaQ*-Mutatorstamm 15% höher als bei seinem Ausgangsstamm.

Dieses Ergebnis kann nicht allein auf die *dnaQ*-Mutationen zurückgeführt werden, da die Stämme konstruktionsbedingt auf molekulargenetischer Ebene differieren (vergleiche Kapitel 3.1.1). Dieses Ergebnis wurde mit den anschließend ermittelten Werten von *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII verglichen.

Die Messpunkte zwischen 420 min und 210 min, beziehungsweise zwischen 210 und 90 min, wurden bei *E. coli* MIIQ in die Berechnung einbezogen. Die Generationszeit von *E. coli* MII wurde aus den Messpunkten zwischen 210 min und 60 min, beziehungsweise zwischen 180 und 60 min berechnet. In Abbildung 3.14 sind die aufgenommenen Daten dargestellt.

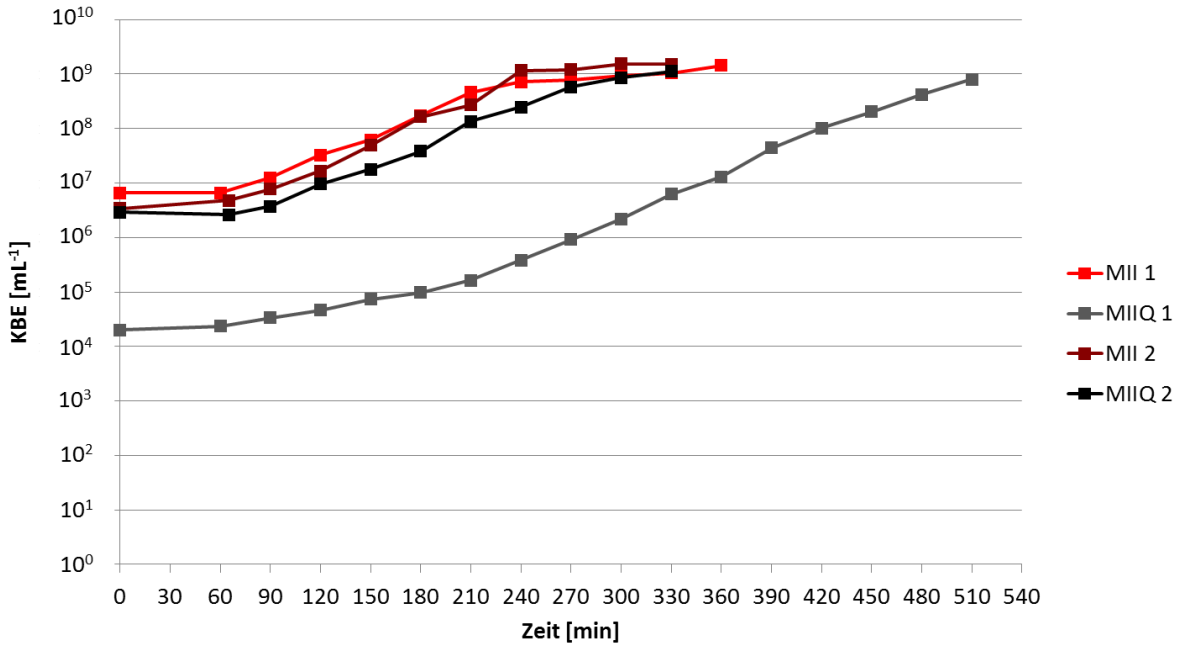


Abbildung 3.14: Auftragung der KBE gegen die Zeit von *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII zur Ermittlung der Generationszeit

Die Berechnung (siehe Kapitel 2.2.5) der Generationszeit aus diesen Daten ergab für *E. coli* MII eine Generationszeit von 22,3 ± 0,3 min und für *E. coli* MIIQ von 22,6 ± 0,8 min. Ein signifikanter Unterschied der Generationszeiten der beiden Stämme wurde nicht festgestellt. Die Erhöhung der Generationszeit durch die *dnaQ*-Mutationen beträgt hier 1,3%. Die Bestimmung der K12-Stämme ergab dagegen eine Erhöhung um 15%. *E. coli* MIIQ zeigt in der ersten Bestimmung eine lange *lag*-Phase mit wenig Wachstum. Das Vorliegen einer kompensatorischen Mutation, die das Wachstum erst ermöglichte, wird in Kapitel 3.3.7 untersucht.

Die optische Dichte der für die Bestimmung verwendeten Bakteriensuspensionen wurde vor dem Animpfen des Mediums bestimmt und durch Verdünnung mit Medium auf 0,2 eingestellt (Wert der 1:10-Verdünnung bei 600 nm). Der initiale KBE-Wert bei der ersten Bestimmung von *E. coli* MIIQ ist trotz dieser Normierung um zwei Zehnerpotenzen niedriger als die übrigen Startwerte. Abweichungen bei der Messung der optischen Dichte können durch Filamentierung der Bakterienzellen entstehen. Dies wurde durch mikroskopische Betrachtung der Bakterienzellen im Anschluss untersucht.

3.3.6 Morphologische Betrachtung

Parallel zu der KBE wurde bei der Bestimmung der Generationszeit die optische Dichte bei 600 nm zu jedem Messzeitpunkt ermittelt. Die daraus ermittelten Werte für die Generationszeit weichen von den aus den KBE-Werten berechneten Generationszeiten ab. Es wurde daher überprüft ob eine Filamentierung vorlag, die die Messung der optischen Dichte beeinflussen kann. Dazu wurde ein Tropfen der jeweiligen Bakteriensuspensionen nach der Generationszeitbestimmung auf einen Objektträger gegeben und verdünnt. Nach Gramfärbung (siehe Kapitel 2.2.9) [152] wurden die Präparate bei 1.000-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop begutachtet (siehe Abbildung 3.15).

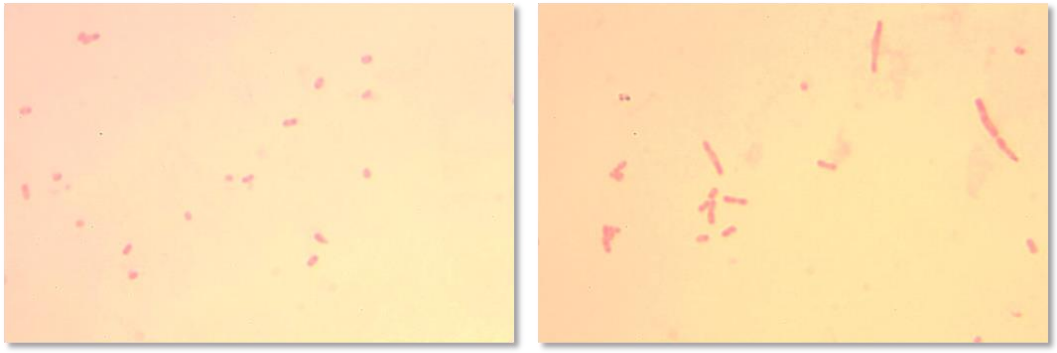


Abbildung 3.15: Mikroskopaufnahme (1000-fache Vergrößerung) von *E. coli* MII und *E. coli* MIIQ nach Gram-Färbung

E. coli MIIQ zeigt im Gegensatz zu *E. coli* MII eine Filamentierung der Zellen. Die Bildung von Ketten aus langgestreckten Bakterienzellen kann einen Einfluss auf die Messung der optischen Dichte haben. Die Bestimmung der Generationszeit aus KBE-Werten erfolgte nach gründlichem Durchmischen der Bakteriensuspensionen. Die Zellen liegen dadurch vereinzelt vor und die Ergebnisse werden nicht durch die Filamentierung beeinflusst.

3.3.7 Prüfung auf Kompensation der erhöhten Mutationsrate

Die *dnaQ*-Mutationen in *E. coli* MIIQ zeigen keinen Einfluss auf die Generationszeit im Vergleich mit *E. coli* MII (siehe Kapitel 3.3.5). Es wurde daher überprüft, ob die erhöhte Mutationsrate kompensiert und Fitnesseinbußen dadurch neutralisiert wurden. FIJALKOWSKA und SCHAAPER zeigten, dass bestimmte Mutationen in *dnaE* die durch DnaQ-Defizienz erhöhte Mutationsrate auf Wildtyp-Niveau senken können [153]. Das Gen *dnaE* codiert für die α-Untereinheit der Polymerase III. Eine derartige Kompensation kann bei *E. coli* durch die Bestimmung der Mutationsrate geprüft werden.

Die Bestimmung der Mutationsrate erfolgte mit einer Zellsuspension (siehe Kapitel 2.2.1) von *E. coli* MIIQ-Zellen, die aus einer Dauerkultur frisch ausgeimpft wurden. Die Dauerkultur wurde nach der zweiten Bestimmung der Generationszeit angelegt. Als Vergleich diente die Dauerkultur, mit der das Medium für die Generationszeitbestimmung inokuliert wurde. Das Ergebnis der Bestimmung ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

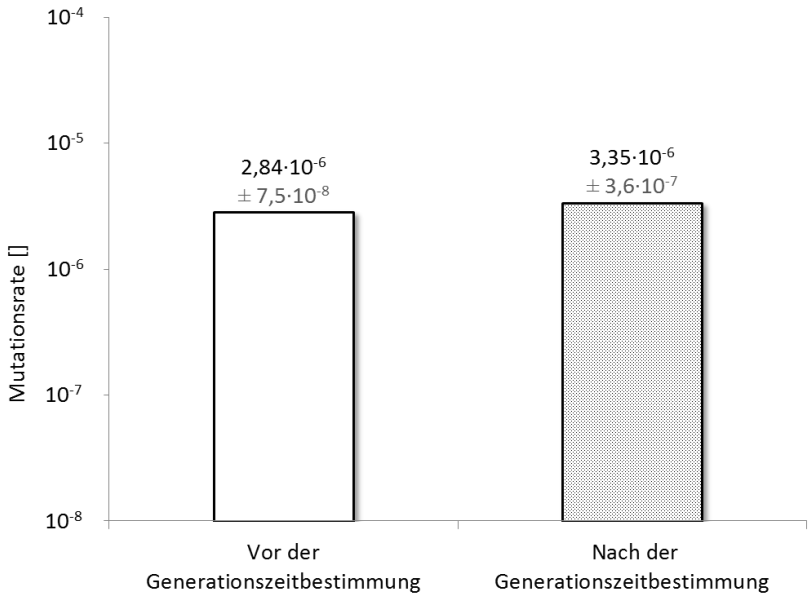


Abbildung 3.16: Mutationsrate mit Standardabweichung (RIF^F-Assay, 4-fache MHK) von *E. coli* MIIQ vor und nach der Generationszeitbestimmung

Abbildung 3.16 zeigt, dass sich die Mutationsrate während des Messzeitraums der Generationszeitbestimmung nicht signifikant ändert. Die Mutationsraten in diesem Assay liegen in einem Größenbereich, wie er für Mutatorstämme in Kapitel 3.1 ermittelt wurde. Die Mutationsrate wurde nicht durch Kompensationsmutationen erniedrigt. Mutationen in *dnaE*, die die Mutationsrate nicht erniedrigen aber einen positiven Einfluss auf die Fitness

von *dnaQ*-Mutatorstämmen ausüben, könnten durch Sequenzierung von *dnaE* ermittelt werden. Bei *E. coli* wurden solche Kompensationsmutationen (ohne Einfluss auf die Mutationsrate) noch nicht nachgewiesen, jedoch für *S. aureus* [153].

3.4 Selektion ciprofloxacinresistenter Mutanten von *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII

Das Ziel des Selektionsversuchs war es, die Mutationsraten von *E. coli* MIIQ und seinem Ausgangsstamm *E. coli* MII in einem Ciprofloxacin-*Forwardassay* miteinander zu vergleichen. Die Auswirkungen der *dnaQ*-Mutationen von *E. coli* MIIQ auf die Mutationsrate und der Schritt von *E. coli* MII zu *E. coli* MIII wurden damit untersucht.

Der hochgradig ciprofloxacinresistente *E. coli* MIII ging nach Selektion mit einem Fluorchinolon aus einer Zweitschrittmutante (*E. coli* MII) von *E. coli* WT hervor. Jeweils eine zusätzliche Punktmutation in *gyrA* und *parC* ist für den wesentlichen Resistenzunterschied zwischen den beiden Stämmen verantwortlich (*E. coli* MII und *E. coli* MIII; vollständiger Genotyp siehe Tabelle 2.1). Der MHK-Wert von Ciprofloxacin erhöht sich durch die zusätzlichen Mutationen um fünf serielle Verdünnungsstufen von 2 µg/mL auf 64 µg/mL. Die theoretische Wahrscheinlichkeit für eine Doppelmutation in zwei Targets ist mit 10^{-15} zu erwarten [154]. Hochgradig ciprofloxacinresistente klinische Isolate weisen häufig mit *E. coli* MIII vergleichbare Mutationen auf [155]. Die Bestimmung der Mutationsraten von *E. coli* MIIQ im Vergleich zu *E. coli* MII in einem Ciprofloxacin-*Forwardassay* ermöglichte es, die Häufigkeit, mit der hochresistente Mutanten selektiert werden, zu erfassen (siehe Abbildung 3.17). Die erhaltenen Mutanten wurden durch DNA-Sequenzanalyse von *gyrA*, *parC* und teilweise *gyrB* und *parE* sowie durch Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit als MHK charakterisiert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit Werten charakterisierter Stämme verglichen.

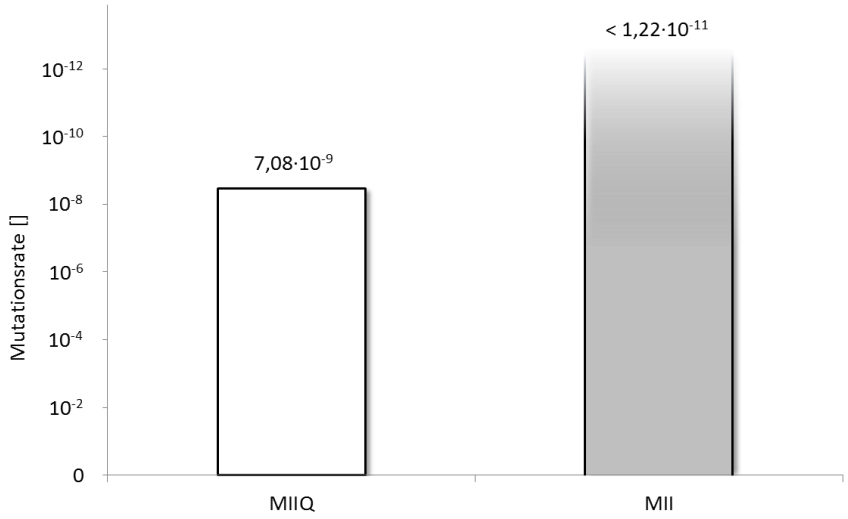


Abbildung 3.17: Mutationsraten (CIP^F-Assay, 4-fache MHK) von *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII

Die für *E. coli* MIIQ bestimmte Mutationsrate lag bei 7,08 x 10^{-9} und ist somit vergleichbar mit Mutationsraten die für Wildtyp *E. coli* im ersten Selektionsschritt ermittelt wurden [154]. Die Mutationsrate von *E. coli* MII liegt in diesem Versuch niedriger als der reziproke Wert der ermittelten KBE von 1,22 x 10^{11}, da keine Mutanten selektiert werden konnten. Die Selektion mit Ciprofloxacin erbrachte für *E. coli* MIIQ in diesem Experiment mindestens 580-mal mehr Mutanten als die Selektion mit *E. coli* MII. Der Unterschied der Mutationsraten der beiden Stämme ist in diesem Assay etwa doppelt so hoch wie in dem Rifampicin-Assay (vergleiche Abbildung 3.10). Die erhaltenen Mutanten von *E. coli* MIIQ wurden anschließend näher charakterisiert.

3.4.1 MHK-Bestimmung der Mutanten

Hochresistente Mutanten aus der Selektion mit *E. coli* MIIQ wurden identifiziert, indem ein zufälliges Kollektiv von 95 Kolonien auf LB-Platten überimpft wurden, die 24 µg/mL Ciprofloxacin enthielten. Die Mutanten erhielten die Bezeichnung MIIQ-CS mit einer fortlaufenden Nummer. Acht Mutanten (siehe Tabelle 3.3) und der zur Kontrolle mitgeführte *E. coli* MIII zeigten Wachstum bei dieser Konzentration an Antibiotikum.

Die genaue Ermittlung der Empfindlichkeit erfolgte durch eine MHK-Bestimmung nach dem Mikrodilutionsverfahren (siehe Kapitel 2.2.2.1) für Ciprofloxacin und Chloramphenicol, sowie für den Effluxpumpeninhibitor Phenylalanyl-arginyl-β-naphthylamid (PAβN) (siehe Tabelle 3.3). Die *E. coli* Stämme MII, MIIQ und MIII wurden als Kontrollen mitgeführt. Bei Stämmen

mit unterschiedlichen Ergebnissen in den einzelnen Messungen sind beide Werte, getrennt durch einen Bindestrich, angegeben.

Tabelle 3.3: MHK-Werte der Mutanten von *E. coli* MIIQ in µg/mL (Doppelbestimmung)

Stamm	Ciprofloxacin	Chloramphenicol	PAβN
MIIQ-CS9	256	64	512
MIIQ-CS10	256	32-64	512
MIIQ-CS12	32	32	512
MIIQ-CS20	256	64	512
MIIQ-CS23	128	32	512
MIIQ-CS45	16	32	512
MIIQ-CS15.	32	32	256
MIIQ-CS32.	128-256	32	512
MIIQ	2	16-32	512
MII	2	16	512
MIII	64	64	512

Die Mutanten zeigten MHK-Werte für Ciprofloxacin, die drei bis sieben Verdünnungsstufen über dem Wert ihres Ausgangsstammes *E. coli* MIIQ liegen. Der MHK-Wert für Ciprofloxacin von *E. coli* MIII wird von fünf Mutanten übertroffen. Die MHK-Werte für Chloramphenicol stiegen bei den Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm um ein bis zwei Stufen. Der MHK-Wert für Chloramphenicol von *E. coli* MIII wird von drei Mutanten erreicht. Die untersuchten *E. coli* MIIQ-CS-Mutanten sind hochresistent gegenüber Ciprofloxacin und zeigen eine verringerte Empfindlichkeit für Chloramphenicol.

3.4.2 MHK-Bestimmung mit Zusatz von PAβN

Die Zugabe von PAβN bei der MHK-Bestimmung zusätzlich zu dem Antibiotikum ermöglichte Aussagen über den Anteil des Efflux an der ermittelten Empfindlichkeit. Phenylalanyl-arginyl-β-naphthylamid (PAβN) inhibiert die Funktion bakterieller Effluxsysteme [156]. Der ermittelten Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin liegen somit nur Veränderungen der Zielstruktur als Resistenzmechanismus zugrunde. Die Empfindlichkeitsbestimmung wurde wie in Kapitel 3.4.1 unter Zusatz von PAβN entsprechend ¼ oder ⅛ der MHK wiederholt (siehe Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5).

Tabelle 3.4: MHK-Werte für Ciprofloxacin der mit Ciprofloxacin selektierten Mutanten von *E. coli* MIIQ in µg/mL bei PAβN-Zusatz (Doppelbestimmung)

Stamm	Ciprofloxacin	Ciproflocaxin + PAβN (⅛ MHK)	Ciproflocaxin + PAβN (¼ MHK)
***E. coli* MIIQ-CS9**	256	32	16
***E. coli* MIIQ-CS10**	256	32	16
***E. coli* MIIQ-CS12**	32	4	4
***E. coli* MIIQ-CS20**	256	32	32
***E. coli* MIIQ-CS23**	128	16	16
***E. coli* MIIQ-CS45**	16	1-2	0,5
***E. coli* MIIQ-CS15.**	32	4	2
***E. coli* MIIQ-CS32.**	128-256	32	16
***E. coli* MIIQ**	2	0,5	0,5
***E. coli* MII**	2	0,5-2	0,25
***E. coli* MIII**	64	32	16

Tabelle 3.5: MHK-Werte für Chloramphenicol der mit Ciprofloxacin selektierten Mutanten von *E. coli* MIIQ in µg/mL bei PAβN-Zusatz (Doppelbestimmung)

Stamm	Chloramphenicol	Chloramphenicol + PAβN (⅛ MHK)	Chloramphenicol + PAβN (¼ MHK)
***E. coli* MIIQ-CS9**	64	2-4	2
***E. coli* MIIQ-CS10**	32-64	2	2
***E. coli* MIIQ-CS12**	32	2	2
***E. coli* MIIQ-CS20**	64	2-4	2
***E. coli* MIIQ-CS23**	32	2	2
***E. coli* MIIQ-CS45**	32	2	2
***E. coli* MIIQ-CS15.**	32	2	2
***E. coli* MIIQ-CS32.**	32	2	2
***E. coli* MIIQ**	16-32	2	2
***E. coli* MII**	16	2-4	2
***E. coli* MIII**	64	4	4

Die MHK-Werte der *E. coli* MIIQ-CS-Mutanten für Ciprofloxacin sind in Gegenwart von PAβN meist um drei Verdünnungsstufen erniedrigt. Chloramphenicol wird in diesen Stämmen zum Großteil über Efflux eliminiert. Die MHK-Werte der *E. coli* MIIQ-CS-Mutanten für Chloramphenicol mit PAβN sind daher um weitere ein bis zwei Stufen erniedrigt. Die MHK-Werte sinken in Gegenwart einer Konzentration an PAβN, die einem Viertel des MHK-Werts entspricht, stärker als bei der niedrigeren Konzentration. Zusammenfassend könnten weitere Effluxmechanismen an der Ausprägung der Resistenz beteiligt sein. Der Anteil der

chromsomalen Veränderungen an der Resistenz von *E. coli* MIII wird nicht übertroffen. In Abbildung 3.18 ist die Reduktion der MHK-Werte durch PAβN graphisch dargestellt.

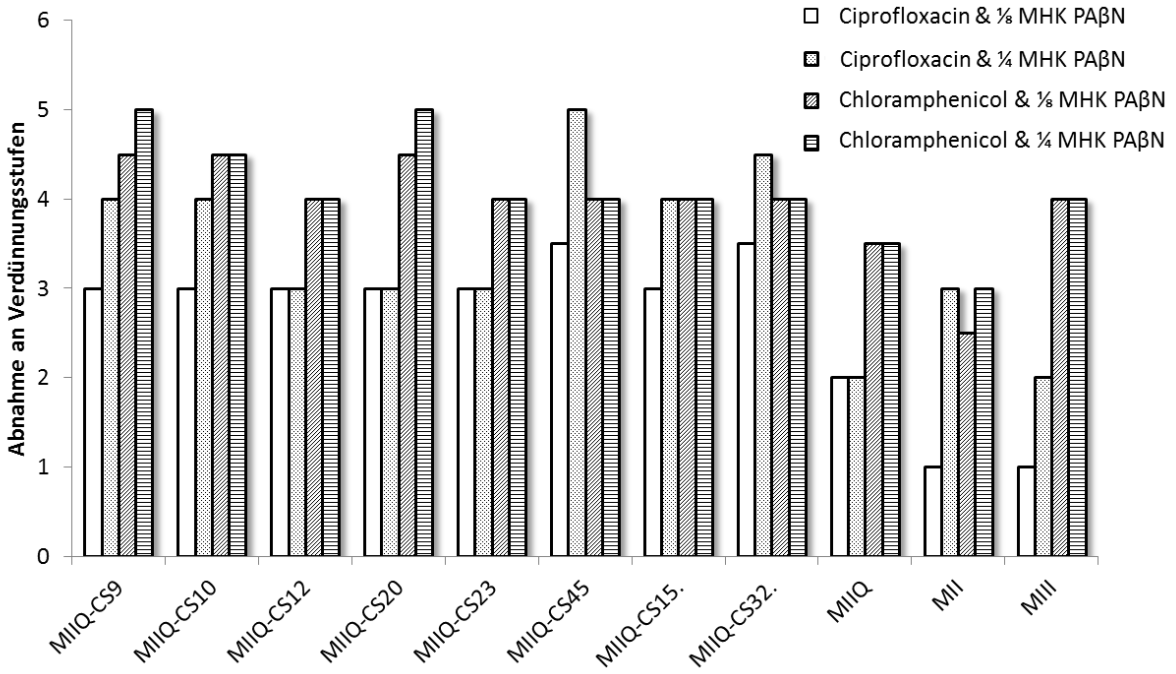


Abbildung 3.18: Darstellung des Mittelwerts der Abnahme an seriellen MHK-Verdünnungsstufen der *E. coli* MIIQ-CS-Mutanten durch PAβN

3.4.3 Sequenzanalyse der Mutanten

Die molekulargenetische Grundlage der Resistenz der selektierten *E. coli* MIIQ-CS-Mutanten gegenüber Fluorchinolonen wurde durch Sequenzierung der *quinolone resistance determining regions* (QRDRs) untersucht [157]. Die Gene *gyrA* und *parC*, die für die beiden primären Zielstrukturen der Fluorchinolone codieren, wurden zuerst partiell sequenziert. Abbildung 3.19 zeigt links den Bereich von Codon 82 bis 88 von *gyrA* und rechts den Bereich von Codon 79 bis 85 von *parC* der jeweiligen Stämme. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit online verfügbaren Sequenzen von *E. coli* K12 MG1655 (NCBI Referenznummer NC_000913.2) und *E. coli* CFT073 (NCBI Referenznummer NC_004431.1) verglichen. Zudem ist ein Vergleich mit dem Ausgangsstamm *E. coli* MIIQ (mit identischen Zielstrukturmutationen wie *E. coli* MII) und der Mutante *E. coli* MIII möglich. Das PCR-Fragment für die Sequenzierung des Abschnittes von *gyrA* wurde mit den Primern gyrA_5-1 und gyrA_3-1 (Fragmentgröße 524 bp) erzeugt. Das PCR-Fragment für die Sequenzierung des *parC*-Abschnittes wurde mit den Primern parC_S und parC_U (Fragmentgröße 236 bp) hergestellt.

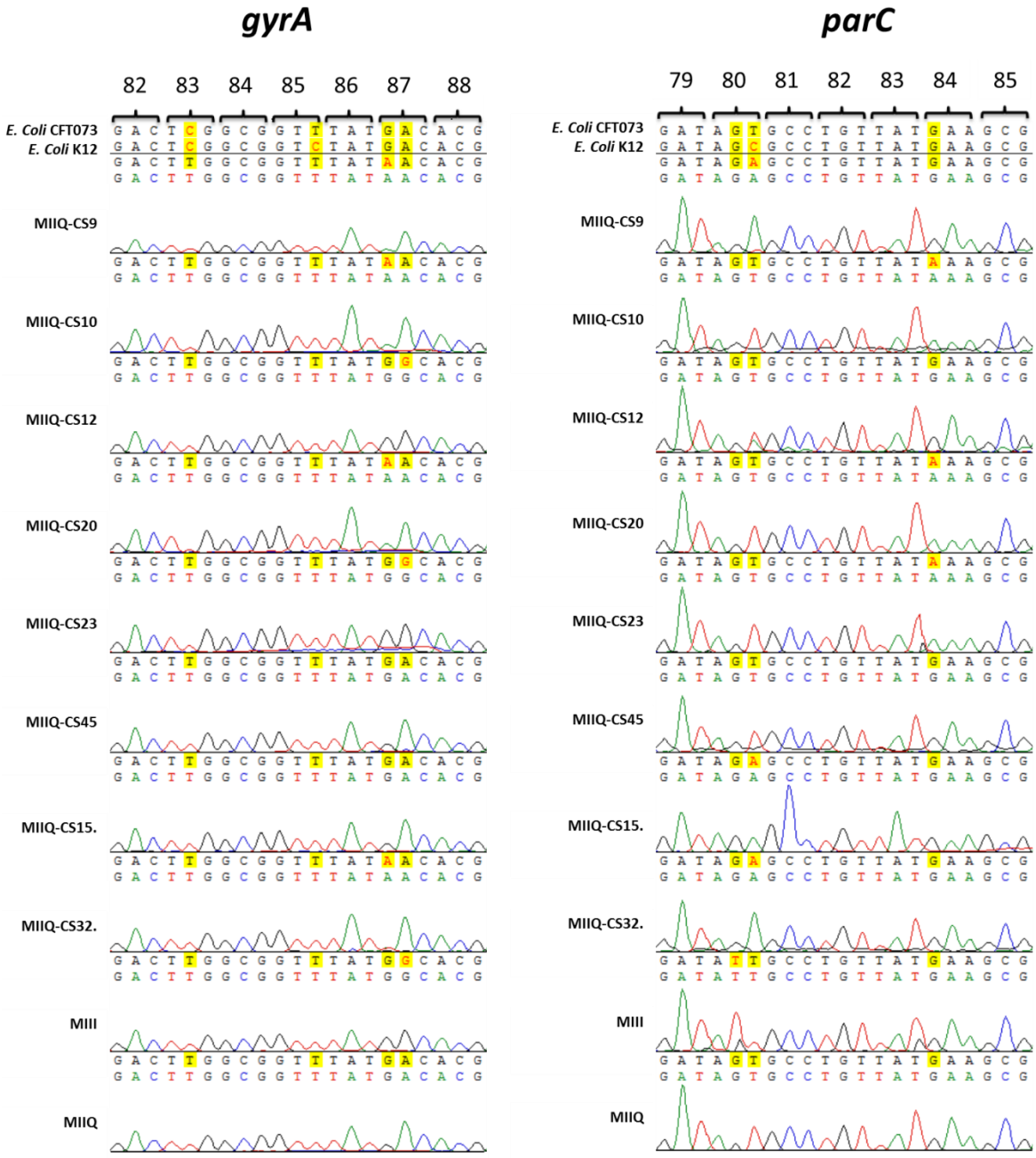


Abbildung 3.19: DNA-Sequenzchromatogramm der QRDRs (Ausschnitt) von *gyrA* und *parC* der *E. coli* MIIQ-CS-Mutanten; Erläuterungen im Text

Das Chromatogramm zeigt, dass alle Stämme die Punktmutation des Ausgangsstammes *E. coli* MII in Codon 83 von *gyrA* aufweisen. Diese Punktmutation führt im GyrA-Protein zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Leucin. Sechs *E. coli* MIIQ-CS-Mutanten weisen eine zusätzliche Punktmutation in Codon 87 auf, die Ausgangsstamm *E. coli* MIIQ nicht zeigt. Diese Mutation ändert Aminosäure 87 von GyrA von Asparaginsäure zu Glycin oder Asparagin.

Die DNA-Sequenz von *parC* bei *E. coli* MIIQ entspricht in dem sequenzierten Bereich der Wildtypsequenz. Mutationen in *parC* wurden in sechs *E. coli* MIIQ-CS-Mutanten entweder in Codon 80 oder Codon 84 gefunden. Serin an Position 80 wird dadurch durch Isoleucin oder Arginin ersetzt. Glutaminsäure an Position 84 wird durch die DNA-Punktmutation durch Lysin ersetzt. An Position 80 findet sich bei den isolierten Mutanten in der Regel Arginin, im Vergleich zu Isoleucin bei *E. coli* MIII. Beide Mutationen erfordern nur den Austausch einer DNA-Base im relevanten Codon.

Die Stämme MIIQ-CS9, MIIQ-CS10, MIIQ-CS20, MIIQ-CS23 und MIIQ-CS32. weisen demnach im Vergleich mit *E. coli* MIIQ zwei zusätzliche Mutationen in den QRDRs der Gene *gyrA* und *parC* auf. Die Anzahl von jeweils drei chromosomalen Targetmutationen, wie bei *E. coli* MIII, wurde in diesen Stämmen gefunden. Mit diesen Ergebnissen können die in Tabelle 3.3 aufgeführten MHK-Werte für Ciprofloxacin erklärt werden (siehe auch Kapitel 4.4).

Die Gene *gyrB* und *parE*, die für die sekundären Zielstrukturen GyrB und ParE codieren, wurden in den übrigen Stämmen *E. coli* MIIQ-CS12, *E. coli* MIIQ-CS45 und *E. coli* MIIQ-CS15 sequenziert. Das PCR-Fragment für die Sequenzierung von *gyrB* wurde mit den Primern gyrB_5B9_+871 und gyrB_3B2_+1508 erzeugt (Fragmentgröße 638 bp). Ein Teil von *parE* wurde mit den Primern parE_RT_1679R und parE_T_1189 amplifiziert (Fragmentgröße 491 bp). Abbildung 3.20 zeigt den Bereich von Codon 463 bis 465 von *gyrB* der jeweiligen Stämme. Andere Bereiche von *gyrB*, in denen Resistenzmutationen auftreten können (zum Beispiel Codon 426 oder Codon 447) zeigten keine Veränderungen im Vergleich zu den Referenzstämmen.

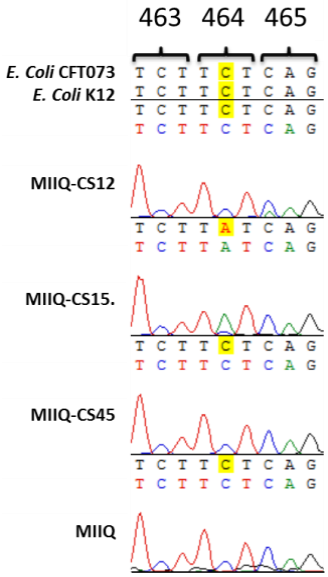


Abbildung 3.20: Ausschnitt des DNA-Sequenzchromatogramms von *gyrB* von *E. coli* MIIQ-CS-Mutanten; Erläuterungen im Text

E. coli MIIQ-CS15. weist eine Punktmutation in Codon 464 auf. Im GyrB-Protein führt diese Mutation zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Tyrosin. Die Mutation liegt nicht in der ausgewiesenen QRDR [157], wurde jedoch in verschiedenen anderen Spezies bereits beschrieben [158, 159, 160]. Der sequenzierte Bereich von *parE* (inklusive der nicht in Abbildung 3.20 gezeigten QRDR) zeigt in den Mutanten keine von *E. coli* MIIQ abweichende Sequenz. Bei *E. coli* MIIQ-CS12 ist ein Doppelpeak in Codon 465 zu erkennen. Spätere Sequenzierungen zeigten keine Mutation an dieser Position. Es lag eine Mischkultur vor, die ausgeeinzelt werden musste (siehe auch Ergebnisse zur kompletten Sequenzierung von *parC* in diesem Kapitel).

Die MHK-Werte für Ciprofloxacin von *E. coli* MIIQ-CS12 und *E. coli* MIIQ-CS45. sind höher als die von Stämmen mit ähnlichen Targetmutationen. *E. coli* MII-3 mit einem MHK-Wert für Ciprofloxacin von 16 µg/mL weist genauso wie *E. coli* MIIQ-CS12 Punktmutationen in den Codons 83 und 87 von *gyrA* auf (Mutation in Codon 87 wurde durch in-vitro Mutagenese bei *E. coli* MII-3 eingeführt, siehe Tabelle 2.1). *E. coli* MII mit einem MHK-Wert für Ciprofloxacin von 2 µg/mL besitzt dieselben Fluorchinolonresistenzmutationen wie *E. coli* MIIQ-CS45 (GyrA S83L und Δ*marR*). Die Gene *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE* wurden daher in *E. coli* MIIQ-CS12 und *E. coli* MIIQ-CS45 komplett sequenziert. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tabelle 2.3 aufgeführt. Die Sequenzen von *E. coli* MIIQ als Ausgangsstamm wurden parallel als Referenzen für Vergleiche ermittelt.

In den nachfolgenden Abbildung 3.21 bis Abbildung 3.24 sind die aus den Nukleotidsequenzen übersetzten Aminosäuresequenzen aufgeführt.

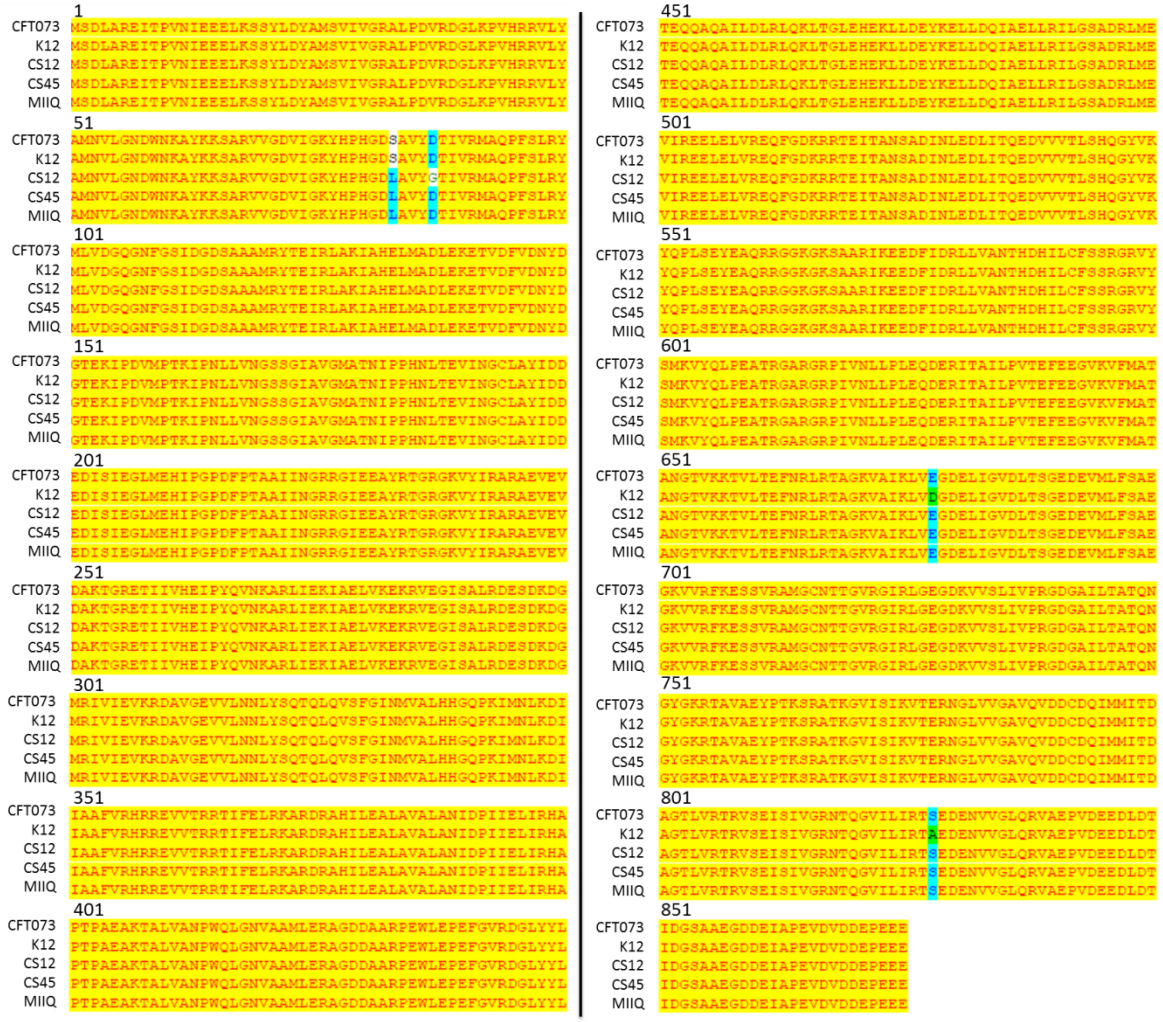


Abbildung 3.21: Aminosäuresequenz von GyrA der sequenzierten Stämme; Erläuterungen im Text

Abbildung 3.21 zeigt die bisher in den Stämmen gefundenen Mutationen an Position 83 und 87. Farblich hervorgehoben sind zudem zwei Variationen zwischen *E. coli* K12 MG1655 und *E. coli* CFT073. Die Sequenz von *E. coli* CFT073 als nahem Verwandten von *E. coli* WT und somit auch von *E. coli* MII [155] diente als primäre Referenz in diesem Versuch.

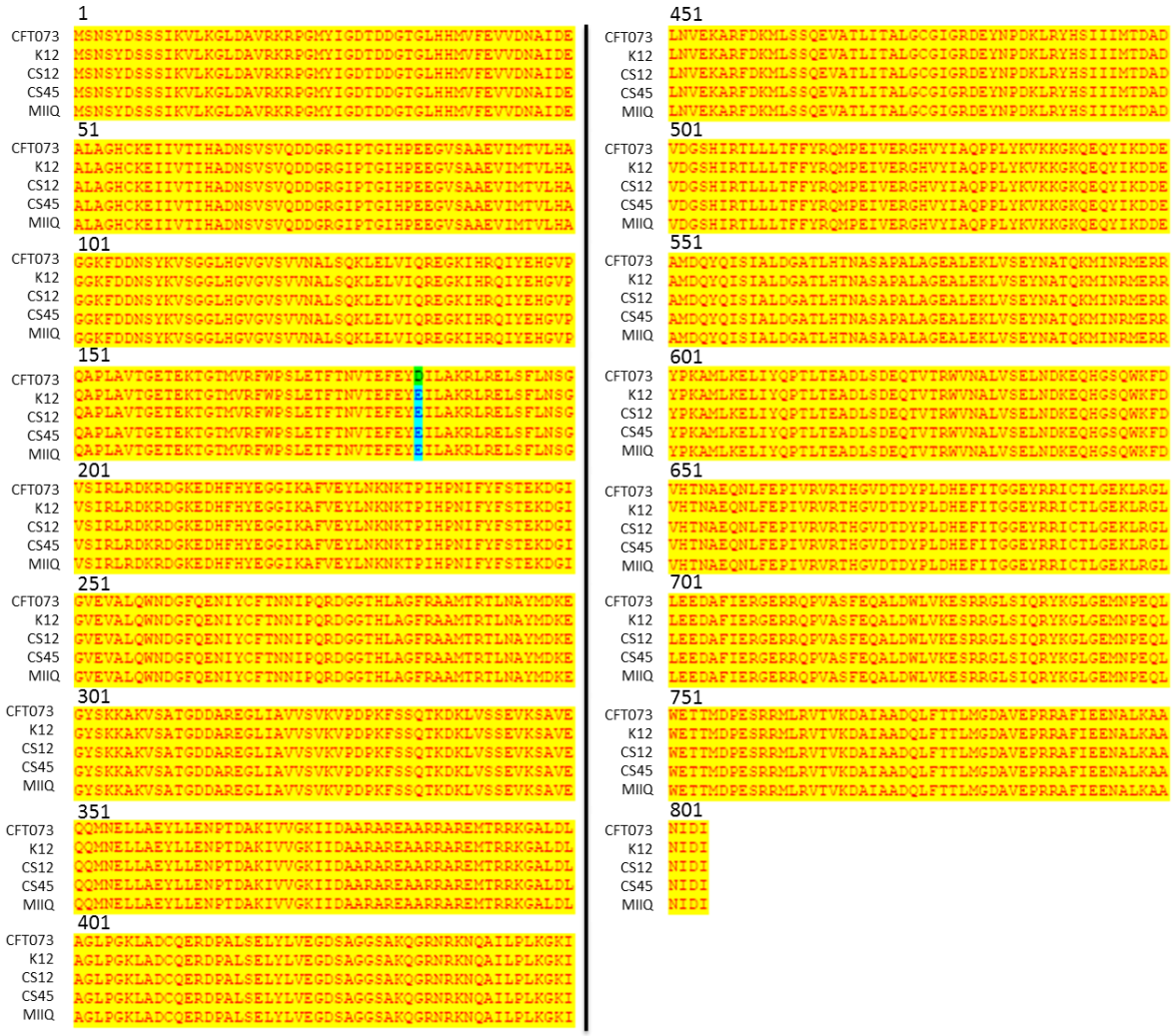


Abbildung 3.22: Aminosäuresequenz von GyrB der sequenzierten Stämme; Erläuterungen im Text

Abbildung 3.22 zeigt für *E. coli* CFT073 eine von den anderen Stämmen abweichende Sequenz an Position 185. Die Sequenz der Mutanten stimmt vollständig mit der Sequenz von *E. coli* K12 MG1655 überein. *E. coli* K12 MG1655 weist keinen erhöhten MHK-Wert für Ciprofloxacin auf [161]. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass weder Asparaginsäure noch Glutaminsäure an Position 185 von GyrB Einfluss auf die Fluorchinolonresistenz haben.

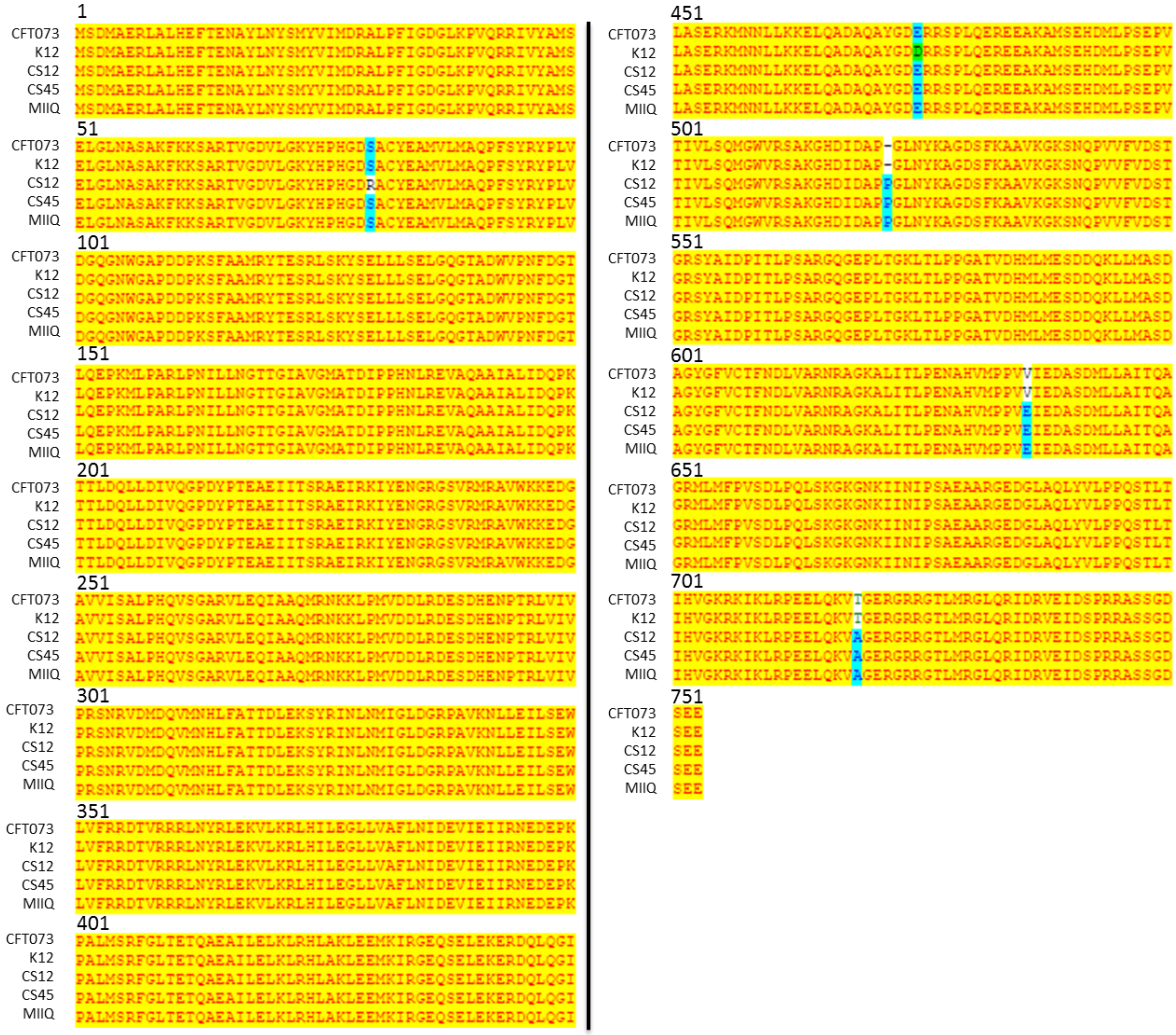


Abbildung 3.23: Aminosäuresequenz von ParC der sequenzierten Stämme; Erläuterungen im Text

Abbildung 3.23 zeigt, dass bei *E. coli* MIIQ, *E. coli* MIIQ-CS12 und *E. coli* MIIQ-CS45 an Position 522 ein Prolin insertiert ist. Eine Sequenzanalyse ergab, dass diese Insertion bereits in *E. coli* MII, dem Ausgangstamm für die ortsspezifische Mutagenese, anzufinden ist [A. Heisig, persönliche Mitteilung]. Stromabwärts des Strukturgens ist bei diesen Stämmen ein Basen-Triplett deletiert. Der Einfluss dieser Mutation auf die Funktion von ParC wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht untersucht. Die beiden *E. coli* MIIQ-CS-Mutanten zeigen in ParC keine von *E. coli* MIIQ abweichende Aminosäuresequenz.

Serin ist an Position 80 von *E. coli* MIIQ-CS12 anhand dieser Sequenzierung durch Arginin ersetzt. Die vorangegangene Sequenzierung des QRDRs ergab an dieser Position einen Doppelpeak. Die Dauerkultur wurde deshalb vereinzelt und die Sequenzierung des Ausschnitts von *parC* wiederholt. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine Mischkultur vorlag mit einem Stamm ohne *parC*-Mutationen und einen MHK-Wert für Ciprofloxacin von 32 µg/mL

und einem Stamm mit *parC*-Mutation in Codon 80 und einem MHK-Wert für Ciprofloxacin von 64 µg/mL. Die Wiederholung der Sequenzierung von *gyrB* zeigte, dass es sich bei dem Doppelpeak in Codon 465 bei *E. coli* MIIQ-CS12 nicht um eine Mutation handelt.

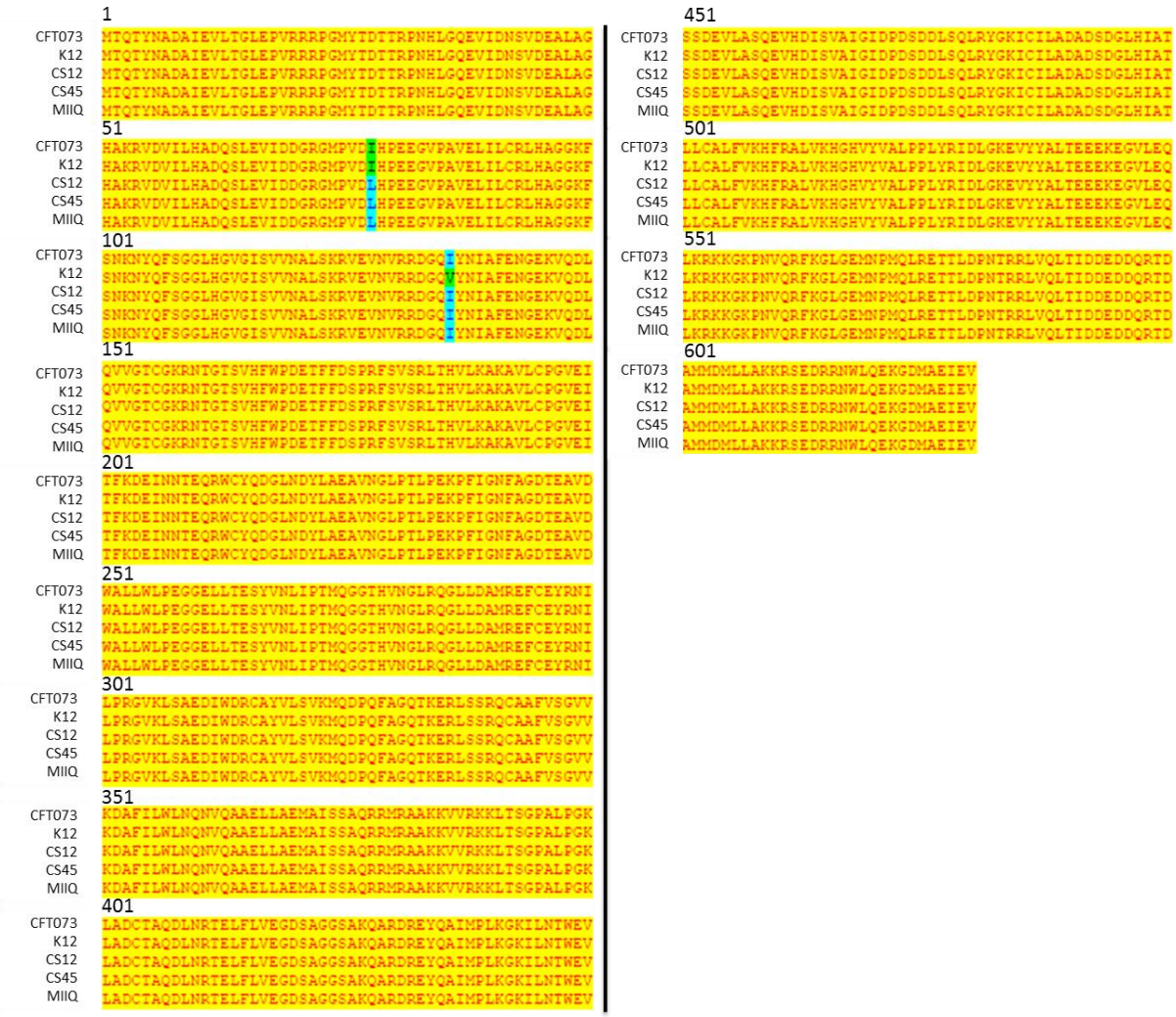


Abbildung 3.24: Aminosäuresequenz von ParE der sequenzierten Stämme; Erläuterungen im Text

Abbildung 3.24 zeigt, dass die Aminosäuresequenzen von ParE von *E. coli* MIIQ und den daraus hervorgegangenen Mutanten übereinstimmt. Keine Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch führt, wurde gefunden.

Zusammenfassend sind in Tabelle 3.6 alle Mutationen der sequenzierten Stämme aufgeführt. Mutante *E. coli* MIIQ-CS45 zeigt keine zusätzliche Mutation in den Zielstrukturen der Fluorchinolone. Die übrigen sieben *E. coli* MIIQ-CS-Mutanten unterscheiden sich von *E. coli* MIIQ durch zwei zusätzliche Targetmutationen, jeweils eine in einer Gyrase-Untereinheit und eine in der A-Untereinheit von Topoisomerase IV.

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der Fluorchinolonresistenzmutationen der sequenzierten Stämme; Erläuterungen im Text

Stamm	GyrA	ParC	GyrB	ParE
MIIQ-CS9	S83L / D87N	S80R		
MIIQ-CS10	S83L / D87N	E84K		
MIIQ-CS12	S83L / D87G	S80R	-	-
MIIQ-CS20	S83L / D87N	E84K		
MIIQ-CS23	S83L / D87G	E84K		
MIIQ-CS45	S83L	-	-	-
MIIQ-CS15.	S83L	S80R	S464Y	-
MIIQ-CS32.	S83L / D87N	S80R		
MIIQ	S83L	-	-	-
MII	S83L			
MIII	S83L / D87G	S80I		

Die durch Selektion aus *E. coli* MIIQ hervorgegangenen Mutanten zeigen verschiedene Punktmutationen an bekannten Positionen der Zielstrukturen. Der Vergleich des Mutationsmusters mit den MHK-Werten aus Tabelle 3.3 zeigt, dass zusätzliche Mutationen in GyrB und ParC die MHK in geringerem Maße erhöhen als die Kombination GyrA und ParC. Die detaillierte Diskussion des Vergleichs der MHK-Werte mit den Targetmutationen erfolgt in Kapitel 4.4.

Die Ergebnisse der bisherigen Experimente belegten, dass bei Vorhandensein eines DnaQ-bedingten Mutatorphänotyps, die Anzahl an Fluorchinolonresistenzmutationen bei Selektion mit Ciprofloxacin deutlich zunimmt. Ebenso nahm die Frequenz von Doppelmutationen innerhalb eines Selektionsschrittes zu. Der Kern der Fragestellung (Übt DnaQ einen Einfluss auf die Entstehung von Fluorchinolonresistenz aus?) ist somit zumindest für eine dominante DnaQ-Mutatormutation beantwortet. Ob diese artifizielle Laborbedingung auf klinische Isolate übertragbar ist, kann durch die Umkehr des experimentellen Weges untersucht werden. Dazu wurde nicht wie bislang der Einfluss einer DnaQ-Mutation auf die Entstehung von Fluorchinolonresistenz untersucht, sondern klinische Isolate, die natürlich Resistenz erworben haben, hinsichtlich Veränderungen von DnaQ charakterisiert. Können DnaQ-Mutatormutationen in den klinischen Isolaten identifiziert werden, so ist dies ein Hinweis für die Beteiligung chromosomaler Veränderungen in DnaQ bei der Entstehung von Fluorchinolonresistenz im natürlichen Umfeld.

3.5 Sequenzanalyse von *dnaQ* in klinischen Isolaten

Die Variabilität der *dnaQ*-Sequenz in klinischen Isolaten wurde in zehn Stämmen aus einem Kollektiv klinischer Isolate von *E. coli* mit Fluorchinolonresistenz (Hope *et al*, London 2006) untersucht. Mutationen mit Einfluss auf die Proteinfunktion sollten durch den Vergleich mit Sequenzen von bekannten *dnaQ*-Mutatorstämmen [162, 163, 164] ermittelt werden. Die verschiedenen Mutatorphänotypen, die durch die einzelnen Mutationen entstehen, wurden in Kapitel 1.2.1 vorgestellt. Das *dnaQ*-Gen wurde inklusive der Promotorbereiche nach NOMURA *et al* [165] sequenziert. Mutationen, die einen Einfluss auf die Expression von *dnaQ* zeigen könnten, sollten dadurch ebenfalls erfasst werden. Die für die Generierung der PCR-Fragmente verwendeten Primer waren dnaQ_-264_fw, dnaQ_-108_fw, dnaQ_+346_fw, dnaQ_+367_rv und dnaQ_+811_rv. Die verwendeten fluorchinolonresistenten *E. coli* Isolate sind zusammen mit dem MHK-Wert für Ciprofloxacin und bekannten Fluorchinolon-Resistenzmutationen in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tabelle 3.7: Verwendete *E. coli* Stämme für die DNA-Sequenzierung von *dnaQ*

Stamm	MHK CIP (µg/mL)	GyrA	ParC
***E. coli* Eo80**	256	S83L / D87N	S80R
***E. coli* Eo88**	128	S83L / D87N	S80I
***E. coli* Eo100**	64	S83L / D87N	S80I
***E. coli* Eo320**	256	S83L / D87N	S80R
***E. coli* Eo333**	32	S83L / D87N	S80I
***E. coli* Eo342**	32	S83L / D87N	-
***E. coli* Eo457**	512	S83L / D87N	S80I
***E. coli* Eo652**	256	S83L / D87N	S80I
***E. coli* Eo977**	32	S83L / D87N	S80I / E84V
***E. coli* Eo999**	64	S83L / D87N	S80I / E84V

In Tabelle 3.8 sind sieben *E. coli* Mutanten aus dem Stammkollektiv des Arbeitskreises aufgeführt, deren Teilsequenzen für *gyrA* und *parC* ebenfalls bestimmt worden waren [A. Heisig, persönliche Mitteilung].

Tabelle 3.8: Weitere für die DNA-Sequenzierung von *dnaQ* verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	MHK CIP (µg/mL)	GyrA	ParC	*ΔmarR*
MIIQ	2	S83L	-	175 bp
MIII	64	S83L / D87G	S80I	74 bp
MIII-300	64	S83L / D87G	S80I	74 bp
WT3	1	S83L / D87G		
CSH116	0,015	-	-	-
WT3-1-M4	-	S83L / D87G	S80R	-
MI-4	0,5	S83L	S80I	-

Die Gene *dnaQ* und das benachbarte *rnhA* werden konvergent transkribiert [165]. Die Promotorbereiche liegen zum Teil in den Strukturgenen des jeweiligen anderen Gens und die Transkripte überlappen sich (siehe Abbildung 3.25).

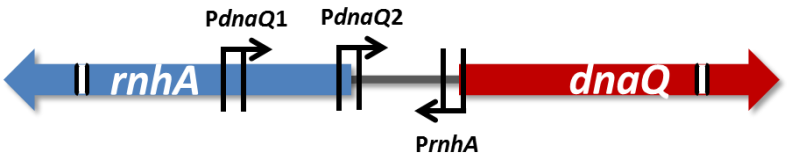


Abbildung 3.25: Schema der regulatorischen Bereiche von *dnaQ* und *rnhA;* P*dnaQ* und P*rnhA*: Promotoren mit schematischer Unterteilung in -10- und -35-Region; Erläuterungen im Text

Das Ergebnis der Sequenzierung der Promotorbereiche ist in Abbildung 3.26 Teil A dargestellt. Die Sequenzen von *E. coli* CFT073 und *E. coli* K12 MG1655 dienten als Referenzen. Ein Vergleich mit *E. coli* MIII ist ebenso möglich, welcher sich in der dargestellten Sequenz nicht von *E. coli* MII unterscheidet.

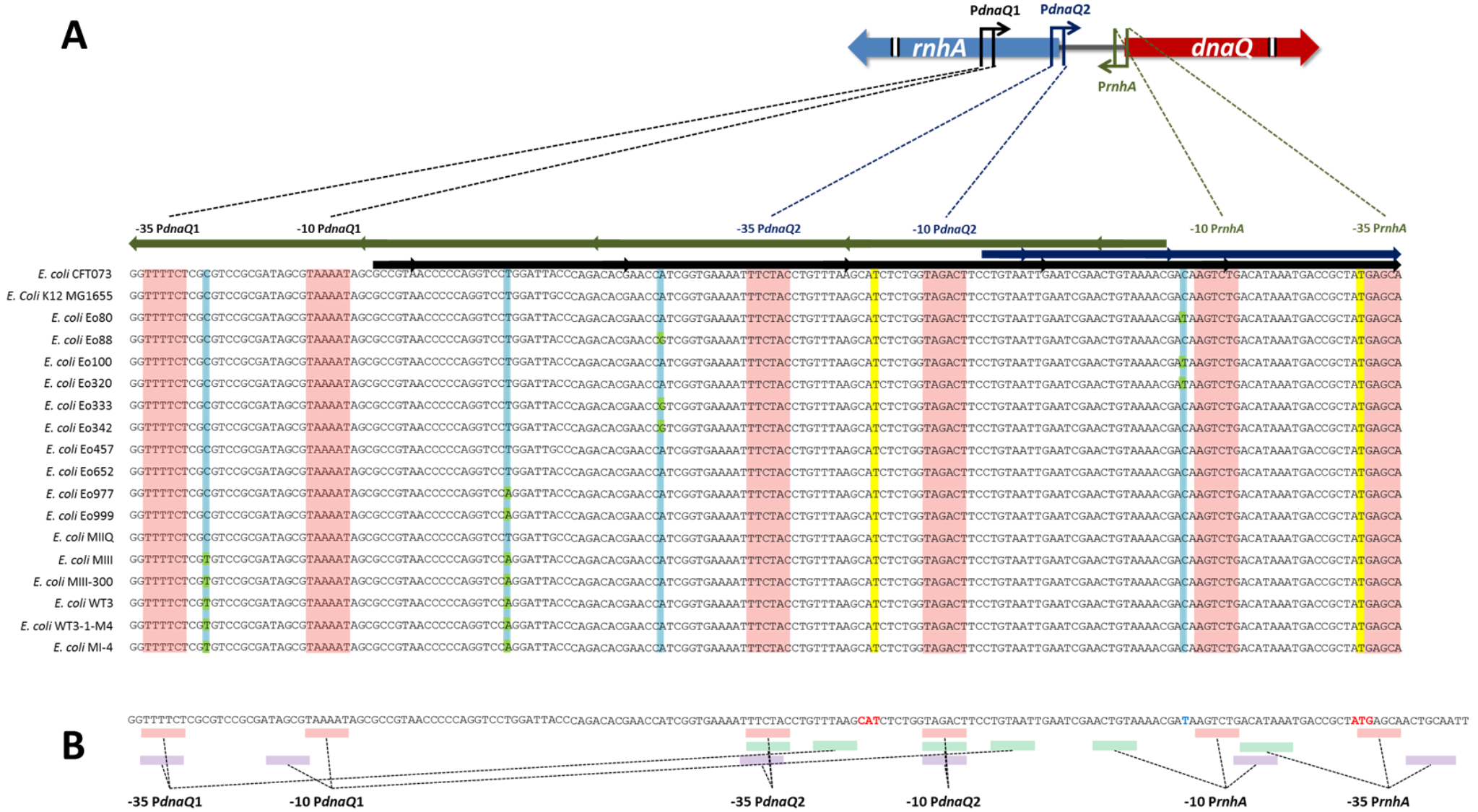


Abbildung 3.26: Teil A: DNA-Sequenz *upstream* von *dnaQ*. Promotorbereiche (nach Nomura *et al* [165]) sind hellrot hinterlegt; die Startpunkte der Gene gelb. Pfeile signalisieren den Transkriptstart. Mutationen sind grün und hellblau hervorgehoben; Transkripte über den Sequenzen in schwarz (*dnaQ*1), blau (*dnaQ*2) und grün (*rnhA*). Teil B: Schema der postulierten Promotorbereiche von *dnaQ* und *rnhA* nach NOMURA *et al* [159] in rot, nach MAKI *et al* [174] in grün und nach COX *et al* [175] in lila; Startcodons von *rnhA* und *dnaQ* in rot; nähere Erläuterungen im Text

Die Stämme *E. coli* Eo80, *E. coli* Eo100 und *E. coli* Eo320 zeigen an Position -23 vor dem ATG von *dnaQ* eine Punktmutation. Die Mutation befindet sich nicht in einem ausgewiesenen regulatorischen Bereich, sondern zwischen der -10-Region des Promotors (-10 P*rnhA*) und dem Transkriptstart von *rnhA*. Die Ergebnisse zur Lage der Promotorbereiche von NOMURA *et al* [165] wurden herangezogen, weil diese auf experimentellen und nicht nur theoretischen Befunden beruhen. Auch wenn andere Vorschläge (MAKI *et al* [181] und COX *et al* [180]) für den strukturellen Aufbau berücksichtigt werden, liegt die gefundene Mutation nicht in einem für die Regulation bekanntermaßen relevanten Bereich (siehe Abbildung 3.26 Teil B). Die von MAKI *et al* vorgeschlagene Sequenz für P*dnaQ*2 stimmt mit der gezeigten von NOMURA *et al* überein. Der Vorschlag von COX *et al* unterscheidet sich davon nur dadurch, dass die -35-Region um eine Base in Richtung *rnhA* verschoben ist (Sequenzbereich in Abbildung 3.26: TTTCTA). P*dnaQ*1 ist nach MAKI *et al* weit in Richtung *dnaQ* verschoben (Sequenzbereich in Abbildung 3.26: -35-Region TTTAAG und -10-Region TGTAAT), nahezu bis zum Bereich von P*dnaQ*2. Nach COX *et al* ist P*dnaQ*1 nur in der -10-Region um 5 Basen in Richtung *rnhA* verschoben (Sequenzbereich in Abbildung 3.26: TAGCGT); die -35-Region ist gleich. P*rnhA* ist nach MAKI *et al* um 16 beziehungsweise 14 Basen in Richtung *rnhA* verschoben (Sequenzbereich in Abbildung 3.26: -35-Region ACATAAA und -10-Region ACTGTA) und nach COX *et al* jeweils um 5 Basen in Richtung *dnaQ* (Sequenzbereich in Abbildung 3.26: -35-Region ACTGCAA und -10-Region GACATA).

Eine mögliche Auswirkung der Mutation 23 Basenpaare 5´ des Genstarts von *dnaQ* auf die *dnaQ*-Expression wird in Kapitel 3.7 untersucht. Theoretisch denkbar wäre auch eine Veränderung der *rnhA*-Expression mit sekundärem Einfluss auf *dnaQ*, aufgrund des transvergent überlappenden Aufbaus der regulatorischen Bereiche [165].

Die aus der ermittelten DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz von DnaQ ist in Abbildung 3.27 dargestellt. Diese Darstellung erlaubt, durch den Vergleich mit bekannten konservierten Bereichen des Proteins und mit beschriebenen Mutatormutationen, Spekulationen über die Änderung der Proteinfunktion aufgrund der gefundenen DnaQ-Strukturgenmutationen.

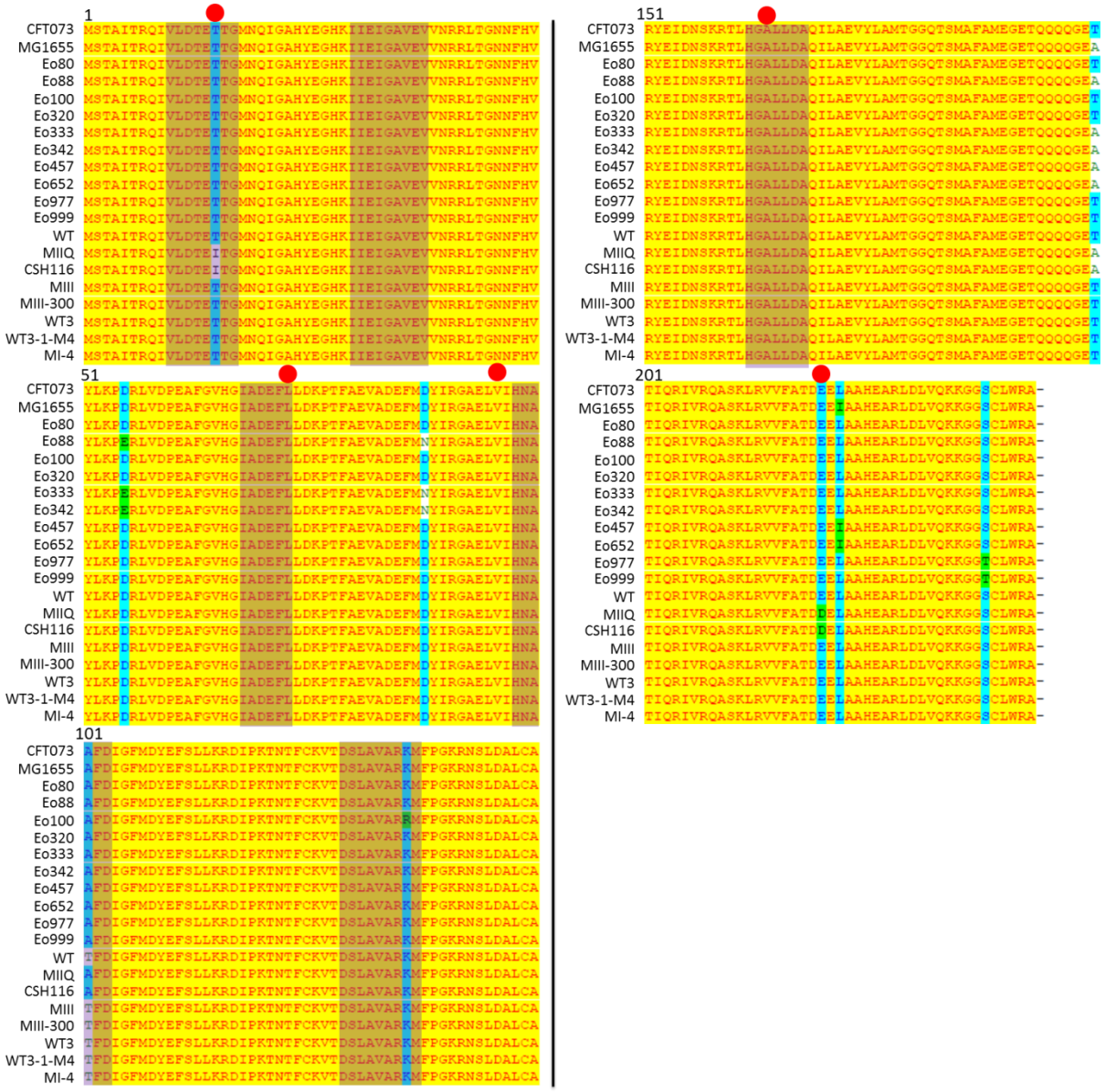


Abbildung 3.27: Aminosäure-Alignment von DnaQ für die sequenzierten Stämme. Konservierte Bereiche [166] sind grau hinterlegt. Rote Punkte signalisieren bekannte Mutator-Mutationen [162]. Mutationen sind grün und hellblau hervorgehoben; Leserichtung: Von oben nach unten dann nach rechts oben; Erläuterungen im Text

Bei der Sequenzierung wurden mehrere Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, identifiziert. Die erfolgreiche Einführung der beiden Punktmutationen des *dnaQ*-Gens von *E. coli* K12 CSH116 in *E. coli* MII konnte bestätigt werden (siehe Kapitel 3.2.5). Für die Stämme *E. coli* Eo88, *E. coli* Eo333 und *E. coli* Eo342 wurden in den *dnaQ*-Genen Punktmutationen identifiziert, die zu zwei Mutationen, D55E und D88N, führen. Bei *E. coli* Eo100 ist an Position 136 ein Lysin durch Arginin ersetzt. Diese Mutation befindet sich in einem konservierten Bereich von *dnaQ* (Diskussion siehe Kapitel 4.7). In *E. coli* Eo977 und *E. coli* Eo999 ist Aminosäure 238 (Serin) am C-terminalen Ende durch Threonin ersetzt. Der C-Terminus von DnaQ ist mit der Bindung an die α-Untereinheit der Polymerase III assoziiert.

Mögliche Auswirkungen der Mutationen auf die Mutationsrate wurden für die Stämme *E. coli* Eo100, *E. coli* Eo333 und *E. coli* Eo977 in einem Dominanztest in Kapitel 3.6 untersucht.

3.6 Expression von *dnaQ*-Allelen in *E. coli* MII und Bestimmung der Mutationsrate

Mögliche Auswirkungen der im vorherigen Kapitel identifizierten Mutationen auf die Mutationsrate wurden für die Stämme *E. coli* Eo100, *E. coli* Eo333 und *E. coli* Eo977 in einem Dominanztest (Identifizierung dominanter *dnaQ*-Mutatorallele) untersucht.

Die im Strukturgen von *dnaQ* gefundenen Mutationen (siehe Abbildung 3.27) wurden untersucht, indem die betreffenden Allele mit den jeweiligen Promotorregionen in pBR322 inseriert wurden. Die PCR-Fragmente wurden mittels der Primer dnaQ_-201_fw_PstI und dnaQ_+901_rv_ClaI erhalten. Die PCR ergab ein 1138 bp großes Fragment (siehe Abbildung 3.28), das sich nach Restriktion mit *Pst*I und *Cla*I in pBR322 einfügen lässt.

Abbildung 3.28: Schematische Darstellung des PCR-Fragments um *dnaQ* für die Klonierung in pBR322; gewellte Linie: Primerbindungsstellen

Das Gen für die β-Lactamase des Plasmids wurde durch den Restriktionsverdau vor der Klonierung zum Großteil entfernt. Das korrespondierende Protein wurde in Folge dessen nicht gebildet oder war zumindest nicht funktionsfähig. Die möglichen Transformanden konnten daher über eine Negativ-Selektion eingegrenzt werden. Die erfolgreiche Klonierung konnte durch Restriktion mit *BamH*I bestätigt werden, da durch das *dnaQ*-Allel eine zusätzliche *BamH*I-Schnittstelle eingeführt wurde. Das Ausgangsplasmid wird linearisiert, wohingegen bei Integration des *dnaQ*-Allels Fragmente der Größe 3621 bp und 1079 bp entstehen. Das 4,7 kb große, rekombinante Plasmid ist in Abbildung 3.29 schematisch dargestellt.

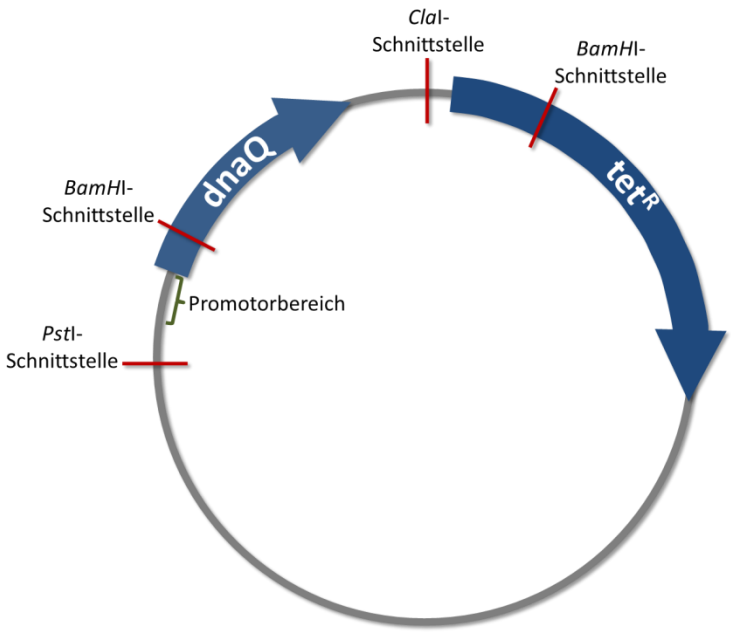
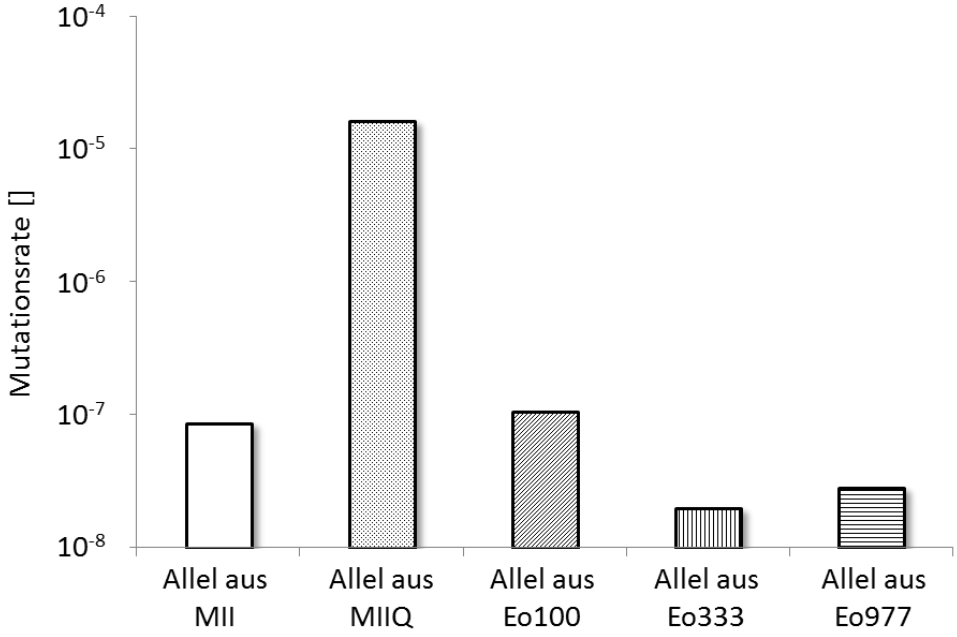


Abbildung 3.29: Plasmidkarte von pBR322 mit *dnaQ*-Allel mit Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Cla*I, *BamH*I und *Pst*I; tet^R: Tetracyclinresistenzgen; Erläuterungen im Text

Die *dnaQ*-Allele der *E. coli* Stämme MII, MIIQ, Eo100, Eo333 und Eo977 wurden einzeln amplifiziert und in pBR322 (Restriktion jeweils mit *Cla*I und *Pst*I) kloniert. Das *dnaQ*-Allel aus *E. coli* MII dient als Kontrolle für einen Stamm mit Mutationsrate auf Wildtyp-Niveau. *E. coli* MII wurde mit allen so konstruierten Plasmiden einzeln transformiert. Der gleiche Stammhintergrund für alle rekombinanten Plasmide erlaubt es, gefundene Änderungen der Mutationsrate nur auf die *dnaQ*-Mutationen zurückzuführen. Stammspezifische Einflüsse auf die Mutationsrate und Änderungen durch die erhöhte Kopienzahl des *dnaQ*-Allels konnten durch die Konzeption des Experiments vernachlässigt werden. Das *dnaQ*-Allel von *E. coli* MIIQ diente als Positivkontrolle für ein dominantes Mutatorallel.

Die Mutationsrate wurde mit 64 µg/mL Rifampicin bestimmt, der vierfachen MHK der verwendeten Stämme. Das Ergebnis der Doppelbestimmung der Mutationsrate von *E. coli* MII mit den pBR322-Derivaten ist in Abbildung 3.30 dargestellt.



***dnaQ*-Allel von**	**Mutationsrate**	
***E. coli* MII**	$8{,}6 \cdot 10^{-8}$	$\pm\ 5{,}2 \cdot 10^{-8}$
***E. coli* MIIQ**	$1{,}6 \cdot 10^{-5}$	$\pm\ 0{,}2 \cdot 10^{-5}$
***E. coli* Eo100**	$1{,}1 \cdot 10^{-7}$	$\pm\ 0{,}8 \cdot 10^{-7}$
***E. coli* Eo333**	$2{,}0 \cdot 10^{-8}$	$\pm\ 0{,}9 \cdot 10^{-8}$
***E. coli* Eo977**	$2{,}8 \cdot 10^{-8}$	$\pm\ 0{,}9 \cdot 10^{-8}$

Abbildung 3.30: Mutationsrate mit Standardabweichung (RIF^F-Assay, 4-fache MHK) von *E. coli* MII mit plasmidcodierten, mutierten *dnaQ*-Allelen aus verschiedenen *E. coli* Stämmen

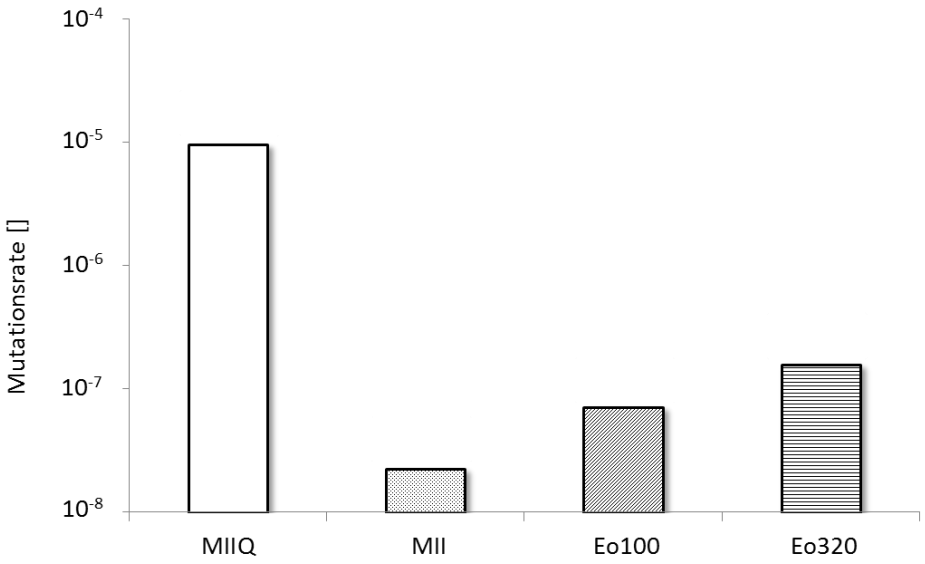
Abbildung 3.30 zeigt, dass *E. coli* MII mit dem Allel aus *E. coli* MIIQ eine Mutationsrate aufweist, die auf Mutatorniveau liegt. Die Dominanz des Mutatorallels von *E. coli* MIIQ bei Vorliegen des Wildtyp-Allels konnte in diesem Versuch bestätigt werden.

E. coli MII besitzt ein funktionsfähiges Wildtyp-Allel von *dnaQ*, wodurch in diesem Versuch nur dominante Mutator-Allele vom Wildtyp unterschieden werden können. Die Verwendung eines Stammes ohne *dnaQ* war nicht möglich, da der Knockout konditional lethal ist. Die Konstruktion eines *dnaQ*-Knockouts durch ortsspezifische Mutagenese (Vorgehen vergleichbar mit Kapitel 3.2.3) gelang deshalb nicht. Kompensationsmutationen zum Beispiel in *dnaE* sind Voraussetzung dafür, dass diese Mutanten lebensfähig sind (vergleiche Kapitel 3.3.7).

Ein dominantes Mutatorallel liegt in den überprüften klinischen Isolaten nicht vor. Die Größenordnung der Mutationsrate bei den klinischen Isolaten selbst wird im nachfolgenden Kapitel untersucht. Dadurch sollten auffällig hohe Mutationsraten identifiziert werden.

3.6.1 Mutationsraten von klinischen Isolaten mit dnaQ-Mutationen

Die vorangegangene Bestimmung der Mutationsrate von *E. coli* MII in Anwesenheit veränderter *dnaQ*-Allele zeigte kein dominantes Mutatorallel an. Das Vorliegen eines rezessiven Allels konnte durch die Bestimmung der Mutationsraten einiger Stämme ohne Plasmid untersucht werden. Die Mutationsraten von *E. coli* Eo100 und *E. coli* Eo320 wurde daher in einem Rifampicin-Forwardassay bei vierfacher MHK untersucht (DnaQ-Mutationen der Stämme siehe Abbildung 3.27). Ein Ausgangsstamm für klinische Isolate ist normalerweise nicht bekannt, weshalb Änderungen der Mutationsrate nicht ausschließlich auf die Strukturgenmutationen in *dnaQ* zurückgeführt werden können. Das Experiment erlaubt nur Aussagen über die Größenordnung der ermittelten Mutationsraten. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit vorherigen Versuchen wurde durch die Bestimmung der Mutationsraten von *E. coli* MII und *E. coli* MIIQ überprüft. Die Ergebnisse der Doppelbestimmung sind in Abbildung 3.31 dargestellt.



Stamm	Mutationsrate	
***E. coli* MIIQ**	$9{,}59 \cdot 10^{-6}$	$\pm\ 1{,}1 \cdot 10^{-8}$
***E. coli* MII**	$2{,}25 \cdot 10^{-8}$	$\pm\ 8{,}9 \cdot 10^{-9}$
***E. coli* Eo100**	$7{,}04 \cdot 10^{-8}$	$\pm\ 2{,}8 \cdot 10^{-8}$
***E. coli* Eo320**	$1{,}55 \cdot 10^{-7}$	$\pm\ 9{,}0 \cdot 10^{-8}$

Abbildung 3.31: Mutationsraten mit Standardabweichung (RIF^F-Assay, 4-fache MHK) der klinischen Isolate von R. Hope und Vergleichsstämme

Die Werte der Mutationsraten von *E. coli* MII und *E. coli* MIIQ liegen in dem in vorangegangenen Versuchen bestimmten Bereich (vergleiche unter anderem Kapitel 3.6). Die ermittelte Mutationsrate von *E. coli* Eo100 ist circa dreimal so hoch wie die von *E. coli* MII. Die Mutationsrate von *E. coli* Eo320 ist in diesem Vergleich um nahezu eine Zehnerpotenz erhöht. In der Literatur [167] wird berichtet, dass auch mäßige Erhöhungen der Mutationsrate einen deutlichen Effekt auf die Akkumulation von Resistenzmutationen ausüben können.

Die in Kapitel 3.5 detektierten Strukturgenmutationen in *dnaQ* sind somit hinsichtlich ihres Einflusses auf die Mutationsrate untersucht. Ein starker Mutatorphänotyp konnte in dem Stammkollektiv nicht nachgewiesen werden. Mögliche Auswirkungen der bei der Sequenzierung ebenfalls detektierten Mutation stromaufwärts von *dnaQ* sollten im nächsten Schritt unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden.

3.7 Bestimmung der *dnaQ*-Genexpression in Anwesenheit plasmidcodierter *dnaQ*-Allele

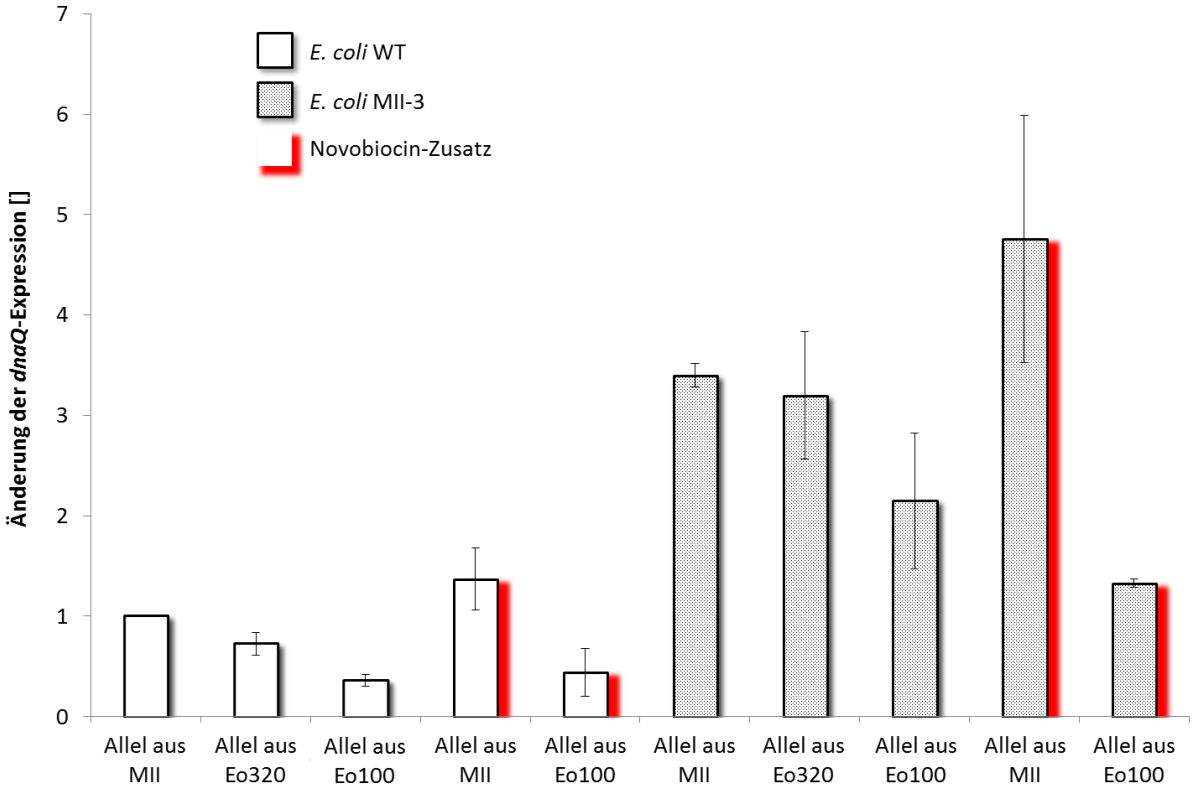
Die Ergebnisse der Sequenzierung des *dnaQ*-Gens aus verschiedenen klinischen Isolaten (Kapitel 3.5) ergaben, dass in drei Stämmen eine Punktmutation an Position -23 stromaufwärts zum Genstart von *dnaQ* (ATG) vorliegt. Der Einfluss dieser Mutation auf die *dnaQ*-Expression wurde unter Verwendung einiger in Kapitel 3.6 aufgeführten Plasmide mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht (siehe Kapitel 2.2.17). Durch die Verwendung desselben Plasmidkollektivs für die quantitative Bestimmung der Genexpression soll der Einfluss unbekannter stammspezifischer Faktoren auf die Ergebnisse ausgeschlossen werden und dadurch die Vergleichbarkeit sichergestellt werden.

Die Plasmide aus Kapitel 3.6 enthalten *dnaQ*-Allele von klinischen Isolaten von *E. coli* inklusive der jeweiligen regulatorischen Bereiche stromaufwärts des Gens. Die Allele von *E. coli* Eo320 und *E. coli* Eo100 weisen die Mutation an Position -23 auf. Das *dnaQ*-Allel von *E. coli* Eo100 weist zusätzlich einen Mutation in Codon 136 auf (vergleiche Abbildung 3.27). Das *dnaQ*-Allel von *E. coli* MII diente als Referenz für ein Wildtypallel.

Die Stämme *E. coli* WT und *E. coli* MII-3 wurden jeweils mit diesen drei Plasmiden transformiert. Die RNA dieser Transformanden wurde anschließend isoliert und die qRT-PCR danach mit daraus hergestellten Templates durchgeführt. Der Einfluss der *dnaQ*-Mutationen in Stammhintergründen mit unterschiedlicher DNA-Spiralisierung konnte dadurch bestimmt werden. *E. coli* WT diente als Referenzstamm mit normalem Spiralisierungsgrad und *E. coli* MII-3 als Teststamm mit deutlich erniedrigter, negativer Superspiralisierung (siehe Abbildung 3.34) [100], hervorgerufen durch zwei Mutationen in *gyrA* in den Codons 83 und 87. Es wurde somit zusätzlich überprüft, ob sich der Stammhintergrund (mit unterschiedlichem Spiralisierungsgrad) auf die *dnaQ*-Expression auswirkt.

Die zusätzliche Bestimmung der *dnaQ*-Expression unter Zusatz einer subinhibitorischen Novobiocinkonzentration (32 µg/mL) gibt darüber Aufschluss, wie sich eine Aktivierung von P2dnaQ [140] auf die Expression in beiden Stämmen auswirkt. Novobiocin inhibiert die Funktion der GyrB-Untereinheit [168] und erniedrigt dadurch die negative Superspiralisierung der DNA. Die Ergebnisse der Doppelbestimmung sind in Abbildung 3.32 aufgeführt. Die ermittelten Expressionswerte wurden auf *E. coli* WT mit dem *dnaQ*-Allel aus

E. coli MII bezogen. Somit wurden nur die Unterschiede der *dnaQ*-Expression bedingt durch die *dnaQ*-Allele auf den Plasmiden erfasst. Chromosomale *dnaQ*-Transkripte wurden zwar miterfasst, doch verändern diese die gemessenen Unterschiede nicht, da in allen Stämmen chromosomale *dnaQ*-Wildtypallele zusätzlich zu den Plasmiden vorliegen. Die angewandten Normierungs- und Validierungsmethoden wurden in Kapitel 2.2.17 beschrieben und werden in Kapitel 4.9 diskutiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.



Stamm	*dnaQ*-Allel aus	Novobiocinzusatz	Rel. *dnaQ*-Expression
WT	MII	-	1
WT	Eo320	-	0,73
WT	Eo100	-	0,36
WT	MII	+	1,37
WT	Eo100	+	0,44
MII-3	MII	-	3,40
MII-3	Eo320	-	3,20
MII-3	Eo100	-	2,15
MII-3	MII	+	4,75
MII-3	Eo100	+	1,33

Abbildung 3.32: *dnaQ*-Expressionsänderung durch verschiedene Allele und bei Novobiocinzusatz; Bezugsgröße: *E. coli* WT mit *dnaQ*-Allel aus *E. coli* MII; Erläuterungen im Text

Abbildung 3.32 zeigt, dass die Expression von *dnaQ* in Gegenwart des Allels von *E. coli* Eo100 um durchschnittlich 57% niedriger ist als in Gegenwart des Allels von *E. coli* MII. Das Allel von *E. coli* Eo320 erniedrigt die Expression in diesem Vergleich um 16%. Änderungen der Expression, die geringer sind als Faktor zwei, sind durch die methodenbedingten Schwankungen der Ergebnisse nicht aussagekräftig. Ein Effekt der verringerten *dnaQ*-Expression auf die Mutationsrate konnte in dem in Kapitel 3.6 beschriebenen System nicht nachgewiesen werden.

Der Zusatz von 32 µg/mL Novobiocin während des Wachstums erhöht die *dnaQ*-Expression durchschnittlich um 15%.

Abbildung 3.32 zeigt darüber hinaus, dass *dnaQ* unabhängig von dem plasmidcodierten Allel in *E. coli* MII-3 circa dreifach vermehrt exprimiert wird, verglichen mit *E. coli* WT.

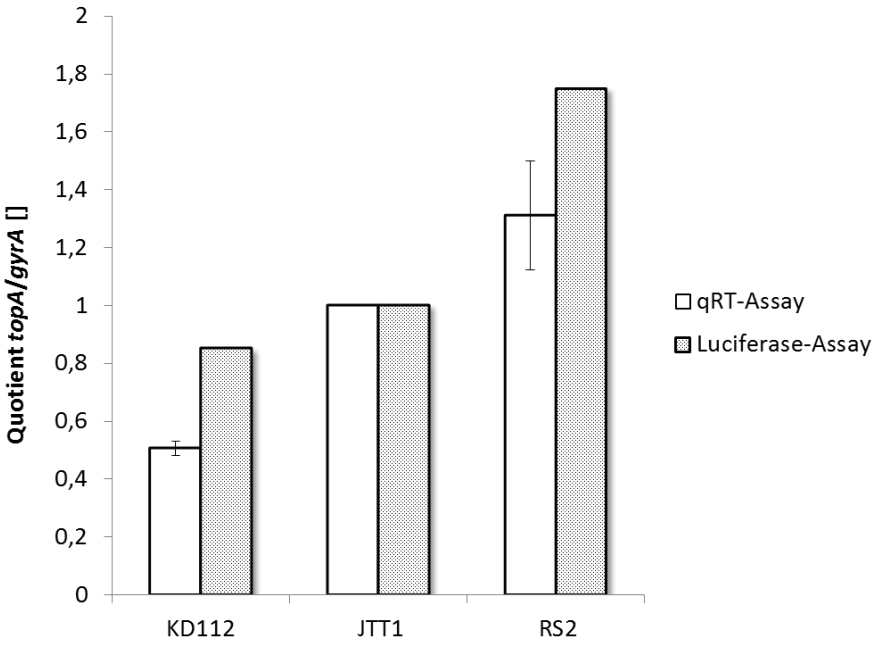
Die Ergebnisse aus diesem Versuch zeigen, dass die *dnaQ*-Expression unter den verschiedenen Bedingungen (Superspiralisierung, Antibiotikazusatz) veränderlich ist. Aus der Bestimmung der Genexpression ging beispielsweise hervor, dass die *dnaQ*-Expression bei verändertem Superspiralisierungsgrad in *E. coli* MII-3 erhöht war. Dieser Stamm stellt eine theoretische Zwischenstufe zwischen *E. coli* MII und *E. coli* MIII dar (vergleiche Kapitel 1.5). Um weiter zu prüfen, ob der Superspiralisierungsgrad einen Einfluss auf die *dnaQ*-Expression besitzt und damit gegebenenfalls eine Doppelmutation in einem Selektionsschritt ermöglicht (*E. coli* MII zu *E. coli* MIII), wurden sowohl der relative Superspiralisierungsgrad als auch die *dnaQ*-Expression während verschiedener Wachstumsphasen bestimmt.

3.8 Bestimmung des relativen DNA-Spiralisierungsgrades

Der relative DNA-Spiralisierungsgrad (Qsc-Grad) wurde durch den Quotienten der Expression von *topA* und *gyrA* bestimmt (siehe Kapitel 2.2.17). Das Gen *topA* codiert für die Topoisomerase I; das Gen *gyrA* codiert für eine Untereinheit der Topoisomerase II. Die Topoisomerase II (Gyrase) ist das einzige Enzym in *E. coli*, das negative Superspiralisierung in die DNA einführen kann und positiv spiralisierte DNA relaxieren kann (vergleiche Kapitel 1.3). Die Topoisomerase I stellt den funktional bedeutendsten Gegenspieler der Gyrase dar [169, 170]. Der Quotient aus der Expression von *topA* und *gyrA* eines Teststammes wurde auf den Quotienten eines Referenzstammes bezogen, ähnlich einem System, das von ABUMRAHEIL *et al* etabliert wurde [171]. Unterschiedliche Verhältnisse beider Quotienten erlauben

Aussagen über die relative Superspiralisierung der beiden Stämme im Vergleich. Ein Reportergen-Assay bestehend aus einer Fusion jeweils eines Promotors der beiden Gene und dem Luciferase-Gen wurde bereits plasmidgestützt etabliert (siehe auch Kapitel 4.8) [171]. Der hier verwendete quantitative Real-Time-PCR Assay wurde mit denselben Stämmen validiert wie der Luciferase-Assay. Damit wurde geprüft, ob die durch quantitativen Vergleich der mRNA-Mengen der beiden Gene erhaltenen Daten mit den durch Reportergenexpression auf Ebene der Translation erhaltenen Daten vergleichbar sind. Generell muss beachtet werden, dass die Messung des globalen Spiralisierungsgrads in dieser Arbeit nicht unbedingt die lokalen Verhältnisse [172] widerspiegelt.

E. coli JTT1 diente als Referenzstamm mit bekanntermaßen normalem Superspiralisierungsgrad und als Teststämme (mit vermindertem, beziehungsweise erhöhtem negativen Superspiralisierungsgrad) dessen Derivate *E. coli* KD112 und *E. coli* RS2. *E. coli* KD112 zeigt auf Grund einer *gyrB*-Mutation im Codon für Aminosäure 226 einen verminderten negativen Superspiralisierungsgrad. Dadurch ist ein in Bezug zum Qsc-Wert von *E. coli* JTT1 niedrigerer Qsc-Wert zu erwarten. *E. coli* RS2 weist einen erhöhten negativen Superspiralisierungsgrad auf, zurückzuführen auf die Mutation topA10 (vollständige Genotypen siehe Tabelle 2.1). Der Qsc-Wert dieses Stammes sollte erwartungsgemäß höher sein als der von *E. coli* JTT1. Die Auswirkungen der Topoisomerase-Mutationen der beiden Stämme auf die Superspiralisierung wurden unter anderem durch das Laufverhalten auf chloroquinhaltigen Gelen bestätigt [171]. Abbildung 3.33 zeigt den Vergleich der Ergebnisse des Reportergen-Assays [171] mit dem qRT-Assay, jeweils bezogen auf die Quotienten für *E. coli* JTT1. Die Werte des qRT-Assays sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen.



	KD112	JTT1	RS2
qRT-Assay	0,51	1	1,31
Luciferase-Assay	0,85	1	1,75

Abbildung 3.33: Vergleich der Ergebnisse (Qsc) der verschiedenen Systeme zur Bestimmung des Qsc-Grads bei den *E. coli* Stämmen JTT1, KD112 und RS2

Der Quotient der Expression von *topA* und *gyrA* sinkt in beiden Assays mit verminderter negativer Superspiralisierung und steigt mit erhöhter negativer Superspiralisierung. Abbildung 3.33 zeigt, dass der qRT-Assay verminderte negative Superspiralisierung deutlicher indiziert als der Reportergen-Assay. Erhöhte negative Superspiralisierung wird in dem Luciferase-Assay deutlicher angezeigt. Die Bildung des Quotienten von Expressionswerten aus demselben RNA-Template macht die Verwendung eines Referenzgens überflüssig (vergleiche Kapitel 4.9).

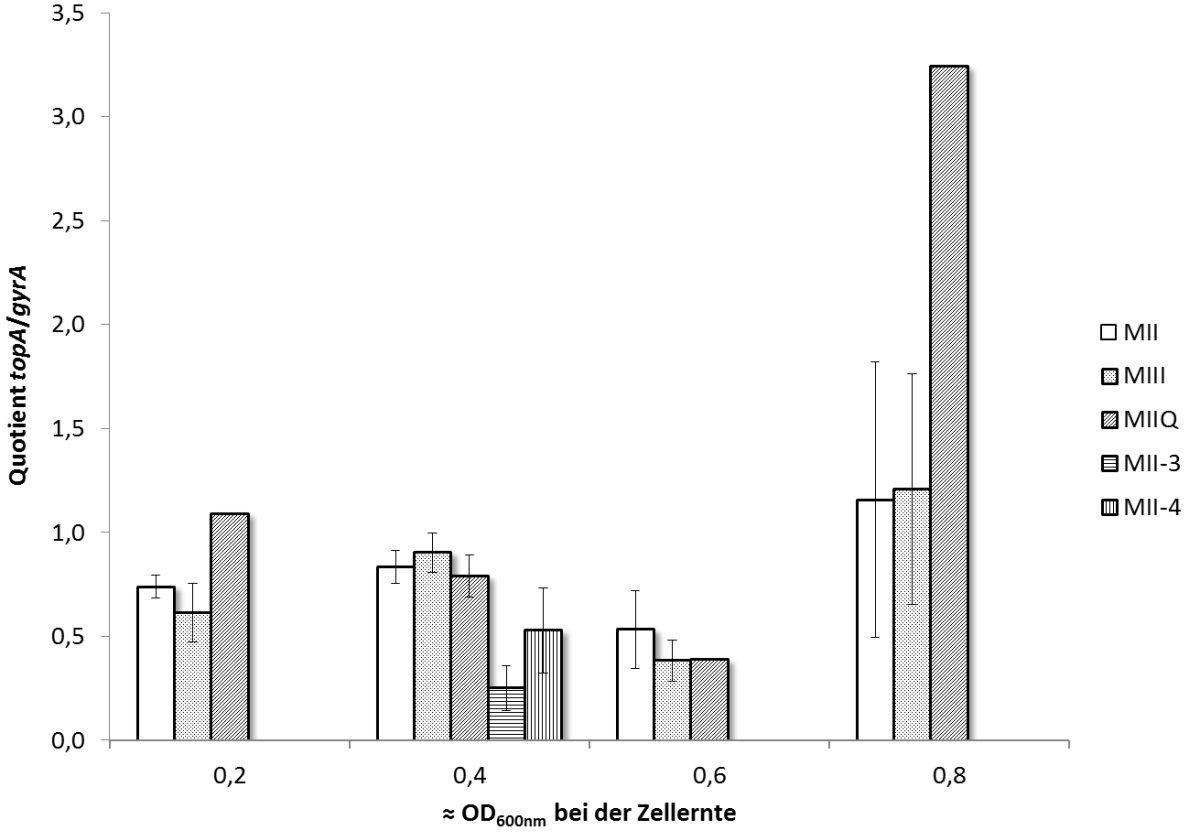
Nachfolgende Bestimmungen der *dnaQ*-Expression können bei Verwendung des qRT-Assays ausgehend vom selben RNA-Template erfolgen. Dieser Assay wurde daher für weitere Experimente benutzt, um eine bessere Korrelation der Ergebnisse zu gewährleisten.

Der Einfluss verschiedener Fluorchinolon-Resistenzmutationen auf den Qsc-Grad wurde in einem klinischen Stamm (*E. coli* WT) und daraus hervorgegangenen Mutanten (siehe Tabelle 3.9 und Tabelle 2.1) untersucht.

Tabelle 3.9: Stammkollektiv (*E. coli*) für die Bestimmung des Qsc-Grades mit bekannten Fluorchinolonresistenzmutationen und MHK-Wert für Ciprofloxacin

Stamm	GyrA	ParC	*ΔmarR*	MHK Cip (µg/mL)
WT	-	-	-	0,015
MII	S83L	-	175 bp	2
MII-3	S83L / D87G	-	175 bp	16
MII-4	S83L	S80I	175 bp	8
MIIQ	S83L	-	175 bp	2
MIII	S83L / D87G	S80I	74 bp	64

Der Qsc-Wert wurde für bis zu vier Zeitpunkte während des Wachstums bestimmt, um Aussagen über den zeitlichen Verlauf zu erhalten. Die Ernte der Zellen (siehe Kapitel 2.2.15) für die RNA-Isolierung erfolgte dazu für jede Probe bei einer OD_{600nm} (optische Dichte bei 600 nm) von 0,2 bis 0,8 in Schritten von 0,2. Die Ergebnisse der Doppelbestimmungen sind in Abbildung 3.34, jeweils bezogen auf den Wert von *E. coli* WT, aufgeführt. Der Qsc-Grad von *E. coli* MIIQ wurde nur bei der OD_{600nm} von 0,4 doppelt bestimmt.



Stamm	OD ≈ 0,2	OD ≈ 0,4	OD ≈ 0,6	OD ≈ 0,8
MII	0,74	0,84	0,53	1,16
MIII	0,61	0,9	0,38	1,21
MIIQ	1,09	0,79	0,39	3,24
MII-3	-	0,25	-	-
MII-4	-	0,53	-	-

Abbildung 3.34: Qsc-Wert verschiedener *E. coli* Stämme bezogen auf den Wert von *E. coli* WT nach Zellernte bei verschiedenen OD_{600nm}

Das Gen *gyrA* von *E. coli* MII weist im Gegensatz zum Wildtyp *E. coli* WT eine Mutation in Codon für Aminosäure 83 auf (Aminosäureaustausch S83L). Der Qsc-Wert ist durch die Gyrase-Inhibierung bei $OD_{600nm} \approx 0{,}2$ um 24% reduziert und erreicht bei $OD_{600nm} \approx 0{,}6$ ein Minimum von nur 53% des Wertes von *E. coli* WT.

Der ermittelte Wert von *E. coli* MIII ist bei $OD_{600nm} \approx 0{,}6$ um nahezu zwei Drittel reduziert, verglichen mit dem Wert von *E. coli* WT. Mutante *E. coli* MIII unterscheidet sich von *E. coli* MII durch eine zusätzliche Mutation jeweils in *gyrA* (im Codon für Aminosäure 87, D87G) und *parC* (im Codon für Aminosäure 80, S80I). Der Effekt der *gyrA*-Mutation ist nach diesen Ergebnissen größer als der sich antagonistisch auswirkende Effekt der *parC*-Mutation, da der Qsc-Wert im Vergleich um weitere 15% sinkt (Diskussion siehe Kapitel 4.8).

E. coli MII-3 zeigte den niedrigsten Qsc-Wert in diesem Experiment. Die Kombination von zwei *gyrA*-Mutationen (in den Codons für Aminosäuren 83 (S83L) und 87 (D87G)) ohne *parC*-Mutation erniedrigt den Qsc-Grad bei der $OD_{600nm} \approx 0{,}4$ auf ein Viertel des Werts von *E. coli* WT.

Der Quotient von *E. coli* MII-4, der je eine Mutation in *gyrA* (im Codon für Aminosäure 83, S83L) und eine in *parC* (im Codon für Aminosäure 80, S80I) aufweist, beträgt 53% des Wertes von *E. coli* WT bei der $OD_{600nm} \approx 0{,}4$.

Der Qsc-Wert ist nach Abbildung 3.34 in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm} \approx 0{,}4$ bis $OD_{600nm} \approx 0{,}6$) am niedrigsten. Die Quotienten sind bei der $OD_{600nm} \approx 0{,}8$ am höchsten. Dies könnte in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der stationären Phase begründet sein (siehe auch Kapitel 4.9) [173]. Der Wert von *E. coli* MIIQ bei der $OD_{600nm} \approx 0{,}8$ ist von begrenzter Aussagekraft, da es sich um eine Einzelbestimmung handelt.

Die ermittelten Qsc-Werte der Stämme wurden im Anschluss mit der *dnaQ*-Expression verglichen, um eine eventuelle Korrelation sichtbar zu machen. Dazu wurde zunächst die *dnaQ*-Expression im selben Stammkollektiv bestimmt.

3.9 Quantitative Bestimmung der *dnaQ*-Expression

Die Expression von *dnaQ* wurde zunächst in den Stämmen *E. coli* JTT1, *E. coli* KD112 und *E. coli* RS2 mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) bestimmt. Die Stämme wurden zur Validierung des qRT-Assays für die Bestimmung des Qsc-Werts in Kapitel 3.8 benutzt und weisen Unterschiede im DNA-Spiralisierungsgrad auf. Die Ergebnisse der Doppelbestimmung sind in Abbildung 3.35 bezogen auf die *dnaQ*-Expression von *E. coli* JTT1 dargestellt. Die angewandten Normierungs- und Validierungsmethoden wurden in Kapitel 2.2.17 beschrieben und werden in Kapitel 4.9 diskutiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

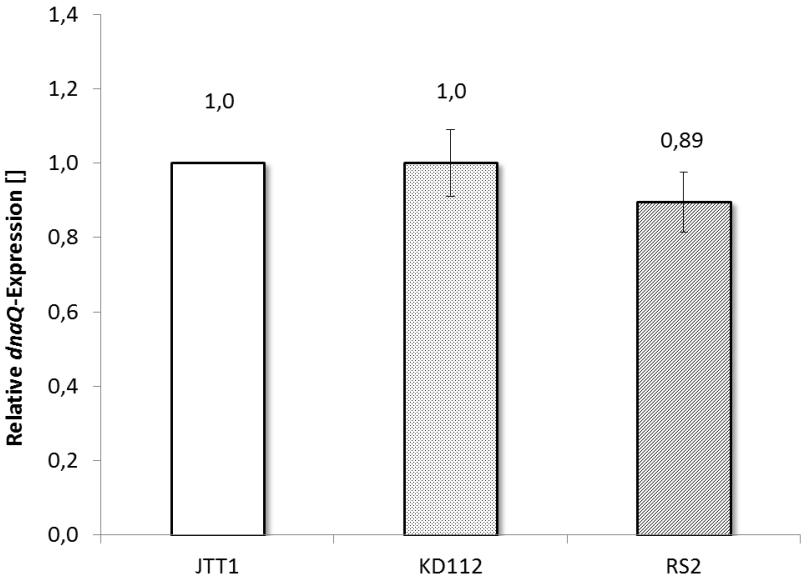
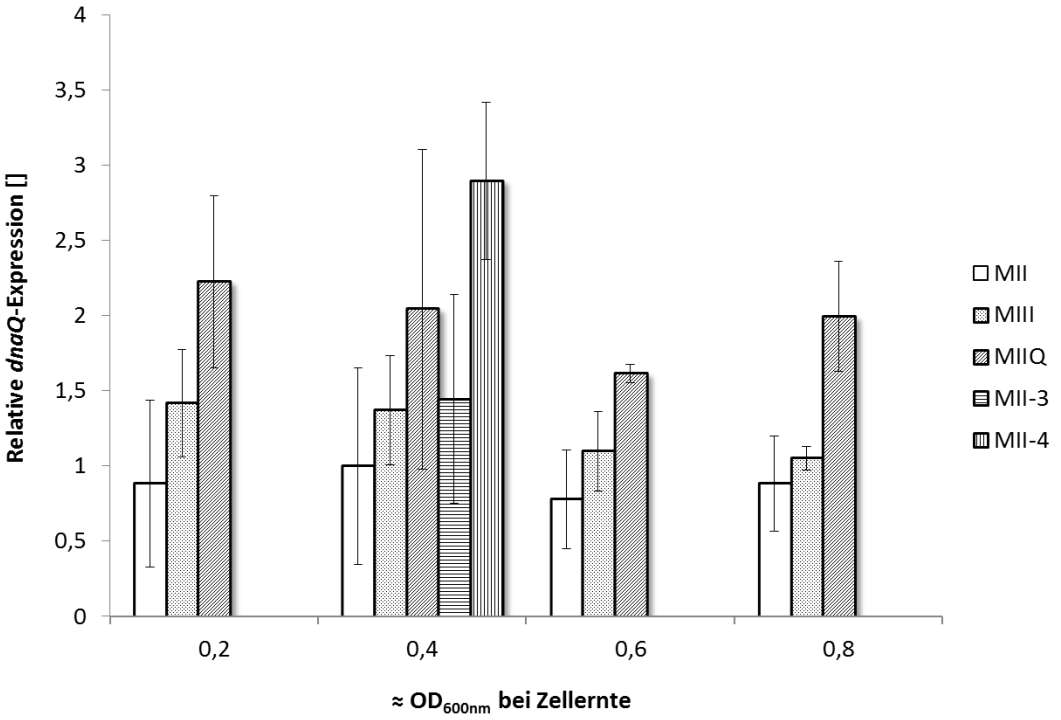


Abbildung 3.35: *dnaQ*-Expression in *E. coli* Stämmen mit veränderter DNA-Superspiralisierung (JTT1, KD112 und RS2)

Die Expression von *dnaQ* ist in den Teststämmen *E. coli* KD112 und *E. coli* RS2 im Vergleich mit *E. coli* JTT1 nicht signifikant verändert. Ein Einfluss der den Spiralisierungsgrad verändernden Mutationen der Stämme auf die *dnaQ*-Expression konnte in Abbildung 3.35 nicht festgestellt werden (Diskussion siehe Kapitel 4.9).

Die Bestimmung der *dnaQ*-Expression für die in Kapitel 3.8 verwendeten Mutanten wurde durchgeführt, um die Auswirkungen der bekannten Topoisomerase-Mutationen (vergleiche Tabelle 3.9) auf die *dnaQ*-Expression zu untersuchen. Für die Bestimmung des Qsc-Werts wurde die Expression ausgehend von denselben RNA-Templates bestimmt. Die Zellernte zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten während des Wachstums sollte Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Expressionsänderungen ermöglichen. Die Mittelwerte der Ergebnisse aus den Expressionsmessungen sind in Abbildung 3.36 dargestellt. Die *dnaQ*-Expression von *E. coli* WT diente jeweils als Referenzwert.



Stamm	OD ≈ 0,2	OD ≈ 0,4	OD ≈ 0,6	OD ≈ 0,8
MII	0,88	1,00	0,78	0,88
MIII	1,42	1,37	1,10	1,05
MIIQ	2,22	2,76	1,61	1,99
MII-3	-	1,44	-	-
MII-4	-	2,90	-	-

Abbildung 3.36: *dnaQ*-Expression verschiedener *E. coli* Stämme bezogen auf den Wert von *E. coli* WT nach Zellernte bei verschiedenen OD_{600nm}

Statistisch signifikante Änderungen wurden bei der OD_{600nm} ≈ 0,4 für *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII-4 festgestellt. Die Expression von *dnaQ* in *E. coli* MIIQ ist zu allen Messpunkten circa doppelt so hoch wie im Bezugsstamm *E. coli* WT. Die Erhöhung der *dnaQ*-Expression in *E. coli* MIII ist statistisch nicht signifikant, ebenso wenig wie die Reduktion der Expression in *E. coli* MII. Von statistischer Signifikanz wird hier ausgegangen, wenn der Wertebereich der doppelten Standardabweichung eines Teststamms nicht den Wert des Referenzstamm *E. coli* WT beinhaltet. Die hohe Standardabweichung der Mittelwerte reduziert die Aussagekraft der Ergebnisse, wodurch nur Tendenzen erkannt werden können. Die möglichen Ursachen der hohen Standardabweichungen werden in Kapitel 4.9 diskutiert (vergleiche auch Kapitel 2.2.17). Anderen Autoren sind bereits in der Vergangenheit starke Schwankungen bei der Bestimmung der Expression von *dnaQ* aufgefallen [174]. Diese gehen davon aus, dass die unterschiedliche Induzierbarkeit und Expression vor Allem abhängig vom Grad oder Anteil der SOS-Aktivierung ist.

Die Gegenüberstellung der ermittelten Werte der *dnaQ*-Expression mit den in Kapitel 3.8 ermittelten Qsc-Werten soll einen möglichen Zusammenhang der beiden Werte aufdecken. Abbildung 3.37 bis Abbildung 3.39 zeigen den zeitlichen Verlauf des Qsc-Werts mit der gegenübergestellten *dnaQ*-Expression für die einzelnen Stämme. Abbildung 3.40 zeigt die Gegenüberstellung aller Messwerte in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase bei der $OD_{600nm} \approx 0{,}4$.

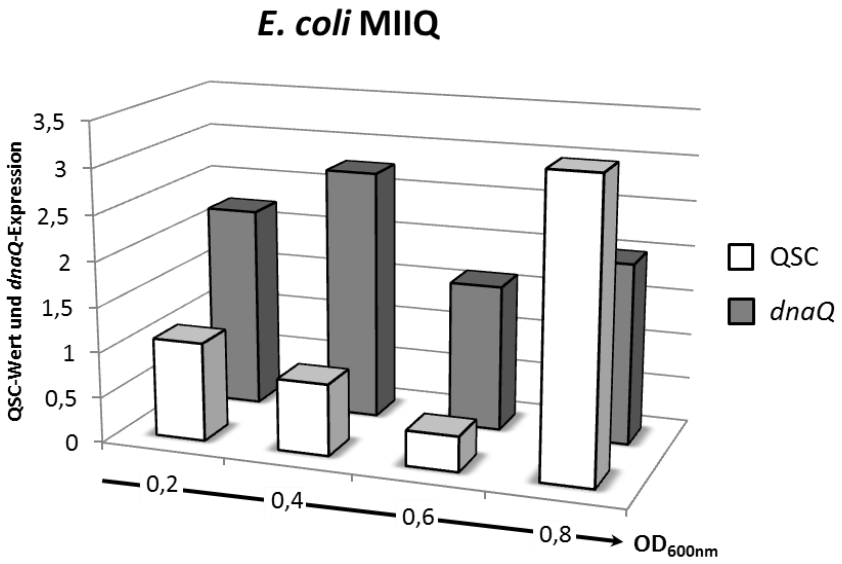


Abbildung 3.37: Gegenüberstellung des relativen Qsc-Grads und der *dnaQ*-Expression im Verlauf des Wachstums für *E. coli* MIIQ

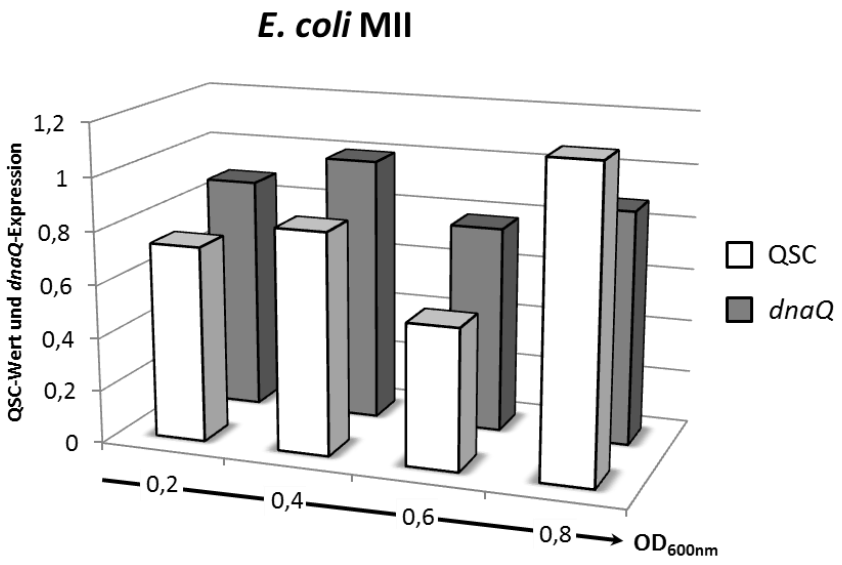


Abbildung 3.38: Gegenüberstellung des relativen Qsc-Grads und der *dnaQ*-Expression im Verlauf des Wachstums für *E. coli* MII

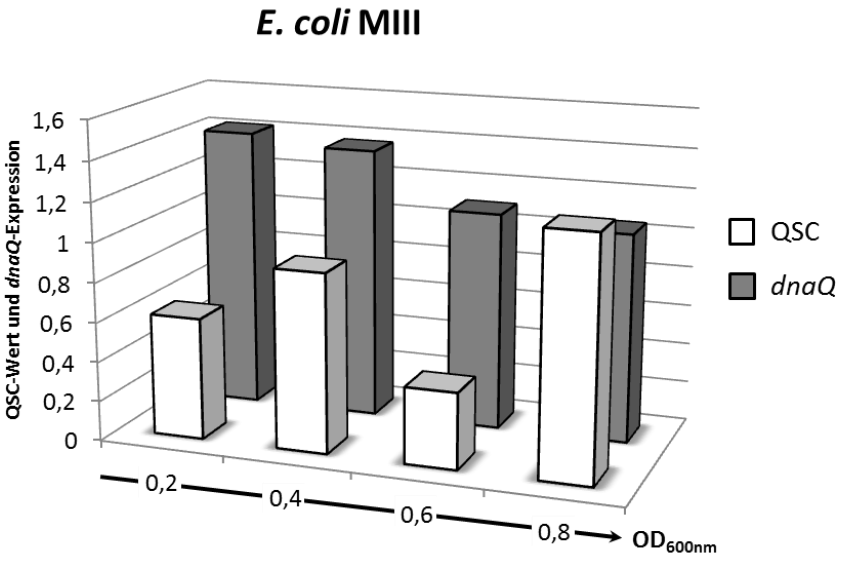


Abbildung 3.39: Gegenüberstellung des relativen Qsc-Grads und der *dnaQ*-Expression im Verlauf des Wachstums für *E. coli* MIII

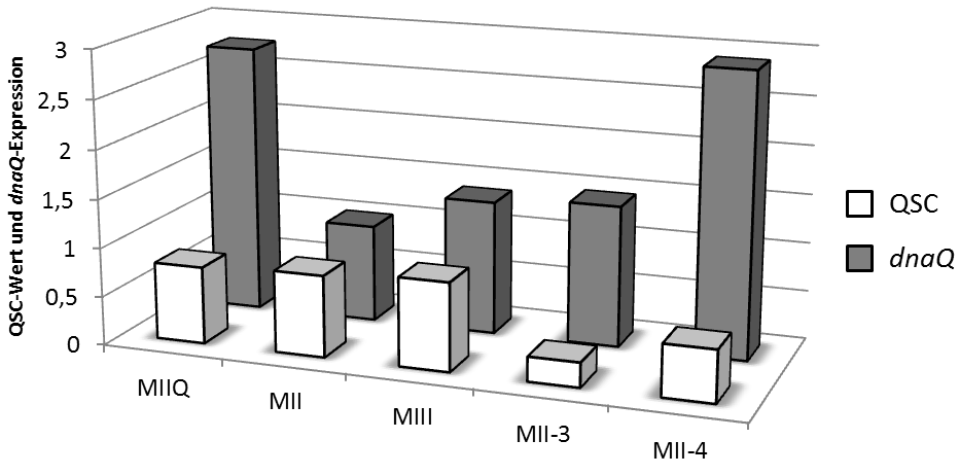


Abbildung 3.40: Gegenüberstellung des relativen Qsc-Grads und der *dnaQ*-Expression aller gemessenen *E. coli* Stämme in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600nm} ≈ 0,4)

Ein Zusammenhang zwischen der *dnaQ*-Expression und dem Qsc-Grad auf transkriptionaler Ebene kann aus Abbildung 3.37 bis Abbildung 3.40 nicht hergeleitet werden. Weder im zeitlichen Verlauf eines einzelnen Stammes, noch in der Gesamtbetrachtung aller Stämme zu einem Messzeitpunkt ist eine Korrelation beider Werte miteinander zu erkennen. Auswirkungen auf translationaler Ebene oder direkte Proteininteraktionen [140, 175, 176] sind möglich und werden in Kapitel 4.9 diskutiert. Möglich ist auch, dass durch die divergente Anordnung der regulatorischen Bereiche von *dnaQ* und *rnhA* eine indirekte Beeinflussung der gegenseitigen Expression stattfindet. So gibt es Hinweise, dass ein *dnaQ*-Transkript an den regulatorischen Bereich von *rnhA* binden kann und damit dessen Expression reduziert [174].

4. Diskussion

Das Ziel der Arbeit bestand darin, einen möglichen Einfluss von DnaQ auf die Entstehung von Fluorchinolonresistenz zu untersuchen. Durch Inkubation von *E. coli* (zum Beispiel *E. coli* WT) in Gegenwart von Fluorchinolonkonzentrationen oberhalb des MHK-Wertes können Mutanten mit Mutationen in definierten Bereichen der Zielstrukturen Gyrase beziehungsweise Topoisomerase IV selektiert werden [158] (siehe auch Kapitel 1.4). Der erste Schritt in der Entwicklung der Fluorchinolonresistenz besteht im Allgemeinen im Erwerb einer Punktmutation innerhalb von *gyrA*, häufig in Codon 83 (vergleiche *E. coli* MI) [155]. Nach einem zweiten Selektionsschritt wurde eine Mutante identifiziert, die durch einen erhöhten Efflux und eine verminderte Ausbildung von Porinen charakterisiert ist [155, 177]. Als eine Ursache hierfür wurde in *E. coli* MII eine Deletion (175 bp) im Gen *marR* identifiziert, dem Repressor des *marRAB*-Operons. Hochresistente klinische Isolate weisen häufig mindestens zwei zusätzliche Targetmutationen (vergleiche *E. coli* MIII, siehe Abbildung 4.1) auf [155]. Eine einzelne weitere *in vitro* eingeführte Mutation in *gyrA* führt zu starken Fitnesseinbußen bei gering erhöhter Resistenz [100]. Die Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen wird nur durch die Kombination von Mutationen in Genen für beide Zielstrukturen, in der Regel in *gyrA* und *parC*, deutlich verringert (vergleiche auch Kapitel 3.4 und 3.4.3).

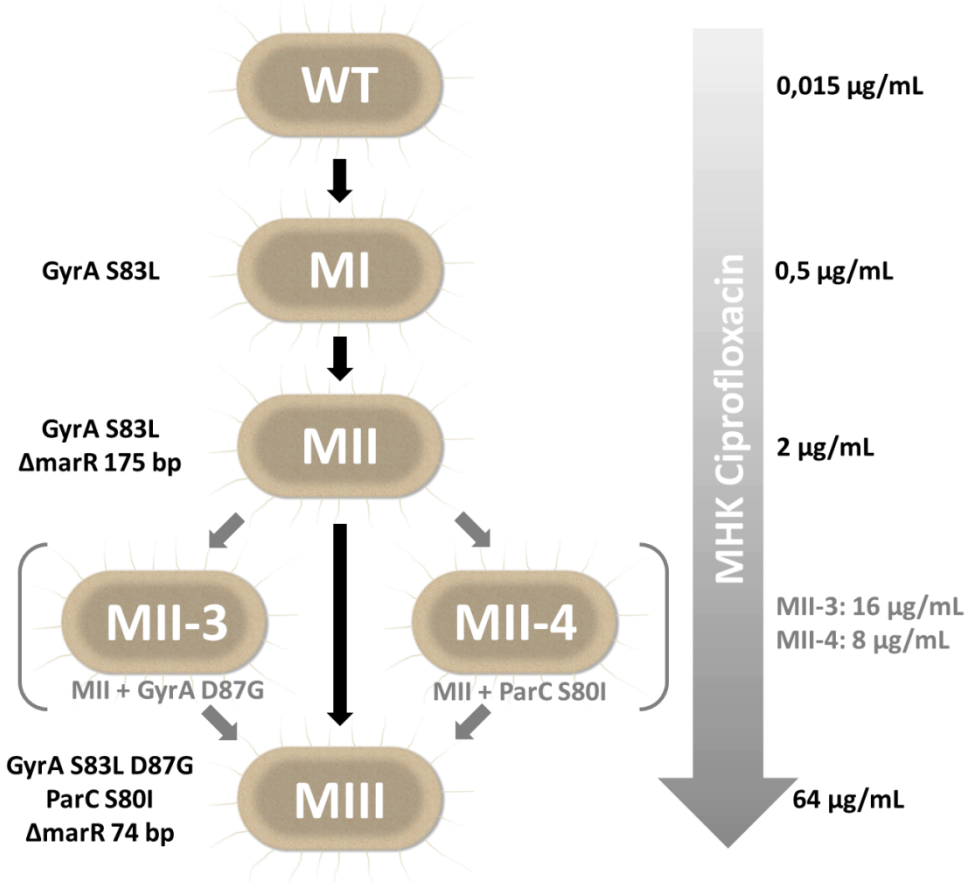


Abbildung 4.1: Beispiel für die Akkumulierung von Fluorchinolonresistenzmutationen durch Selektion ausgehend von *E. coli* WT; Darstellung der Resistenzmutationen und des MHK-Werts für Ciprofloxacin; Erläuterungen im Text

Die Wahrscheinlichkeit für das zufällige Auftreten einer Doppelmutation ist allerdings äußerst gering [154]. Das Auftreten solcher Mutationen kann möglicherweise durch eine vorübergehend erhöhte Mutationsrate des Bakteriums erklärt werden. Diese zentrale Hypothese wird ab Kapitel 4.5 im Detail diskutiert.

Einen wichtigen Beitrag zum Gleichgewicht zwischen genetischer Flexibilität und Stabilität leistet die Epsilon-Untereinheit der replikativen DNA-Polymerase III, DnaQ. Das Protein ist für die 3´-5´-Exonuklease-Aktivität des Holoenzyms verantwortlich [178, 179, 180, 181]. Durch das *proofreading* der neu synthetisierten DNA-Stränge wird die Genauigkeit der Replikation um mehr als den Faktor 100 erhöht [178]. Ist dieses Protein durch Punktmutationen in seiner Funktion beeinträchtigt, zeigt eine solche Mutante einen starken Mutatorphänotyp (vergleiche Kapitel 3.1). Hinweise darauf, dass die *dnaQ*-Genexpression in Abhängigkeit des globalen Superspiralisierungsgrad der DNA veränderlich ist [140], wurden durch die Ermittlung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von

Fluorchinolonresistenzmutationen, der *dnaQ*-Expression und dem globalen Superspiralisierungsgrad untersucht.

Zunächst wurde untersucht, ob ein Mutatorallel von *dnaQ* die Wahrscheinlichkeit erhöht, hochgradig fluorchinolonresistente *E. coli* zu selektieren. Ein durch zwei Punktmutationen verändertes *dnaQ*-Allel wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese chromosomal in *E. coli* MII eingebracht. Die nach Selektion dieses Stammes mit Ciprofloxacin erhaltenen Mutanten wurden anschließend phäno- und genotypisch charakterisiert.

Das *dnaQ*-Gen wurde des Weiteren in hochresistenten klinischen Isolaten sequenziert und die gefundenen Abweichungen von Referenzstämmen bezüglich der Genexpression und der Mutationsrate untersucht.

Die *dnaQ*-Expression wurde schließlich in verschiedenen *E. coli* Mutanten zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt und mit dem parallel bestimmten relativen Superspiralisierungsgrad verglichen.

4.1 Mutationsraten von Mutatorstämmen

Mutationen können prinzipiell entweder vorteilhaft, neutral oder nachteilig für das Bakterium sein. Die Häufigkeit von nachteiligen Mutationen liegt dabei deutlich höher als die von Mutationen mit einem positiven Effekt [154]. Die genetische Flexibilität ist dennoch äußerst wichtig für die Anpassung und Evolution der Bakterien. Stämme mit hohen Mutationsraten treten vor Allem dann gehäuft auf, wenn eine Adaption an veränderte äußere Gegebenheiten erforderlich ist [182, 183, 184]. Isolate von *Pseudomonas aeruginosa* von Patienten mit Mukoviszidose (zystischer Fibrose), Isolate von *Neisseria meningitidis* von Patienten mit Meningitis oder von Patienten mit Magen-Infektionen durch *Helicobacter plyori* zeigen zu einem hohen Anteil Mutatoreigenschaften [185, 186, 187, 188]. Selektionsdruck durch Antibiotika begünstigt ebenfalls Stämme, die sich durch ihre erhöhte Mutationsrate schneller anpassen können [154]. Die negativen Auswirkungen auf die Fitness der Bakterien [188], die unerwünschte Mutationen mit sich bringen, stehen dem gegenüber und auch der Umstand, dass erworbene vorteilhafte Mutationen in einem anderen Umfeld nachteilig oder sogar lethal sein können [189]. Ein Gleichgewicht zwischen genetischer Flexibilität und Stabilität muss deshalb gewahrt bleiben.

Die Mutationsrate wird in *E. coli* durch drei verschiedene Mechanismen reguliert. Zum einen ist die Affinität für die zum Template komplementäre Base deutlich höher als für die nicht-komplementären Basen. Des Weiteren findet direkt nach dem Einbau der Basen bei der Replikation das *proofreading* statt und zuletzt werden etwaige Fehler noch post-transkriptional durch das *methyl-directed mismatch repair* System (MDMR) korrigiert [190, 191, 192]. Weitere Proteine sind noch an der Reparatur spezifischer DNA-Schäden beteiligt, wie zum Beispiel die DNA-Glykosylasen an der Basenexzisionsreparatur.

Ein Mutatorphänotyp kann sich beispielsweise ausbilden, wenn Proteine, die an den genannten DNA-Korrekturmechanismen beteiligt sind, durch Punktmutationen verändert sind [193]. Je nach dem betroffenen Gen, beziehungsweise davon codiertem Protein, ist die Mutationsrate unterschiedlich stark erhöht. Eine Auflistung der untersuchten Mutatorstämme mit dem jeweils veränderten Gen und der Funktion des korrespondierenden Proteins sind in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Tabelle 4.1: Mutatorstämme und Funktion des jeweils mutierten Mutatorgens

Stamm	Mutatorgen	Funktion
***E. coli* K12 CSH107**	-	-
***E. coli* K12 CSH114**	*mutT*	Hydrolyse von 8-oxo-Guanin
***E. coli* K12 CSH115**	*mutS*	Beteiligt am MDMR
***E. coli* K12 CSH116**	*dnaQ* (*mutD*)	Proofreading
***E. coli* K12 CSH117**	*mutY*	Glykosylase für Nukleotidexzionsreparatur

Die Bestimmung der Mutationsraten (Kapitel 3.1) zeigte insbesondere bei *E. coli* K12 CSH115 und *E. coli* K12 CSH116 stark erhöhte Werte. Diese lagen für beide Stämme im Bereich von mehr als zwei Zehnerpotenzen höher als für den Ausgangsstamm. Die Ursache dafür ist bei *E. coli* K12 CSH115 eine Mutation in *mutS*. Das Protein MutS ist Teil des MDMR (siehe Kapitel 1.2.2). MutHLS detektiert fehlerhaft eingebaute Basen im neu replizierten DNA-Strang. Die Unterscheidung zwischen neu-synthetisiertem Strang und Templatestrang erfolgt durch den unterschiedlichen Methylierungsgrad [191]. Der neu synthetisierte Strang ist direkt nach der Replikation seltener methyliert als der Templatestrang. Das Methylierungsmuster kann von dem durch die *mutS*-Mutation verändertem MutHLS-System nicht mehr erfasst werden und Synthesefehler können nicht mehr ausreichend durch Vergleich mit dem Templatestrang identifiziert und behoben werden. *E. coli* K12 CSH116 weist zwei Punktmutationen in *dnaQ*

auf (siehe auch Abbildung 3.27), die sowohl das katalytische Zentrum als auch die Bindung an die α-Untereinheit der Polymerase III beeinträchtigen [178]. Die Prozessivität ist demnach wahrscheinlich vermindert und auch die Bildung des Core-Enzyms des replikativen Komplexes ist gestört. Durch die Reduktion der *Proofreading*-Aktivität allein wird die Mutationsrate bereits um mehr als den Faktor 100 erhöht [192]. Die angehäuften Fehler überlasten in der Folge das MDMR-System, wodurch die Mutationsrate sogar bis zu 1.000-fach erhöht sein kann [189]. Die Mutationen in den Mutatorgenen der übrigen Stämmen, *E. coli* K12 CSH114 und *E. coli* K12 CSH117 zeigten einen geringeren Einfluss auf die Mutationsrate (11-fache beziehungsweise 38-fache Erhöhung). Das Ergebnis zeigt, dass diese Reparaturmechanismen unter den gewählten Bedingungen in diesem Stammhintergrund eine geringere Bedeutung haben. Die vergleichsweise geringe Erhöhung bedeutet, dass die spezifische Art von DNA-Schäden, die von diesen Korrekturenzymen behoben werden (siehe Tabelle 4.1), seltener vorliegen. Der Einfluss der verschiedenen Mechanismen auf die Genauigkeit der DNA-Replikation, beziehungsweise auf die Höhe der Mutationsrate, unterscheidet sich jedoch von Spezies zu Spezies zum Teil deutlich [194, 195, 196].

In Anwesenheit von subinhibitorischen Konzentrationen von Ciprofloxacin war zu erwarten, dass durch die partielle Inhibierung der Gyrase-Funktion zum einen der Spiralisierungsgrad der DNA verändert und zum anderen die SOS-Antwort aktiviert würden. FOSTER und SULLIVAN [197] berichteten, dass durch die Aktivierung der SOS-Antwort eine vermehrte Bildung von RecA auftritt, welches die Funktion von DnaQ beeinträchtigt und demnach die Mutationsrate erhöhen könnte. Die Aktivierung der SOS-Antwort verursacht zudem die vermehrte Bildung von anderen Polymerasen als der Polymerase III (zum Beispiel Polymerase V, siehe Kapitel 1.2.4). Dabei handelt es sich um Polymerasen, die zwar vermehrt fehlerhaft replizieren aber dafür eine höhere Toleranz gegenüber DNA-Schäden aufweisen [198]. Bei den in Kapitel 3.1 gewählten Bedingungen zeigte Ciprofloxacin in der gewählten Konzentration keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Mutationsrate. Die Konzentration an Ciprofloxacin war möglicherweise zu gering um einen detektierbaren Einfluss auf die SOS-Antwort und den Spiralisierungsgrad auszuüben. Die Verwendung anderer SOS-Induktoren könnte darüber hinaus Hinweise darauf liefern, ob die Mutationsrate in diesem Kollektiv generell nicht durch die SOS-Antwort erhöht werden kann. Der Einfluss der SOS-Antwort auf die *dnaQ*-Expression und damit eventuell auf die Mutationsrate wurde bereits durch QUIÑONES *et al* [199] untersucht. In dieser Studie wurde

kein induktiver Einfluss durch Nalidixinsäure festgestellt, wohl aber durch Methylmethansulfonat und Mitomycin B. Die Inkubation mit subinhibitorischen Konzentrationen an Cefotaxim, Polymyxin B und D-Cycloserin führten in anderen Experimenten [154] zu einer erhöhten Anzahl an Mutanten.

4.1.1 Zusatz von Glyoxal

Der Zusatz von Glyoxal erhöhte die Mutationsrate in *E. coli* K12 CSH107 um den Faktor 265. Glyoxal (Synonym Ethandial) ist der einfachste Dialdehyd (siehe Abbildung 4.2).

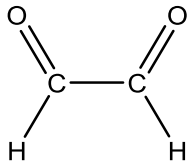


Abbildung 4.2: Chemische Strukturformel von Glyoxal

Glyoxal kann aufgrund der beiden Aldehydfunktionen DNA-Stränge kovalent miteinander verknüpfen und führt außerdem zur Bildung von Addukten und Deaminierungsprodukten [142]. Die Quervernetzung inhibiert den Replikationsprozess und erzeugt einen Mutatorphänotyp. Die Quervernetzung (siehe Abbildung 4.3) erfolgt durch Reaktion von Glyoxal mit Desoxyguanosin, wobei ein Addukt mit zwei freien Hydroxy-Gruppen entsteht. Diese Hydroxy-Gruppen sind an der Bildung einer kovalenten Bindung zu einem weiteren Nucleosid beteiligt [200].

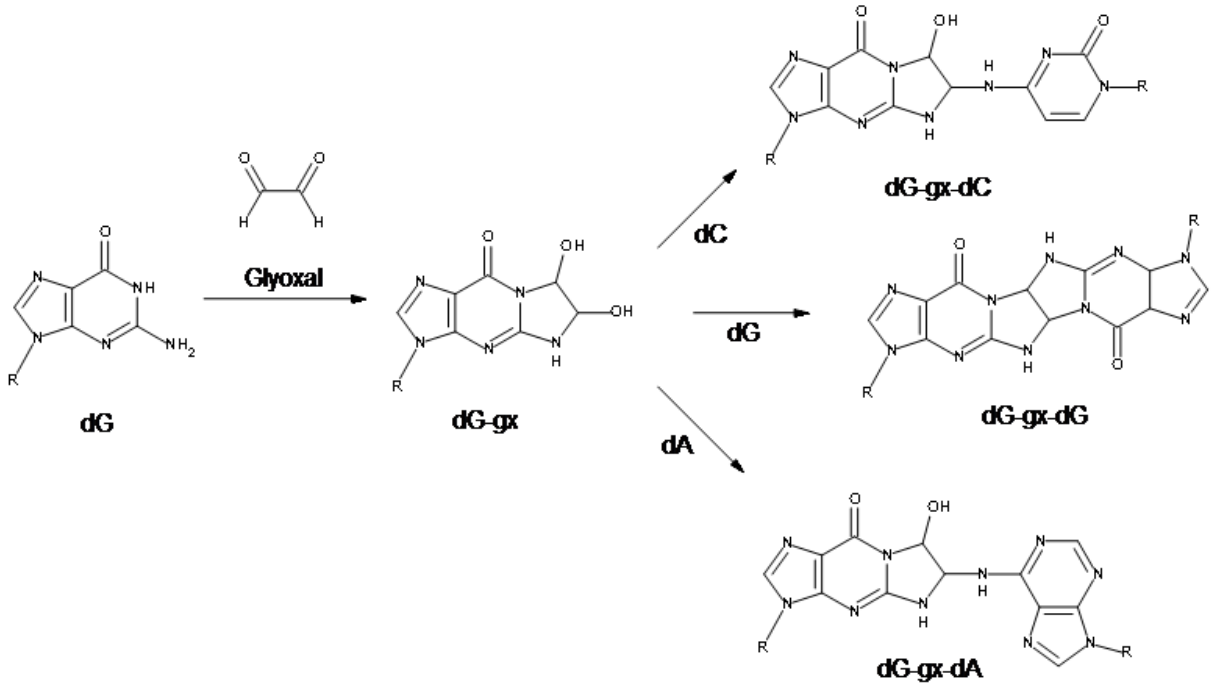


Abbildung 4.3: Quervernetzung von DNA-Basen durch Glyoxal; modifiziert nach [200]; dG = Desoxyguanosin, dG-gx = Desoxyguanosin-Glyoxal-Addukt, dG-gx-dC = quervernetztes Dimer aus Desoxyguanosin und Desoxycytidin, dG-gx-dG = quervernetztes Desoxyguanosin-Dimer, dG-gx-dA = quervernetztes Dimer aus Desoxyguanosin und Desoxyadenosin, dC = Desoxycytidin, dA = Desoxyadenosin

Die Reparatur der durch Glyoxal verursachten Schäden wird zum Teil auch von DnaQ und dem MDMR-System ausgeführt. Beide Systeme sind in *E. coli* K12 CSH116 defekt beziehungsweise gesättigt. Die dadurch bedingte hohe Anzahl an unkorrigierten Fehlern überdeckt möglicherweise den Effekt von Gyloxal in diesem Stamm. Eine weitere Erhöhung der Mutationsrate wäre zudem durch die Akkumulierung von negativen Mutationen (Reduzierung der Fitness, Funktionsverlust von Produkten essentieller Gene) nicht mit dem Überleben vereinbar [143]. Ein Mechanismus, der *E. coli* davor bewahrt den Schwellenwert zur *error catastrophe* zu überschreiten, ist nicht bekannt.

Die ermittelten Werte für die Mutationsraten stimmen mit den Werten aus der Literatur überein [154]. Die höchsten Mutationsraten wurden bei *E. coli* K12 CSH115 ($6{,}2 \pm 4{,}7 \times 10^{-6}$; Literaturwert: $6{,}65 \pm 0{,}59 \times 10^{-6}$) und *E. coli* K12 CSH116 ($4{,}0 \pm 2{,}8 \times 10^{-6}$; Literaturwert: $5{,}70 \pm 1{,}15 \times 10^{-6}$) ermittelt. Ciprofloxacin zeigte bei subinhibitorischen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Mutationsrate des Stammkollektivs, wohingegen Glyoxal als ein starkes mutagenes Agens bei *E. coli* K12 CSH107 wirkte.

4.2 Ortsspezifische Mutagenese

Mittels ortsspezifischer Mutagenese wurden zwei Punktmutationen erfolgreich in das Chromosom von *E. coli* MII eingeführt. Der erhaltene Stamm *E. coli* MIIQ ist isogen zu *E. coli* MII und unterscheidet sich, soweit bekannt, nur durch die *dnaQ*-Mutationen von seinem Ausgangsstamm. Der Vergleich beider Stämme liefert komparablere Ergebnisse als der Vergleich von *E. coli* K12 CSH107 und *E. coli* K12 CSH116, da letztere unter anderem unterschiedliche Resistenzeigenschaften aufweisen (vergleiche Kapitel 4.3) und ein verändertes Expressionsprofil nicht ausgeschlossen werden kann (vergleiche Kapitel 3.2).

Vor der erfolgreichen ortsspezifischen Mutagenese nach LEE *et al* wurden mehrere andere Methoden vergeblich versucht. Es bieten sich bei *E. coli* verschiedene Möglichkeiten an, um chromosomale Änderungen einzuführen. DATSENKO und WANNER [147] entwickelten basierend auf dem Rekombinationssystem des Bacteriophagen λ eine PCR-gestützte Methode zur Deletion von Genen im Chromosom. Der Vorteil dieses Systems liegt in der weitaus höheren Rekombinationsfrequenz im Vergleich zu den wirtseigenen Rekombinationssystemen, wie zum Beispiel RecA-RecBCD im Fall von *E. coli*. Das lineare Template für die Rekombination wird mittels PCR einer Kanamycin-Resistenzkassette erzeugt. Dafür werden Primer konstruiert, die jeweils einen Sequenzabschnitt enthalten, der nicht für das Annealing bei der PCR relevant ist. Dieser Bereich ist sequenzhomolog zu dem Bereich des Chromosoms, der deletiert werden soll. Dadurch wird die Ortsspezifität gewährleistet. Dieses PCR-Konstrukt wird mittels Elektroporation in das Wirtsbakterium eingebracht. In diesem Schritt liegt aufgrund der geringen Effizienz bereits der erste Nachteil dieser Methode. Durch Vergleich der Methode mit anderen [147, 148], konnte nach dem Ausschlussprinzip gefolgert werden, dass die reduzierte Effizienz (Rekombinationsfrequenz 1 von 10^6 - 10^7 im Vergleich zu bis zu 1 von 10 bei LEE *et al* [149]) auf die Elektroporation zurückzuführen ist. Nach Integration in das Chromosom kann die Resistenzkassette zwar durch die Aktivität einer Flippase entfernt werden, jedoch bleibt dann eine Narbensequenz zurück. In Hinsicht auf die nachfolgenden Experimente zur Regulation von *dnaQ* war dies in diesem Fall unerwünscht. Ein weiterentwickeltes Verfahren, das *Gene Doctoring* [149], wurde deshalb angewendet. Ein großer homologer Bereich wird dabei in ein Plasmid kloniert und erst *in vivo* linearisiert (siehe auch Kapitel 2.2.8). Alle Zellen enthalten das Template in

mehrfacher Kopie, wodurch die Effizienz derart erhöht, dass auf eine Selektion verzichtet werden kann.

Für die ortsspezifische Mutagenese wurde ein *dnaQ*-Fragment von *E. coli* K12 CSH116 verwendet, das zwei Mutationen aufweist, durch die ein Mutatorphänotyp entsteht [163]. Die zentrale Positionierung der Punktmutation der katalytischen Domäne in dem entstehenden DNA-Fragment erhöhte die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination, bei der die Mutation übertragen wird. Die Fragmentgröße wurde so gewählt, dass basierend auf Daten von HERRING *et al* [148], die größtmögliche Erfolgschance besteht. Die Orientierung mit der das Fragment in den Vektor kloniert wird, war ohne Bedeutung, da durch die *I-SceI*-vermittelte Restriktion das Fragment *in vivo* linearisiert wurde.

E. coli MII wurde für die Mutagenese ausgewählt, eine durch zwei Selektionsschritte aus einem Wildtyp hervorgegangen Mutante. Die Gyrase von *E. coli* MII weist einen Aminosäureaustausch an Position 83 von GyrA auf und MarR ist durch eine 175 bp Deletion im dafür codierenden Gen *marR* nicht mehr funktional (siehe Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9). Die Verwendung von *E. coli* MII war naheliegend, da der Schritt hin zu der hochresistenten Mutante *E. coli* MIII untersucht werden sollte, der eine Doppelmutation erfordert.

Auf die Verwendung eines Selektionsmarkers neben der Levansucrase (vergleiche Kapitel 2.2.8.3) konnte verzichtet werden. In diesem Experiment lag die Wahrscheinlichkeit für eine gezielte Mutagenese bei circa 0,4%. LEE *et al* [149] und HERRING *et al* [148] erreichten bei bestimmten Anwendungen zum Teil mehr als zehn Prozent. Das Vorscreening wurde mittels ARMS-PCR durchgeführt. Die Identifizierung des rekombinanten Stammes war dadurch auf DNA-Ebene einfach und zeiteffizient möglich (siehe Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6). Die Mutationsrate als phänotypisches Unterscheidungsmerkmal schied wegen des größeren Materialaufwands aus. Die Sequenzierung von *dnaQ* (siehe Abbildung 3.7 und Abbildung 3.27) bestätigte die Ergebnisse. An Position 15 von DnaQ befindet sich bei *E. coli* MIIQ nunmehr Isoleucin statt Threonin wie bei dem Ausgangsstamm *E. coli* MII (Abbildung 4.4 oben) und an Position 220 Glutaminsäure anstelle von Asparaginsäure (Abbildung 4.4 unten).

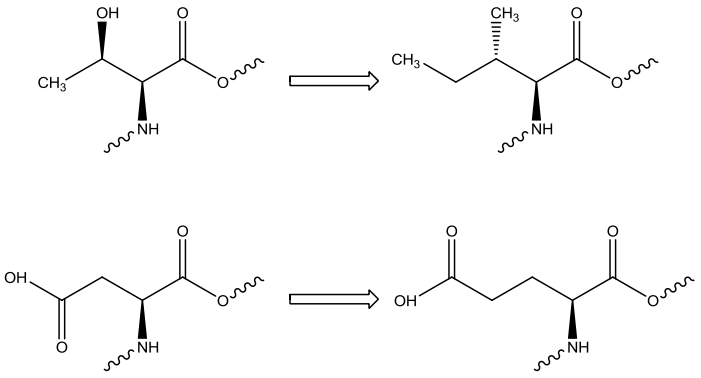


Abbildung 4.4: Änderung der Aminosäuren an Position 15 (oben; Threonin zu Isoleucin) und an Position 220 (unten; Asparaginsäure zu Glutaminsäure) von DnaQ in *E. coli* MIIQ; Erläuterungen im Text

An Position 15 könnte der Verlust der Hydroxy-Gruppe verantwortlich für die Funktionseinbuße des katalytischen Zentraums von DnaQ sein. An Position 220 ist womöglich die Verlängerung der Kohlenstoffkette an einer Konformationsänderung des Proteins beteiligt, die die Bindung zur α-Untereinheit der Polymerase III erschwert. Der genaue Mechanismus, wodurch die Punktmutationen die Proteinfunktion stören, ist nicht untersucht. Die Funktionseinbuße ist dagegen durch die erhöhte Mutationsrate belegt (siehe Kapitel 3.3.4).

4.3 Charakterisierung des rekombinanten Stammes

Hinweise auf die enge genetische Verwandtschaft von *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII wurden durch eine RFLP-Untersuchung und eine *marR*-PCR erhalten. Die RFLP-Analyse nutzte aus, dass eine Restriktionsschnittstelle von *Hinf*I (GANTC) in *gyrA* durch eine Mutation in Codon 83 verloren ging. Die Basenabfolge in *E. coli* MII lautet in den Codons 82 und 83, wie auch durch spätere Sequenzierung bestätigt (siehe Abbildung 3.19), GACTTG und nicht wie im Wildtyp GACTCG. Das verwendete PCR-Produkt von *gyrA* besaß folglich nur noch zwei statt drei Restriktionsschnittstellen für *Hinf*I.

Ein weiteres Charakteristikum von *E. coli* MII ist eine 175 bp große Deletion im Gen *marR* für den Repressor MarR des *mar*-Operons. Die PCR des betroffenen Bereichs zeigte bei *E. coli* MIIQ ein Produkt derselben Größe wie bei *E. coli* MII, das heißt dass eine Deletion derselben Größe in *marR* in beiden Stämmen vorliegt. Der Vergleichsstamm *E. coli* K12 CSH116 weist keine Deletion auf und die PCR mit denselben Primern ergab ein größeres Produkt (siehe Abbildung 3.9). Wildtyp-MarR bindet als Dimer simultan an zwei circa 21 Basenpaar große Bereiche von *marO* [201] (MarR-Sites I und II). Durch die Deletion von 175 bp aus dem nur

432 bp großem Gen *marR*, ist eine Bindung des Genpodukts des mutierten *marR* an *marO* nicht mehr möglich, da ein stark verkürztes und räumlich anders orientiertes Protein zwangsläufig resultiert. Dadurch wird *marRAB* konstitutiv exprimiert [177]. Das durch die Derepression vermehrt gebildete MarA bindet an die regulatorischen *mar*-Boxen (20 bp große, konservierte DNA-Sequenzbereiche) stromaufwärts vieler Gene [202]. Von MarA beeinflusste Gene werden unter dem Begriff Mar-Regulon zusammengefasst. Nachgewiesen und charakterisiert ist ein Einfluss von MarA auf die Expression von mindestens 28 Genen [203], doch zeigen Transkriptomanalysen, dass weit über 100 Gene beeinflusst werden könnten [204, 205]. MarA erhöht direkt den Efflux bei *E. coli* durch Bindung an die *mar*-Box stromaufwärts von *acrAB* und *tolC* und der dadurch erhöhten Expression der wichtigen Effluxpumpe AcrAB-TolC [206]. Ebenso wird die Expression von *micF* erhöht. Diese *antisense* RNA reduziert die Expression von *ompF*. Das davon codierte Protein OmpF ist ein Porin, durch das viele Substanzen in die Bakterienzelle gelangen [207]. Somit verursacht die Deletion in *marR* in *E. coli* MII sowohl einen verminderten Influx über OmpF als auch einen erhöhten Efflux durch vermehrte Bildung von AcrAB-TolC. Die vorliegende *marR*-Deletion ist mit einem Anstieg des MHK-Werts für Ciprofloxacin um zwei Stufen assoziiert [155].

Das wichtigste Kriterium der eingeführten *dnaQ*-Mutationen für die nachfolgenden Experimente ist die Ausbildung eines Mutator-Phänotyps bei *E. coli* MIIQ. Dass ein Mutator-Phänotyp vorliegt, konnte durch den Vergleich der Mutationsraten von *E. coli* MII und *E. coli* MIIQ gezeigt werden. Die Bestimmung ergab für *E. coli* MIIQ eine 325-fach erhöhte Mutationsrate. Der Unterschied ist in vergleichbarer Höhe wie der zwischen *E. coli* K12 CSH107 und *E. coli* K12 CSH116 in Abbildung 3.1 (ca. 100-fache Erhöhung).

Die Inkubation mit subinhibitorischen Ciprofloxacinkonzentrationen erhöhte die Mutationsrate von *E. coli* MIIQ darüber hinaus nicht (siehe Abbildung 3.11). Ein vergleichbares Ergebnis wurde in Kapitel 3.1 ermittelt und bereits in Kapitel 4.1 diskutiert.

Der Zusatz des Gyrase-Inhibitors Novobiocin zeigte nur bei dem Vergleichsstamm *E. coli* MII eine leichte Erhöhung der Mutationsrate, nicht aber bei *E. coli* MIIQ (siehe Abbildung 3.12). Die Zielstruktur des Aminocumarin-Antibiotikums ist GyrB [208]. Diese Antibiotika sind kompetitive Inhibitoren der ATPase-Aktivität der B-Untereinheit der Gyrase. Die ATPase-Aktivität ist für eine Konformationsänderung der Gyrase essentiell (siehe Kapitel 1.3.1) [209]. Die in beiden Stämmen vorliegenden Mutationen in *gyrA* (Codon 83 und 87) haben keinen

bekannten Einfluss auf die Wirkung des Antibiotikums. Die Hemmung der Gyrase-Aktivität durch Novobiocin führt dazu, dass weniger negative Superspiralisierung in die DNA eingeführt wird. Der Grad der Superspiralisierung ist somit verändert. Der Spiralisierungsgrad ist ein globaler Transkriptionsregulator, durch den die Expression vieler Gene beeinflusst wird [210]. Die ermittelte Erhöhung der Mutationsrate könnte also damit begründet werden, dass die Expression eines an der Regulation der Mutationsrate beteiligten Enzyms reduziert ist. Die Erhöhung der Mutationsrate auf eine Aktivierung der SOS-Antwort zurückzuführen ist nicht plausibel. Die Aktivität von Novobiocin führt im Gegensatz zur Aktivität der Fluorchinolonen nicht zu einer Stabilisierung von Doppelstrangbrüchen in der DNA. Doppelstrangbrüche aktivieren die SOS-Antwort durch die Filamentbildung von RecA an der resultierenden *single-stranded* DNA. RecA ist somit essentiell für eine SOS-Aktivierung, doch ist bekannt, dass ein verminderter negativer Spiralisierungsgrad zu einer geringeren Expression von *recA* führt [140]. Die beobachtete Erhöhung der Mutationsrate von *E. coli* MII in Anwesenheit von Novobiocin liegt mit maximal einer Zehnerpotenz zudem im Bereich der Schwankungsbreite der Messmethode.

Die Bestimmung der Generationszeit von *E. coli* MIIQ im Vergleich zu dem Ausgangsstamm *E. coli* MII sollte den Einfluss des Mutatorgens auf die Fitness des Stammes aufzeigen. Die bakterielle Fitness ist definiert als die Fähigkeit der Mikroorganismen zum Überleben und zur Reproduktion [211], im weiteren Sinne auch der Anpassungsfähigkeit. Die wichtigsten Charakteristika dabei sind die Reproduktions- und Sterberate, die Übertragunsgrate zwischen Wirten und die Eliminationsrate durch den Wirt [212]. Bei den hinsichtlich der Mutationen mit dem Stammpaar *E. coli* MII und *E. coli* MIIQ vergleichbaren Stämmen *E. coli* K12 CSH107 und *E. coli* K12 CSH116 ergab die Bestimmung der Generationszeit eine Erhöhung um 15% bei dem Mutatorstamm (siehe Abbildung 3.13). Diese verlängerte Generationszeit kann wegen des unterschiedlichen genetischen Hintergrunds der Stämme (vergleiche Tabelle Tabelle 2.1) nicht ausschließlich auf DnaQ zurückgeführt werden: Eine Tn10-Insertion in *yafC* von *E. coli* K12 CSH116 unterscheidet den Stamm neben den *dnaQ*-Mutationen von *E. coli* K12 CSH107. *yafC* codiert für einen putativen Transkriptionsregulator. Welche Gene von diesem Regulator beeinflusst werden könnten und in welchem Ausmaß, ist nicht bekannt. Ein Einfluss der unter anderem eine Tetracyclin-Resistenz vermittelnden Insertion auf die Generationszeit kann daher nicht ausgeschlossen werden (siehe auch Kapitel 3.1.1). Ein negativer Einfluss von *dnaQ*-Mutatormutationen auf die Fitness wurde in

der Literatur beschrieben [143, 163, 213, 214]. Die Bestimmung der Generationszeit von *E. coli* MIIQ in Kapitel 3.3.5 zeigte jedoch keinen signifikant erhöhten Wert im Vergleich zu *E. coli* MII. Die Fitness von *E. coli* MIIQ ist unter den Versuchsbedingungen nicht beeinträchtigt, doch wurde in einer Bestimmung eine verlängerte lag-Phase registriert. Die Annahme, dass *E. coli* MIIQ seinem Ausgangsstamm *E. coli* MII in Kompetitionsexperimenten unterlegen wäre, liegt daher nahe. Die vergleichbaren Generationszeiten können anhand der Ergebnisse aus Abbildung 3.16 nicht auf den Verlust des Mutatorphänotyps durch zufällige Mutationen zurückgeführt werden, da sich die Mutationsrate nicht im Verlauf der Generationszeitbestimmung geändert hatte. Eine verbesserte Stabilisierung der ε-Untereinheit durch die θ-Untereinheit im Holoenzym der Polymerase III ist demnach unwahrscheinlich, da dies die Mutationsrate geringfügig erniedrigt hätte [215]. Mutationen in *dnaE*, der α-Untereinheit der Polymerase III, könnten ebenfalls die Fitnesseinbußen durch *dnaQ*-Mutationen kompensieren und sind Grundvoraussetzung für die Lebensfähigkeit von *dnaQ*-Deletionsmutanten [143, 214, 216, 217]. Die meisten dieser Mutationen, für *E. coli* sogar alle bekannten, gehen jedoch mit einer Reduktion der Mutationsrate einher. Die Sequenzierung von *dnaE* könnte Aufschluss über das Vorliegen bislang unbekannter Mutationen geben, die die Fitness erhöhen können, ohne als Antimutator zu wirken. Für eine Untersuchung von *dnaE* müsste das Gen komplett sequenziert werden. Durch das Vorliegen eines Mutatorphänotyps in *E. coli* MIIQ ist davon auszugehen, dass Mutationen gefunden worden wären.

Wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben, neigt *E. coli* MIIQ nach sechsstündigem Wachstum zur Bildung von filamentierten (langgestreckten), aneinandergelagerten Zellen. Dieses Phänomen wird zum Teil auch bei Überexpression von Fremdproteinen, SOS-Induktion und in der stationären Phase beobachtet [218, 219] und weist auf eine fehlerhafte Zellteilung hin. Die Ursache hierfür könnte in der Akkumulation verschiedenster Mutationen liegen, die über die Generationen erworben und weitergegeben wurden.

4.4 Selektion ciprofloxacinresistenter Mutanten von *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII

Die Mutationsrate von *E. coli* MII in einem Ciprofloxacin-Forwardassay ist sehr gering (siehe Abbildung 3.17). Wird die Konzentration des Antibiotikums hoch genug gewählt, besitzt Ciprofloxacin ein niedriges endogenes Resistenzpotential, da eine Doppelmutation in zwei

Zielstrukturen für eine signifikante Erhöhung der Resistenz des Stammes erforderlich ist [154]. Die Gemeinsamkeit der wenigen aus *E. coli* MII hervorgegangenen Stämme ist, dass eine zusätzliche Mutation sowohl in *gyrA* als auch in *parC* hinzugekommen ist (vergleiche *E. coli* MIII Kapitel 3.4.3) [155]. Die theoretische Wahrscheinlichkeit für eine derartige Doppelmutation liegt im Bereich von 10^{-15} und niedriger [154]. Dieser Selektionsschritt wurde mit *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII wiederholt versucht. Eine Selektionskonzentration von 8 µg/mL Ciprofloxacin stellte sich als geeignet heraus, entsprechend dem vierfachen MHK-Wert der Ausgangsstämme. Niedrigere Konzentrationen führten zu einem dichten Rasenwachstum auf der kompletten Agarplatte. Höhere Konzentrationen lagen offenbar über der *mutant prevention concentration* (MPC) für dieses Experiment. Die MPC ist ursprünglich definiert als die niedrigste mögliche Empfindlichkeit einer Einschritt-Mutante [220]. Oberhalb dieser Antibiotikakonzentration ist also keine theoretisch aus einem Selektionsschritt hervorgegangene Mutante auch nicht vorübergehend lebensfähig. Vereinzelte Kolonien in einer geeigneten Anzahl wurden in diesem Experiment erhalten, indem eine hundertfach konzentrierte Bakteriensuspension auf große LB-Platten (Durchmesser 15 cm statt üblicherweise 9,2 cm) ausgestrichen wurde. Das Wachstum von Kolonien auf darunterliegenden, durch das Antibiotikum abgetöteten Zellen, wurde dadurch minimiert. Die Mutationsrate, mit der unter den gewählten Bedingungen Mutanten auftraten, lag für *E. coli* MIIQ bei $7{,}08 \cdot 10^{-9}$. Eine Mutationsrate in dieser Höhe wurde in der Literatur bei Selektions-Experimenten bestimmt, bei denen nur eine Fluorchinolonresistenzmutation für das Überleben des Bakteriums erforderlich war [155]. Die Mutationsrate von *E. coli* MIIQ war in diesem Versuch mehr als 500-mal höher als die von *E. coli* MII, dessen Selektion keine Mutanten hervorbrachte. Der Unterschied der Mutationsraten beider Stämme in diesem Versuch war mehr als doppelt so groß wie in einem Rifampicin-Assay (vergleiche Kapitel 3.3.4). Für eine statistisch signifikante Aussage hinsichtlich des Unterschieds zum Rifampicin-Assays müsste der Versuch jedoch öfter wiederholt werden. Diese Differenz könnte in der Aktivierung der SOS-Antwort durch die Fluorchinolon-induzierten Doppelstrangbrüche begründet sein, obwohl in anderen Experimenten (vergleiche Kapitel 3.1) kein derartiger Einfluss auf die Mutationsrate verzeichnet wurde. Es ist möglich, dass unter den hier gewählten Bedingungen der Einfluss der SOS-Induktion auf die Mutationsrate größer ist, wie auch aus der Literatur zu entnehmen

ist (bestimmt für *M. tuberculosis*) [221]. Die Induktion der SOS-Antwort ändert sich ebenfalls in Abhängigkeit des gewählten Fluorchinolons und des Stammhintergrunds [222].

Für insgesamt acht Mutanten (siehe Tabelle 3.3), hervorgegangen aus *E. coli* MIIQ wurden die MHK-Werte von Ciprofloxacin und Chloramphenicol mittels der Mikrodilutionsmethode (siehe Kapitel 2.2.2.1) bestimmt. Die EUCAST (*european committee on antimicrobial susceptibility testing*) klassifiziert Enterobacteriacae wie *E. coli* bis zu einem MHK-Wert von 0,5 µg/mL für Ciprofloxacin als empfindlich. Oberhalb eines MHK-Wertes von 1 µg/mL gilt der Stamm als klinisch resistent (Clinical Breakpoint Table v3.1, Stand 11.02.2013). Dieser Einteilung zufolge ist bereits der Ausgangsstamm *E. coli* MIIQ mit einem MHK-Wert von 2 µg/mL resistent gegenüber Ciprofloxacin. Die ermittelten MHK-Werte der daraus hervorgegangen Mutanten liegen nochmals drei bis sieben serielle Verdünnungsstufen über diesem Wert (siehe Kapitel 3.4.1). Es werden somit Werte erreicht, die weit über der maximalen Serumkonzentration der höchsten Einmaldosis von Ciprofloxacin liegen [223]. Vier Stämme zeigten MHK-Werte von 256 µg/mL. Der niedrigste Wert wurde bei *E. coli* MIIQ-CS45 mit 16 µg/mL ermittelt. Chloramphenicolresistenz liegt nach EUCAST-Kriterien für Enterobaceriaceae bei einem MHK-Wert von ≥ 8 µg/mL vor. *E. coli* MIIQ zeigt auch für dieses Antibiotikum mit einem MHK-Wert von 16 µg/mL bereits Resistenz. Die MHK-Werte wurden in Folge der Selektion je nach Mutante noch zusätzlich um ein bis zwei Stufen erhöht (siehe Kapitel 3.4.1). Chloramphenicolresistenz beruht in diesen Stämmen auf erhöhtem Efflux, da keine Enzyme vorhanden sind, die das Antibiotikum chemisch modifizieren. Hinweise auf Mutationen in Genen für Untereinheiten der großen ribosomalen Untereinheit, der Zielstruktur von Chloramphenicol, liegen für diese Stämme ebensowenig vor. Die geringere Erhöhung der MHK-Werte im Vergleich zu Ciprofloxacin ist dadurch zu erklären, dass der Efflux durch die *marR*-Deletion (vergleiche Abbildung 3.9) bereits im Ausgangsstamm erhöht war. Der Anteil eines erhöhten Efflux an der Resistenz konnte in Empfindlichkeitsbestimmungen unter Zusatz des Effluxpumpeninhibitors PAβN (Phenylalanyl-arginyl-β-naphthylamid) abgeschätzt werden. Die in Gegenwart von PAβN ermittelten MHK-Werte schließen einen Effekt durch MDR-Efflux aus, da dieser vollständig inhibiert ist [224]. Der gemessene MHK-Wert ist dadurch in den genetisch charakterisierten Mutanten allein auf Mutationen in den Zielstrukturen zurückzuführen (plasmidcodierte Fluorchinolonresistenz, wie in Kapitel 1.4.1.2 und 1.4.1.3 beschrieben, kann ausgeschlossen werden). Die Anwesenheit des Effluxpumpeninhibitors bedingt folgerichtig auch eine

Abnahme der MHK-Werte um mindestens eine Verdünnungsstufe. Die MHK-Werte von Ciprofloxacin waren bei den Mutanten um mindestens drei Stufen erniedrigt, liegen aber noch im als resistent deklarierten Bereich. PAβN senkt die Ciprofloxacin-MHK bei den Ausgangsstämmen *E. coli* MII und *E. coli* MIIQ unter den Wert für klinische Resistenz.

Die molekularen Grundlagen des Resistenzphänotyps wurden ermittelt, indem die DNA-Sequenzen der QRDRs zunächst von *gyrA* und *parC* bestimmt wurden, der primären beziehungsweise sekundären Zielstruktur von Ciprofloxacin. Die meisten Stämme (Ausnahmen *E. coli* MIIQ-CS15 und *E. coli* MIIQ-CS45) zeigten zwei zusätzliche Punktmutationen in den bekannten Codons [155] 87 in *gyrA* und 80 und 84 in *parC* (siehe Abbildung 3.19). Die Art und Anzahl der Mutationen korreliert auch im Vergleich zu Literaturangaben [100, 155, 161] mit der Höhe der MHK-Werte für diese Stämme (siehe Tabelle 3.3). Der Ausgangsstamm für die Selektion, *E. coli* MIIQ, ist bereits eine Zweitschritt-Mutante, wodurch von Beginn an Codon 83 verändert war. Eine 175 bp Deletion in *marR* bedingt zudem einen *mar*-Phänotyp, wodurch weitere Mutationen in Effluxsystemen eher unwahrscheinlich sind. Im nächsten Schritt wurden Gene für weitere Untereinheiten von Typ-II-Topoisomerasen sequenziert, um die Grundlage der Resistenz in den Stämmen *E. coli* MIIQ-CS12, *E. coli* MIIQ-CS15 und *E. coli* MIIQ-CS45 zu ermitteln. Diese Stämme wiesen in den bislang sequenzierten Bereichen höchstens eine zusätzliche Resistenzmutation auf. Innerhalb der QRDR von *parE* wurde in keinem der Stämme eine von *E. coli* MIIQ abweichende Mutation entdeckt. In *gyrB* findet sich bei *E. coli* MIIQ-CS15 in Codon 464 eine Punktmutation (siehe Abbildung 3.20). Dieser Stamm weist somit ebenfalls zwei zusätzliche Targetmutationen auf und der Anstieg des MHK-Wertes für Ciprofloxacin ist durch die Mutationen erklärbar.

Um zu überprüfen, ob Mutationen außerhalb der QRDRs für die Resistenz mitverantwortlich sind, wurden die Gene *gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE* von *E. coli* MIIQ-CS45 und *E. coli* MIIQ-CS12 komplett sequenziert. Die Sequenzierung der QRDR von *parC* zeigte für *E. coli* MIIQ-CS12 an der entsprechenden Position kein eindeutiges Ergebnis (siehe Abbildung 3.19). Nach Vereinzelung der Kolonien wurden eine MHK-Bestimmung und DNA-Sequenzierung durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass *E. coli* MIIQ-CS12 neben den *gyrA*-Mutationen auch eine Punktmutation in Codon 80 von *parC* trägt. Der MHK-Wert einer Reinkultur dieses Genotyps liegt für Ciprofloxacin bei 64 µg/mL und somit in einem aufgrund der Mutationen

zu erwartendem Bereich [100, 155, 161]. Die Sequenzierung der vollständigen vier Gene zeigte im Folgenden keine vom Ausgangsstamm abweichende Punktmutation. Die Ursache für den Ciprofloxacin MHK-Wert von 16 µg/mL bei *E. coli* MIIQ-CS45 liegt daher nicht in zusätzlichen Mutationen der primären Zielstrukturgene der Fluorchinolone. Die MHK-Werte von *E. coli* MIIQ-CS45 wurden bei Zusatz eines Effluxpumpeninhibitors auf den Wert des Ausgangsstammes erniedrigt, was eine Beteiligung von Effluxsystemen an dem Resistenzphänotyp nahelegt. Weitere Mutationen von *E. coli* MIIQ-CS45 könnten die Effluxpumpen direkt oder andere globale Regulatoren neben *mar* betreffen.

Stämme mit insgesamt drei Mutationen in *gyrA* und *parC* zeigten einen sehr hohen MHK-Wert für Ciprofloxacin (vergleiche Tabelle 3.3 und Tabelle 3.6). Die in *gyrB* bestimmte Mutation zeigt im Zusammenspiel mit den beiden *gyrA*-Mutationen und der *marR*-Deletion einen um vier Stufen erhöhten MHK-Wert für Ciprofloxacin. Die MHK-Werte der übrigen Mutanten werden dadurch jedoch nicht erreicht.

In den acht aus der Selektion hervorgegangenen Stämmen wurden insgesamt 14 Punktmutationen gefunden, wobei es sich in fünf Fällen um C→A-Transversionen handelt. Die neun gefundenen Transitionen setzten sich aus sieben Änderungen von Guanin zu Adenin und zwei Änderungen von Adenin zu Guanin zusammen. Auch in der Literatur wurden bei einem *dnaQ*-Mutator mit dem hier vorliegenden *dnaQ*-Allel mehr Transitionen als Transversionen beobachtet [225]. Eine eindeutige Tendenz oder Aussage lässt sich aus dem kurzen auswertbaren Bereich (QRDRs von *gyrA* und *parC* und Teile von *gyrB*) nicht ableiten. Um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu der Art der beobachtbaren Mutationen zu erhalten, hätten weit mehr Mutationen untersucht werden müssen. Zudem ist die Aussagekraft der Messung bereits durch die Begrenzung auf Resistenzmutationen limitiert.

Es wurde zudem festgestellt, dass bei *E. coli* MIIQ und *E. coli* MII im Vergleich zu dem nahe verwandten *E. coli* CFT073 ein Basentriplett in *parC* (nach Codon 521, codiert in *E. coli* CFT073 für Prolin) deletiert ist (siehe Abbildung 3.23). Außerhalb des Strukturgens findet sich eine Insertion von drei Basenpaaren. Mögliche Auswirkungen dieser Deletion sind nicht bekannt.

4.5 Sequenzanalyse von *dnaQ* in klinischen Isolaten

Das *dnaQ*-Gen codiert für die Epsilon-Untereinheit der replikativen DNA-Polymerase III von *E. coli.* DnaQ ist eine eigenständige Untereinheit des Holoenzyms der DNA-Polymerase III [226]. Grampositive Bakterien zeigen diese Unterteilung in zwei separate Untereinheiten (α-Untereinheit und ε-Untereinheit) nicht und die 3´-5´-Exonukleasefunktion ist Teil des katalytischen Polypeptides der Polymerase (siehe auch Kapitel 1.2.1). Die Funktion von DnaQ ist unentbehrlich, um eine geringe Fehlerrate und damit die genetische Stabilität des Bakteriums aufrechtzuerhalten [143]. Bestimmte Punktmutationen in *dnaQ* verursachen eine bis zu 1.000-fach erhöhte Mutationsrate des betroffenen Stammes [162, 163, 164]. Klinische Isolate, die aufgrund einer *dnaQ*-Mutation einen Mutatorphänotyp zeigen, wurden bislang nicht beschrieben.

Zehn fluorchinolonresistente Stämme aus einem Kollektiv von R. Hope aus London (klinische Isolate von *E. coli*) wurden sequenziert, um festzustellen, wie konserviert die *dnaQ*-Sequenz in klinischen Isolaten von *E. coli* ist. Die Stämme zeichnen sich durch hohe Resistenz gegenüber Ciprofloxacin aus und die dem zugrunde liegenden Zielstrukturmutationen in *gyrA* und *parC* wurden bereits ermittelt (siehe Tabelle 3.7). *dnaQ* von sieben weiteren Stämmen mit bekannten Resistenzmutationen in den Zielstrukturen der Fluorchinolone wurde ebenfalls sequenziert (siehe Tabelle 3.8).

Besonders stark konserviert ist der N-terminale Bereich des DnaQ-Proteins, in dem die katalytische Exonukleasefunktion liegt [143]. Weitere aus Alignments auch mit anderen Spezies gefundene konservierte Bereiche [162, 164, 166] sind in Abbildung 3.27 zusammen mit den ermittelten Aminosäuresequenzen dargestellt. Wie aus der Abbildung hervorgeht, wurden in den Isolaten mehrere Punktmutationen gefunden, die sich von der Sequenz der beiden Referenzstämme *E. coli* K12 MG1655 und *E. coli* CFT073 unterscheiden. Die Mutationen an Position 136 (136. Aminosäure des Strukturgens; Arginin statt Lysin) in *E. coli* Eo100 und an Position 238 (Threonin statt Serin) in *E. coli* Eo977 und *E. coli* Eo999 erscheinen besonders interessant. Die erstgenannte Mutation befindet sich in einer als konserviert definierten Region. Ein Einfluss auf die Enzymaktivität ist demnach möglich und wurde deshalb in den in Kapitel 3.6 und 3.7 gezeigten Ergebnissen untersucht.

Die in *E. coli* Eo977 und *E. coli* 999 gefundene Mutation an Position 238 (S238T) liegt am C-terminalen Ende des DnaQ-Proteins und demnach in der Nähe der zweiten Punktmutation von *E. coli* MIIQ (siehe Abbildung 3.27), die mitverantwortlich für den Mutatorphänotyp ist. Im C-Terminus liegt der Bereich der direkten Protein-Protein-Interaktion zwischen der α- und der ε-Untereinheit [227, 228]. Eine verminderte Interaktion sorgt dafür, dass das Core-Enzym der Polymerase III, bestehend aus den α-, ε- und θ-Untereinheiten, nicht ordnungsgemäß zusammengesetzt werden kann. Die Exonuklease-Aktivität kann dadurch beeinträchtigt sein [229].

Drei der sequenzierten Stämme, *E. coli* Eo80, *E. coli* Eo100 und *E. coli* Eo320, zeigten eine Mutation (Cytosin zu Thymin) 23 Basen 5´ zum Genstart (ATG) von *dnaQ* (siehe Abbildung 3.26). Die Mutation liegt zwischen der -10 Region des *rnhA*-Promotors und dem dazugehörigen Transkriptionstartpunkt [165]. Die Mutation befindet sich somit nicht innerhalb der bekannten regulatorischen Bereiche, weder des *dnaQ*- noch des *rnhA*-Gens. Dies ist auch der Fall, wenn andere Modelle für die Lage der regulatorischen Bereiche herangezogen werden (siehe Abbildung 3.26) als das von NOMURA *et al* [165]. Ein möglicher Einfluss auf die Expression wurde in Kapitel 3.7 untersucht und wird in Kapitel 4.7 diskutiert.

4.6 Expression von *dnaQ*-Allelen in *E. coli* MII

In den *dnaQ*-Genen der Stämme *E. coli* Eo100, *E. coli* Eo333 und *E. coli* Eo977 wurden Mutationen gefunden (siehe Abbildung 3.27), die zu einem Aminosäureaustausch im Protein führen. Die Auswirkung dieser Mutationen auf die Proteinfunktion und damit die Mutationsrate wurde überprüft, indem die Strukturgene dieser Stämme inklusive den Promotorbereichen in pBR322 kloniert wurden. Das dafür erzeugte PCR-Fragment umfasst einen Bereich von etwa 200 bp vor dem Genstart bis etwa 150 bp nach Ende des Gens. Beide Promotoren von *dnaQ* sind in dem Produkt enthalten. Das Gen für die β-Lactamase TEM-1 von pBR322 wurde durch die Klonierung zum Großteil deletiert und damit funktionsunfähig. Eine Negativselektion auf Abwesenheit einer Ampicillinresistenz war mit den Transformanden möglich und erleichterte die Identifizierung eines korrekten Stammes. Die Orientierung mit der das *dnaQ*-Allel in pBR322 kloniert wurde, ist entgegengesetzt zur Leserichtung der ursprünglichen β-Lactamase, wodurch der verbliebene Rest des dazugehörigen Promotors keinen Einfluss auf die *dnaQ*-Expression zeigen kann.

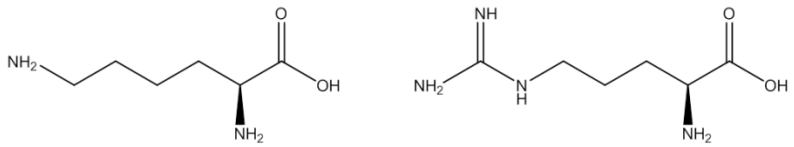
Die Kopienzahl, mit der das Plasmid in der Zelle vorliegt, bedingt die Anzahl an Kopien des *dnaQ*-Allels. QUIÑONES *et al* [140] konnten zeigen, dass die Mutationsrate eines Mutator-Allels von *dnaQ* (*dnaQ*49) auf Wildtyp-Niveau sinkt, wenn das Allel in pUC18 kloniert vorliegt. Das für dieses Experiment ausgewählte Plasmid pBR322 zählt zu den *medium copy plasmids* und liegt in einer niedrigen zweistelligen Kopienzahl in der Zelle vor [230]. Das Plasmid kann dennoch gut aus Zellen isoliert werden und ist besser für die notwendigen Arbeitsschritte geeignet als Plasmide, die nur einmal pro Bakterium vorliegen. Die im Vergleich zu pUC18 niedrigere Kopienzahl soll den Antimutator-Effekt verhindern. Das Mutator-Allel von *dnaQ* aus *E. coli* MIIQ wurde zu diesem Zweck nach der gleichen Strategie in pBR322 kloniert (vergleiche Kapitel 3.6) und dient als Kontrolle des Systems. Hätte dieses Allel keine erhöhte Mutationsrate erzeugt, wäre die gesamte Konstruktion nicht zur Detektion von Mutatorallelen geeignet.

Nach erfolgreicher Klonierung wurde *E. coli* MII jeweils mit den Plasmiden, die *dnaQ* aus *E. coli* MII, *E. coli* MIIQ, *E. coli* Eo100, *E. coli* Eo333 und *E. coli* Eo977 enthalten, transformiert (Plasmide pHPMP03-05, pHPMP03-06, pHPMP03-01, pHPMP03-03 und pHPMP03-04). Dadurch wurde wegen des gleichen Stammhintergrunds ein möglicher Einfluss des Wirtsstammes auf die Messung ausgeschlossen. Da *E. coli* MII ein intaktes Wildtypallel von *dnaQ* besitzt, konnten in diesem Versuch nur dominante *dnaQ*-Mutatorallele identifiziert werden. Ein Wirtsstamm mit einer *dnaQ*-Deletion würde sich dagegen dafür eignen auch rezessive Allele zu untersuchen, doch ist nicht gelungen, eine solche Mutante herzustellen. Der Versuch einen Stamm mit *dnaQ*-Deletion herzustellen erfolgte analog der in Kapitel 3.2.1 vorgestellten Methode nach DATSENKO und WANNER. Dabei wurden, wie auch beim Einsatz dieser Methode in anderen Experimenten in dieser Arbeit, keine Rekombinanten erhalten.

Das beschriebene System wurde mit Allelen der Stämme *E. coli* MII und *E. coli* MIIQ validiert. Das Allel von *E. coli* MIIQ zeigte in diesem Experiment mit einer Mutationsrate von $1.62 \cdot 10^{-5}$ (RIF^F-Assay, 4-fache MHK) einen Wert, der mit vorherigen Ergebnissen (Kapitel 3.3.4 und Kapitel 3.1) vergleichbar ist. Die durch pBR322 bedingte erhöhte Kopienzahl des *dnaQ*-Allels zeigte keinen kompensatorischen Effekt auf die Mutationsrate. Die Mutationsrate mit dem Allel aus *E. coli* MII lag um mehr als zwei Zehnerpotenzen unter dem Wert des Allels aus *E. coli* MIIQ. Die Stämme *E. coli* Eo100, *E. coli* Eo333 und *E. coli* Eo997 zeigten Werte im

Bereich des Allels von *E. coli* MII (vergleiche Abbildung 3.30). Das Vorhandensein eines dominanten Mutator-Allels in diesem Kollektiv kann durch diesen Versuch ausgeschlossen werden.

Wie in Abbildung 3.30 gezeigt, weist das *dnaQ*-Allel von *E. coli* Eo100 plasmidcodiert in Anwesenheit des Wildtyp-Allels keine erhöhte Mutationsrate auf. Die Mutationsrate des klinischen Isolats ohne Plasmid war in einem Rifampicin Forward-Assay (siehe Kapitel 3.6.1) ebenfalls nicht auf das Niveau eines Mutatorstammes erhöht. Diese Punktmutation besitzt den Daten zufolge keinen signifikanten Einfluss auf die Mutationsrate und daher vermutlich auch nicht auf die Proteinfunktion. Ein isogener Vergleichsstamm ist für das klinische Isolat *E. coli* Eo100 nicht verfügbar. Ein Grund für den geringen Einfluss der Punktmutation könnte die strukturelle Ähnlichkeit von Lysin, wie im Wildtypprotein und Arginin, wie bei *E. coli* Eo100 sein (siehe Abbildung 4.5).



Lysin Arginin

Abbildung 4.5: Chemische Strukturformeln von Lysin und Arginin

Beide Aminosäuren haben eine verhältnismäßig lange apolare Kohlenwasserstoff-Seitenkette, die mit einer basischen funktionellen Gruppe abschließt, die bei dem Austausch erhalten bleibt.

Die Auswirkung der Mutation auf die Proteinfunktion kann aus der Literatur und aus Kristallstruktur-Analysen nicht abgeleitet werden. Der Bereich von Aminosäure 129 bis 137 des Strukturgens ist zwar konserviert, doch konnte ihm bislang keine Funktion zugeordnet werden. Die Betrachtung der Kristallstruktur von DnaQ zeigt ebensowenig eine räumliche Nähe des betroffenen Bereichs zu den katalytischen Bereichen. Bekannt ist, dass die Exonuklease-Funktion vom Bereich zwischen den Aminosäuren 10 und 17 des Strukturgens abhängig ist [231]. Es wird angenommen, dass dieser Bereich für Koordinierung eines für die Proteinfunktion essentiellen zweiwertigen Kations verantwortlich ist (siehe Abbildung 1.4). Mutatormutationen wurden für den Bereich um Aminosäure 136 des Strukturgens ebensowenig beschrieben [231].

Der Aminosäureaustausch von Serin zu Threonin an Position 238 von DnaQ der Stämme *E. coli* Eo977 und *E. coli* Eo999 zeigte in diesem Experiment ebenfalls keinen Einfluss auf die Mutationsrate. Auch an dieser Position bleibt die funktionelle Gruppe trotz Mutation erhalten. Die Bindung von DnaQ an die α-Untereinheit scheint in diesen beiden Stämmen nicht derart beeinträchtigt zu sein, dass die Mutationsrate steigt.

4.7 Bestimmung der *dnaQ*-Genexpression in Anwesenheit plasmidcodierter *dnaQ*-Allele

Die Sequenzierung von *dnaQ* in *E. coli* Eo100 und *E. coli* Eo320 zeigte für beide Stämme eine Punktmutation an Position -23 bezogen auf den Genstart (ATG) von *dnaQ*. Der Einfluss dieser Mutation auf die *dnaQ*-Expression war in Kapitel 3.7 isoliert betrachtet worden. Die Konzeption des Versuches sah denselben Stammhintergrund vor, um so nur Unterschiede zu erfassen, die durch die Unterschiede der plasmidcodierten *dnaQ*-Allele (vergleiche Kapitel 3.5 und 3.6) verursacht wurden. Abbildung 3.32 zeigt, dass die Expression von *dnaQ* in *E. coli* WT in Gegenwart des *dnaQ*-Allels aus *E. coli* Eo100 auf weniger als die Hälfte des Wertes (0,36-fache Expression, bezogen auf das Ergebnis mit dem Allel von *E. coli* MII in *E. coli* WT) reduziert war. Die *dnaQ*-Expression in *E. coli* WT mit dem plasmidcodierten *dnaQ*-Allel aus *E. coli* Eo320 war in diesem Kontext geringer reduziert (0,73-fache Expression, bezogen auf das Ergebnis mit dem Allel von *E. coli* MII in *E. coli* WT). Der einzige Unterschied in der Sequenz von *dnaQ* von *E. coli* Eo100 und *E. coli* Eo320 ist eine Strukturgenmutation im 136. Codon bei *E. coli* Eo100. Nach den erhaltenen Ergebnissen wird die *dnaQ*-Expression offenbar durch die Strukturgenmutation im Zusammenspiel mit der Mutation vor dem Gen (Position -23 vor dem Genstart von *dnaQ*) reduziert. Die möglichen Auswirkungen der Strukturgenmutation auf die Proteinstruktur und Proteinfunktion wurden in Kapitel 4.6 diskutiert. Die Reduktion der *dnaQ*-Expression in Gegenwart des *dnaQ*-Allels von *E. coli* Eo100 wurde in allen Einzelmessungen und unter allen Versuchsbedingungen (verschiedener Stammhintergrund, unterschiedlicher Spiralisierungsgrad der DNA, Zusatz von Novobiocin) nachgewiesen. Ein Messfehler oder zufällige Schwankungen sind auch aufgrund der niedrigen Standardabweichung unwahrscheinlich. Der genaue Mechanismus, über den die Strukturgenmutation Einfluss auf die Expression des Gens nehmen kann, ist nicht bekannt. Die Regulation der Genexpression eines Gens durch das korrelierende Genprodukt wurde jedoch für verschiedene Gene beschrieben [232], wie zum Beispiel die D-Serin Dehydratase

[233]. In dem vorliegenden Fall müsste das veränderte DnaQ-Protein einen für das Bakterium negativen Effekt ausüben, sodass es vorteilhaft für das Bakterium ist, die Expression zu verringern. Der negative Effekt betrifft hier aber nicht die Hauptfunktion des Proteins, das *proofreading*, da kein Einfluss auf die Mutationsrate festgestellt werden konnte (vergleiche Kapitel 3.6). Die Expression von *dnaQ* kann auch vom Spiralisierungsgrad der DNA abhängig sein (siehe auch Kapitel 3.7) [140], ein möglicher direkter Einfluss des veränderten DnaQ-Proteins auf die DNA-Superspiralisierung ist allerdings nicht zu erklären.

Abbildung 3.32 zeigt zusätzlich, dass die Expression von *dnaQ* durch Novobiocin tendenziell erhöht wurde. Die Expressionserhöhung ist jedoch nicht so stark, dass definitive Aussagen abzuleiten wären, da die sich die Werte der doppelten Standardabweichung der Mittelwerte der einzelnen Messungen teilweise überlappen. Die Unterschiede liegen also im Bereich der der Methode inhärenten Schwankungsbreite der Ergebnisse. Tendenzen können aber aus den Ergebnissen abgeleitet werden. Novobiocin erniedrigt durch die Inhibierung der Gyraseaktivität den negativen Superspiralisierungsgrad der DNA [168, 171]. Dieser Einfluss auf den Spiralisierungsgrad ist abhängig von der Novobiocinkonzentration und die Verwendung einer höheren Novobiocinkonzentration hätte möglicherweise einen größeren Effekt gezeigt, da subinhibitorische Novobiocinkonzentrationen verwendet wurden. Dies gilt nur so lange, bis die maximale Inhibierung der Gyraseaktivität durch Novobiocin erreicht wurde. Eine weitere Erhöhung der Novobiocinkonzentration bleibt danach ohne zusätzlichen Einfluss auf die Gyraseaktivität und den Spiralisierungsgrad. Weitere Mechanismen, über die Novobiocin die *dnaQ*-Expression beeinflussen könnte, sind nicht bekannt, da zum Beispiel die SOS-Antwort nicht durch das Antibiotikum induziert wird [139]. Für andere Substanzen mit Einfluss auf den Spiralisierungsgrad, wie Coumermycin A [234], das ebenfalls zu den Aminocoumarinen gehört, konnte laut Literatur auch eine erhöhte *dnaQ*-Expression gezeigt werden [140]. Die Ergebnisse eignen sich jedoch nicht für einen Vergleich, da zum einen ein anderes Antibiotikum verwendet wurde und zum anderen ein anderes Messsystem verwendet wurde (Messung auf translationaler Ebene).

Ein statistisch signifikanter Unterschied der *dnaQ*-Expression wurde bei der Verwendung eines unterschiedlichen Stammhintergrunds (*E. coli* MII-3) beobachtet (siehe Abbildung 3.32). *E. coli* MII-3 ging aus dem Vergleichsstamm *E. coli* WT nach zwei Selektionsschritten und einer *in-vitro* Mutagenese von *gyrA* hervor und unterscheidet sich von diesem durch

zwei Punktmutationen in *gyrA* (Codons für Aminosäuren 83 und 87; S83L und D87G) und eine Deletion in *marR* (175 bp). Die Inhibierung der Gyraseaktivität durch die beiden Punktmutationen senkt den Spiralisierungsgrad deutlich (laut Literatur um 32% verglichen mit *E. coli* WT [100]; vergleiche auch Kapitel 3.8). Ein Einfluss der *marR*-Deletion auf den Spiralisierungsgrad ist zwar nicht aus der Funktion von MarR ableitbar, kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden. Der Stamm *E. coli* WT-3 mit den gleichen beiden *gyrA*-Mutationen aber ohne *marR*-Deletion zeigt einen kaum veränderten Spiralisierungsgrad [100]. Unabhängig von dem vorliegenden Allel und der Konzentration von Novobiocin, war die *dnaQ*-Expression in *E. coli* MII-3 circa dreifach erhöht gegenüber *E. coli* WT. QUIÑONES *et al* zeigten einen vergleichbaren Effekt des Spiralisierungsgrads [140]. Um den Einfluss des Spiralisierungsgrads auf die *dnaQ*-Expression näher zu untersuchen, wurden die beiden Werte im Anschluss für verschiedene Mutanten bestimmt. Dafür wurde ein modifiziertes, auf der qRT-PCR basierendes System verwendet, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen.

4.8 Bestimmung des relativen DNA-Spiralisierungsgrades

Der Spiralisierungsgrad der DNA ist ein wichtiger Faktor, der einen Einfluss auf die Expression einer Vielzahl von Genen hat [235, 236]. Der jeweils im Bakterium erforderliche Spiralisierungsgrad (zum Beispiel für die Replikation) wird in der Hauptsache durch die Funktion der Topoisomerase I und Topoisomerase II reguliert (vergleiche Kapitel 1.3.1). Mehrere Möglichkeiten zur Messung der relativen Superspiralisierung stehen zur Verfügung. Die Messung des Laufverhaltens der DNA in chloroquinhaltigen Gelen [171, 237], der Zusatz von Psoralenderivaten [238] oder die Verwendung von Reportergenkonstrukten [171] ermöglichen eine Bestimmung. Die verschiedenen Methoden werden im Folgenden kurz vorgestellt und es wird der Grund genannt, warum ein anderes System verwendet wurde.

Unterschiedliche DNA-Topoisomere zeigen in chloroquinhaltigen Agarose-Gelen ein unterschiedliches Laufverhalten bei der Elektrophorese, da sich die Mobilität im Gel je nach Topologie verändert. Die Messung des Laufverhaltens der DNA in chloroquinhaltigen Gelen ist methodisch sehr aufwändig und schwer zu quantifizieren [171, 237]. Dieses System eignet sich vor allem dazu, tendenzielle Unterschiede des Spiralisierungsgrads (höher oder niedriger als eine Referenz) zu erkennen. In dieser Arbeit sollte der Spiralisierungsgrad

möglichst genau quantifiziert werden und auch geringe Änderungen sollten erfasst werden. Diese Methode eignet sich somit nur bedingt für die hier zu beantwortende Fragestellung.

Bakterielle Zellen sind permeabel für Psoralenderivate. In der Zelle bindet Psoralen an DNA, RNA und Proteine. Die Bindung an superspiralisierte DNA ist höher als die Bindung an relaxierte DNA. Durch Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht wird gebundenes Psoralen visualisiert. Die Permeabilität verschiedener Bakterienstämme für Psoralen ist sehr variabel [238]. Für einen Vergleich der Superspiralisierung verschiedener Stämme, so wie es das Ziel des Versuchs in dieser Arbeit war, ist diese Methode somit nicht geeignet.

Ein plasmidcodiertes Reportergenkonstrukt, in dem jeweils einer der Promotoren von *topA* beziehungsweise *gyrA* mit dem Luciferasegen fusioniert war (ABUMRAHEIL *et al* [171]), basiert auf dem Phänomen der homöostatischen Kontrolle und diente als Ausgangspunkt für die Bestimmung der Superspiralisierung in dieser Arbeit (vergleiche Kapitel 3.8). Für diesen Luciferase-Assay muss jeder zu untersuchenden Stamm mit beiden Plasmide getrennt voneinander transformiert werden. Die so erhaltenen Zellen werden dann inkubiert, geerntet und lysiert. Gemessen wird anschließend die Lichtintensität bei 560 nm. Diese Methode wurde in dieser Arbeit nicht verwendet, da die Messung auf Translations-Ebene erfolgt. Da eine Korrelation mit der *dnaQ*-Expression, die mittels qRT-PCR auf Transkriptionsebene gemessen wurde, vorgesehen war, war eine Messung des Superspiralisierungsgrads ebenfalls auf Transkriptionsebene vorzuziehen.

Der relative Qsc-Wert als ein Maß für den Superspiralisierungsgrad konnte auf Transkriptionsebene durch die Bildung des Quotienten aus der Expression von *gyrA* und *topA*, gemessen mittels qRT-PCR, ermittelt werden. Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass mit dem selben RNA-Template sowohl die Messung des Superspiralisierungsgrads als auch der *dnaQ*-Expression erfolgen kann. Unterschiede bei der Vorbereitung der Proben und Durchführung der Experimente wurden dadurch vermieden. Ebenso konnte eine unterschiedliche Probenaufbereitung, wie es bei Verwendung des Luciferase-Assays zur Qsc-Bestimmung und der qRT-PCR zur Bestimmung der *dnaQ*-Expression der Fall gewesen wäre, keinen Einfluss auf die experimentellen Ergebnisse zeigen. Der Materialaufwand war dadurch ebenfalls reduziert. Die Validierung mit demselben Stammkollektiv, das für die Validierung des Luciferase-Assays verwendet wurde, zeigte die Eignung des qRT-Assays für diese Fragestellung (siehe Abbildung 3.33). Der Quotient der Expressionswerte erniedrigte

sich, wenn durch die partielle Inhibierung der Gyrasefunktion weniger negative Superspiralisierung eingeführt wurde (Stamm *E. coli* KD112: qRT-Assay 51%, Luciferase-Assay 85%; jeweils bezogen auf den Referenzstamm *E. coli* JTT1 mit 100%). Die Inhibierung der Funktion der Topoisomerase I durch eine Punktmutation im Strukturgen führte zu einer erhöhten negativen Superspiralisierung und ergab einen erhöhten Quotienten der Expressionswerte (Stamm *E. coli* RS2: qRT-Assay 131%, Luciferase-Assay 175%). Das qRT-System reagierte empfindlicher auf verminderte negative Superspiralisierung als der Luciferase-Assay.

Die Bestimmung des Qsc-Grads in dem in Tabelle 3.9 beschriebenen Stammkollektiv zeigte, dass Stämme, die Mutationen in *gyrA* aufweisen, einen niedrigeren Spiralisierungsgrad haben (vergleiche Abbildung 3.34) als der Referenzstamm *E. coli* WT ohne *gyrA*-Mutation. Für die mittlere logarithmische Wachstumsphase wurden die deutlichsten Unterschiede in den Qsc-Werten bestimmt. Die Verringerung der Qsc-Werte von *E. coli* MII und *E. coli* MIII im Vergleich zu *E. coli* WT war bei $OD_{600nm} \approx 0{,}6$ um durchschnittlich circa 40% stärker ausgeprägt als bei $OD_{600nm} \approx 0{,}4$. Die beobachtete Korrelation des Qsc-Grads mit der Wachstumsphase ist in der Literatur als Korrelation des Überspiralisierungsgrads mit der Wachtumsphase beschrieben worden [236]. Werte für Proben, die bei $OD_{600nm} \approx 0{,}8$ geerntet wurden, zeigen die höchsten im Versuch aufgetretenen Standardabweichungen. Bei dieser OD beginnt die Kultur in die stationäre Phase überzugehen (vergleiche Kapitel 3.3.5) und es werden unter anderem andere Sigma-Faktoren utilisiert. Sigma-Faktoren assoziieren mit der RNA-Polymerase und erhöhen durch ihre Affinität zur Pribnow-Box und der -35-Region von Promotoren, die Wahrscheinlichkeit einer Anlagerung des RNA-Polymerase-Holoenzyms an den Startpunkt der Transkription [239]. Um sich an verschiedene Umweltbedingungen anzupassen, können unterschiedliche Sigma-Faktoren vermehrt verwendet werden. Unter normalen Bedingungen überwiegt bei *E. coli* der Sigma-Faktor σ^{70} [240]. In der stationären Phase wird vermehrt Sigma-Faktor σ^{38} utilisiert, der für eine Anpassung an umweltbedingte Stresssituationen sorgt [241]. Diese Anpassung erfolgt dadurch, dass verschiedene Sigma-Faktoren unterschiedliche DNA-Erkennungssequenzen aufweisen und somit die Transkription unterschiedlicher Gene erhöhen oder erniedrigen. Die verhältnismäßig großen Schwankungen bei der Messung bei $OD_{600nm} \approx 0{,}8$ könnten unter anderem darauf zurückgeführt werden. Da sich die Bakterienzellen bei dieser OD am

Übergang zur stationären Phase befinden, könnte die Utilisation der verschiedenen Sigma-Faktoren bei einzelnen Messungen bei demselben Stamm unterschiedlich gewesen sein.

Die Qsc-Werte von *E. coli* MII (OD_{600nm} ≈ 0,2: 0,74; OD_{600nm} ≈ 0,4: 0,84; OD_{600nm} ≈ 0,6: 0,53) und *E. coli* MIII (OD_{600nm} ≈ 0,2: 0,61; OD_{600nm} ≈ 0,4: 0,9; OD_{600nm} ≈ 0,6: 0,38) sind relativ ähnlich mit tendenziell niedrigeren Werten bei *E. coli* MIII. Bestimmungen mit einem Reportergenkonstrukt (BAGEL *et al*, vergleichbar mit ABUMRAHEIL *et al* bis auf die Verwendung einer β-Lactamase als Reporter [102]) zeigten bei der OD_{546nm} ≈ 0,5 einen Unterschied im Qsc-Wert zwischen beiden Stämme von 23% und entsprechen dem hier bei der OD_{600nm} ≈ 0,6 ermittelten Unterschied von 15%. *E. coli* MIII weist in Bezug auf *E. coli* MII jeweils eine zusätzliche Mutation in den QRDRs von *gyrA* und *parC* auf. Aus Abbildung 3.34 geht hervor, dass trotz der vermuteten gegensätzlichen Einflüsse der *gyrA*- und *parC*-Mutationen auf den Qsc-Wert, die Mutation in *gyrA* einen deutlicheren Effekt auf den Qsc-Wert zeigt. Die Vermutung, dass *gyrA*- und *parC*-Mutationen einen unterschiedlichen Effekt auf den Qsc-Wert zeigen, beruht auf deren teilweise gegensätzlicher enzymatischer Aktivität (Überspiralisierung versus Relaxierung). Physiologisch befindet sich die DNA bei *Eubacteria* in einem negativ superspiralisierten Zustand [235] (homöostatische Kontrolle, siehe Kapitel 1.3). Eine Beteiligung der *marR*-Deletion an der Änderung des Spiralisierungsgrad wird diskutiert [100] (siehe auch Kapitel 4.7). Alle untersuchten Stämme, mit der Ausnahme von *E. coli* WT, weisen eine *marR*-Deletion auf und die ermittelten Unterschiede können nicht darauf zurückgeführt werden.

Der niedrigste Qsc-Wert wurde in *E. coli* MII-3 bestimmt. Der Stamm ging aus *E. coli* MII durch *in vitro* Mutagenese (vergleiche Tabelle Tabelle 2.1) hervor und zeigt eine starke Beeinträchtigungen des Wachstums. Die Reduktion auf ein Viertel des Qsc-Wertes von *E. coli* WT ist vergleichbar mit der von BAGEL *et al* [100] ermittelten Reduktion um 68%.

Der Qsc-Wert von *E. coli* MII-4 ist nicht durch die vorliegenden Topoisomerase-Mutationen zu erklären. Der Stamm weist im Vergleich mit *E. coli* MII nur eine zusätzliche Mutation in *parC* (Codon für Aminosäure 80, S80I) auf und zeigt einen um weitere 31% reduzierten Qsc-Wert. Von einer *parC*-Mutation, die die Aktivität der Topoisomerase IV erniedrigt, wäre eine Reduktion des Qsc-Werts nicht zu erwarten.

Die Standardabweichungen der Mittelwerte (maximal ± 30% bei allen Messwerten zwischen OD_{600nm} ≈ 0,2 und OD_{600nm} ≈ 0,6) waren für diese Methode relativ niedrig (siehe Abbildung 3.34). Durch Korrelation der Expressionswerte von *gyrA* mit den Werten von *topA* innerhalb derselben Probe, war die Verwendung eines Referenzgens nicht nötig. Da dieselbe RNA-Probe für beide Ansätze (*gyrA* und *topA*) verwendet wurde, ist davon auszugehen, dass keine Unterschiede bei der Zellernte, RNA-Isolierung oder Konzentrationsbestimmung vorliegen. Um die ermittelten Qsc-Werte mit der *dnaQ*-Expression zu korrelieren, wurde im Anschluss an diesen Versuch die Expression von *dnaQ* mittels qRT-PCR bestimmt.

4.9 Quantitative Bestimmung der *dnaQ*-Expression

Die Expression von *dnaQ* in verschiedenen Stämmen (vergleiche Tabelle 3.9) konnte mittels qRT-PCR in Abhängigkeit der Wachstumsphase ermittelt werden. Ein Referenzgen konnte für die Versuche nicht benutzt werden. Da in diesem Versuch Stämme mit unterschiedlichen Charakteristika (Mutator und Nicht-Mutator, unterschiedliche Topoisomerase-Mutationen) unter verschiedenen Bedingungen (Wachstumsphasen) verwendet wurden, konnte kein Referenzgen identifiziert werden, dass in allen Experimenten eine konstante Expression aufwies. Dies ist eine Voraussetzung für ein Referenzgen, da dadurch mögliche Unterschiede bei der Aufarbeitung (Zellernte, RNA-Isolierung, Konzentrationsbestimmung der RNA, cDNA-Synthese) der Probe identifiziert werden sollen. Die Normierung der einzelnen Proben erfolgte stattdessen in Bezug auf die Gesamt-RNA, deren Konzentration mittels Bioanalyzer® bestimmt wurde. Die damit erhaltenen Konzentrationswerte wurden mit Ergebnissen verglichen, die mittels Qubit® gemessen wurden. Der Korrelationskoeffizient beim Vergleich der beiden Methoden war mit r^2 = 0,98 sehr hoch. Dennoch war die Standardabweichung der Mittelwerte in diesem Experiment relativ hoch (bis zu ± 70%, vergleiche Abbildung 3.36) und wird im Folgenden diskutiert.

Viele Faktoren im Laufe der einzelnen experimentellen Teilschritte nehmen Einfluss auf das Endergebnis. Die wiederholte Zellernte erfolgte zu vergleichbaren Wachstumsphasen, ermittelt als optische Dichte (OD), doch korreliert die OD nicht zwingend mit der tatsächlichen Lebendkeimzahl (vergleiche auch Kapitel 3.3.5). Unterschiedliche Stämme können sich auch bei gleicher OD oder KBE/mL in anderen Wachstumsphasen befinden, was die Vergleichbarkeit weiter einschränkt. Der Verzicht auf ein Referenzgen ist zwar laut Literatur vorteilhaft [242], doch können selbst bei Konzentrationsmessung der RNA mit

interkalierenden Farbstoffen nicht alle Charakteristika erfasst werden. Der Anteil und die Qualität der für die Messung relevanten mRNA an allen vorliegenden RNA-Spezies könnten variieren. Die Verwendung eines Referenzgens könnte diesen spezifischen Fehler minimieren. Eine weitere Annahme ist, dass die Umsetzung der mRNA zu cDNA während der reversen Transkription quantitativ erfolgt. Publikationen zeigen, dass diese Annahme bei Verwendung modifizierter Transkriptaseenzyme vertretbar ist [243]. Es konnte zudem durch Verdünnungsreihen gezeigt werden, dass die DNA in jedem PCR-Zyklus im Messzeitraum verdoppelt wurde. Ein Unterschied von 1 beim C_T-Wert war demnach gleichbedeutend mit einer Reduktion oder Erhöhung der Expression um den Faktor zwei [244]. Treten keine signifikanten Änderungen der C_T-Werte der zu Testzwecken verwendeten Referenzgene auf [245, 246], waren die damit erhaltenen Ergebnisse mit denen der hier verwendeten Auswertemethode vergleichbar. Der Bezug zwischen verschiedenen Messungen wurde hier durch das Mitführen einer bekannten Probe im neuen Ansatz hergestellt. Die Schwankung zwischen diesen C_T-Werten der verschiedenen Proben betrug durchschnittlich nur ± 4 %.

Der Wertebereich der Mittelwerte plusminus der Standardabweichung beinhaltete bei nahezu allen Messungen den Wert des Referenzstamms *E. coli* WT (festgelegt auf 1). Die Unterschiede im Vergleich zum Referenzstamm sind somit nicht signifikant. Signifikant nach dieser Definition sind die Befunde, dass *dnaQ* in *E. coli* MIIQ höher exprimiert (1,6- bis 2,2-fach) wird als in *E. coli* WT und in seinem Ausgangsstamm *E. coli* MII (vergleiche Kapitel 3.2). DnaQ von *E. coli* MIIQ ist funktionell stark beeinträchtigt, zeigt aber noch eine Restaktivität. Dies wurde in der Literatur unter Verwendung desselben *dnaQ*-Allels (*mutD*5) gezeigt [143]. Die erhöhte Expression könnte einen Einfluss auf die Mutationsrate zeigen [140] und zu einem Wert unterhalb des postulierten Schwellenwerts der *error catastrophe* beitragen (siehe Kapitel 1.2) [143]. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression eines anderen *dnaQ*-Allels (*dnaQ*49) die Mutationsrate auf Nichtmutator-Niveau senkt [140]. *E. coli* MII-4 zeigte ebenfalls eine höhere *dnaQ*-Expression (2,4-fach) als *E. coli* WT und auch *E. coli* MII. Zusätzliche Mutationen in *E. coli* MII-4, die diesen Befund erklären könnten, sind nicht bekannt. Ein Einfluss der durch *in vitro* Mutagenese eingeführten *parC*-Mutation (siehe Tabelle 2.1) ist nicht offensichtlich. Tendenziell lag die *dnaQ*-Expression von *E. coli* MIII zwischen der von *E. coli* MII und von *E. coli* MIIQ und die Werte waren generell nach Zellernte bei $OD_{600nm} \approx 0{,}4$ am niedrigsten. Im Vergleich zu den C_T-Werten aus Kapitel 3.7 lagen die Werte in dieser Bestimmung um circa 20% höher. In Kapitel 3.7 lag *dnaQ* zusätzlich

zum Chromosom plasmidcodiert auf pBR322 vor. Erwartungsgemäß war die Menge an *dnaQ*-mRNA dadurch erhöht. Die Expression von *dnaQ* ist nach diesen Ergebnissen auf transkriptionaler Ebene relativ konstant.

Die Gegenüberstellung der Qsc-Werte und der *dnaQ*-Expression offenbarte keine erkennbare Korrelation der beiden Werte (siehe Abbildung 3.37 bis Abbildung 3.40). Beispielsweise steigt die *dnaQ*-Expression von *E. coli* MIIQ von $OD_{600nm} \approx 0,2$ zu $OD_{600nm} \approx 0,4$ um 20%, während der Qsc-Wert derselben Proben um 28% sinkt. Wenn nur die Richtung der Änderung (sowohl des Qsc-Werts als auch der *dnaQ*-Expression) betrachtet wird, scheinen die gegenübergestellten Werte aller Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase (zwischen $OD_{600nm} \approx 0,4$ zu $OD_{600nm} \approx 0,6$) zu korrelieren. Dies wird aber nicht durch die Gegenüberstellung des Qsc-Werts und der *dnaQ*-Expression bei den unterschiedlichen Stämmen in der logarithmischen Wachstumsphase unterstützt (Abbildung 3.40). So zeigt *E. coli* MII-3 den niedrigsten Qsc-Wert (0,25) des untersuchten Kollektivs, doch nicht die niedrigste oder höchste *dnaQ*-Expression (1,4-fache Erhöhung).

4.10 Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen möglichen Einfluss von Mutationen in *dnaQ* oder Veränderungen der *dnaQ*-Expression auf die Entstehung von Fluorchinolonresistenz bei *E. coli* zu untersuchen. Der Fokus dabei lag auf dem Schritt von moderater zu hochgradiger Fluorchinolonresistenz, dem eine Doppelmutation zugrunde liegt. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigten neue Fragestellungen auf, die in nachfolgenden Arbeiten untersucht werden sollten.

Das Screening auf Mutationen im Strukturgen von *dnaQ* und stromaufwärts davon zeigte bereits in einem kleinen Kollektiv viele Variationen in der DNA-Sequenz. Eine Ausweitung auf ein größeres Kollektiv (fluorchinolonresistente klinische Isolate aus unterschiedlichen Habitaten und unterschiedlichen Regionen) könnte weitere Mutationen aufzeigen, die die Mutationsrate direkt beeinflussen oder ähnliche Auswirkungen auf die Expression von *dnaQ* zeigen könnten wie die Mutation 23 bp vor dem Genstart von *dnaQ*.

Diese Mutation könnte zudem in Kombination mit der Strukturgenmutation von *E. coli* Eo100 (im Codon für Aminosäure 136, K136R) oder alleine, chromosomal eingeführt werden. Durch einen isogenen Stammhintergrund könnten die ermittelten Veränderungen definitiv

auf die *dnaQ*-Mutationen zurückgeführt werden. Zudem könnte der Anteil der Strukturgenmutation an der Veränderung der *dnaQ*-Expression bestimmt werden oder gegebenenfalls ein Einfluss dieser Mutation auf die *dnaQ*-Expression ausgeschlossen werden. Es wurde gezeigt, dass die dnaQ-Expression von *E. coli* Eo320, der nur die Mutation stromaufwärts von *dnaQ*, nicht aber im Strukturgen in Codon 136 aufweist, weniger stark reduziert ist als bei *E. coli* Eo100.

Methodisch bietet sich für die Einführung chromosomaler Mutationen das in dieser Arbeit verwendete *Gene Doctoring* an, dass ebenso für die Generierung eines *dnaQ*-Knockoutstammes geeignet wäre. Voraussetzung dafür ist, dass eine Mutation in *dnaE* gefunden und mit derselben Methode eingeführt wird, die den Knockout-Stamm lebensfähig macht. *dnaE*-Mutationen die dafür in Frage kommen könnten, sind in der Literatur beschrieben [140, 247]. In einem *dnaQ*-knockout Stamm könnten die Einflüsse der gefundenen Strukturgenmutationen auf die Mutationsrate besser untersucht werden, da keine Dominanz des potentiellen Mutatorallels mehr notwendig wäre, um Veränderungen bei der Mutationsrate festzustellen. Die beschriebenen Mutationen in *dnaE* kompensierten eine durch eine *dnaQ*-Mutation erhöhte Mutationsrate und erhöhten parallel die Fitness des Stammes. Eine Mutation durch die die Fitness (gemessen als Generationszeit) eines *dnaQ*-Mutators auf dem Niveau eines Nicht-Mutators (*E. coli* MII) liegt, ohne dass die Mutationsrate des Mutatorstammes reduziert ist, könnte in *E. coli* MIIQ vorliegen. Dies wurde bislang noch nicht beschrieben und könnte durch eine Sequenzierung von *dnaE* von *E. coli* MIIQ und eine anschließende Charakterisierung untersucht werden.

Ausgehend von *E. coli* MIIQ wurde in dieser Arbeit zudem *E. coli* MIIQ-CS45 selektiert, dessen Fluorchinolonresistenz nicht mit Mutationen in den Zielstrukturen erklärt werden kann. Eine Sequenzierung des kompletten Genoms wäre für diesen Stamm eine vielversprechende Option und könnte zusätzlich mit der Bestimmung der Expression von verschiedenen globalen Transkriptionsaktivatoren (vergleiche *marA*) kombiniert werden.

Weiterhin bietet sich an, die Reportergen-Expression auch auf translationaler Ebene, zum Beispiel als Reportergenkonstrukt mit GFP (*green fluorescent proteine*), durchzuführen. Um die möglicherweise nur transient auftretenden Unterschiede in der Expression damit feststellen zu können, müsste ein GFP-Derivat mit deutlich verkürzter Halbwertszeit

verwendet werden. Es ist möglich, dass der Einfluss des Superspiralisierungsgrads auf die DnaQ-Aktivität und die Mutationsrate nur auf die Proteinebene beschränkt ist.

Dieser Versuch und die verschiedenen Untersuchungen der Mutationsrate könnten in Stämmen mit einem zusätzlichen Defekt im *methyl directed mismatch repair* System wiederholt werden. Der Anteil der durch die partielle DnaQ-Defizienz bedingten Fehler, die von diesem Korrektursystem anschließend behoben wurde, könnte dadurch isoliert betrachtet werden.

Werden die aufgeführten Experimente durchgeführt, würde dies das Verständnis der Entwicklung von Fluorchinolonresistenz und insbesondere der Beteiligung von Mutatormutationen daran, erweitern. Die Erforschung der Resistenzentwicklung auf molekularer Ebene ist wichtig um wirksame Gegenmaßnahmen zu entwickeln und der Problematik der global fortschreitenden Resistenzverbreitung entgegenzuwirken.

5. Zusammenfassung

Die Entwicklung von Resistenz gegenüber Fluorchinolonen bei *E. coli* ist ein schrittweiser Prozess. Dieser ist durch die Akkumulierung von Mutationen in den Zielstrukturen der Fluorchinolone und Mutationen, die den Efflux erhöhen, charakterisiert. Ein Schritt in diesem Prozess ist häufig durch eine parallele Mutation in zwei Zielstrukturen gekennzeichnet. Durch die physiologischerweise vorliegende, niedrige Mutationsrate von *E. coli* ist dies jedoch äußerst unwahrscheinlich.

In dieser Arbeit wurde ein möglicher Mechanismus zur Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Doppelmutation untersucht: Die Erhöhung der Mutationsrate durch vermindertes, von DnaQ vermitteltes, *proofreading*. Dazu wurden zunächst erfolgreich zwei Punktmutationen *in vitro* in das Chromosom von *E. coli* eingefügt werden, die die Fähigkeit des Bakteriums zum *proofreading* stark beeinträchtigen, wodurch ein Mutatorstamm generiert wurde. Die gewählte Methode, das *Gene Doctoring*, hinterlässt keine chromosomalen Narbensequenzen. Das erhaltene Stammpaar ist daher soweit bekannt bis auf die Veränderungen in *dnaQ* vergleichbar und stellt eine gute Korrelierbarkeit der damit erhaltenen Ergebnisse sicher. Ein Selektionsversuch mit hohen Konzentrationen an Ciprofloxacin mit dem so modifizierten Stamm und seinem Ausgangsstamm zeigt, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Doppelmutationen bei einem DnaQ-Defekt um mehr als zwei Zehnerpotenzen erhöht ist. Die erhaltenen, hochresistenten Mutanten weisen aus klinischen Isolaten bekannte Mutationsmuster in den Zielstrukturen der Fluorchinolone auf. Alle bis auf einen dieser Stämme weisen im Vergleich zu dem Ausgangsstamm des Selektionsversuchs zwei zusätzliche Resistenzmutationen auf. Die Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin ist genauso groß oder sogar größer als bei hinsichtlich ihrer Fluorchinolon-Resistenzmutationen vergleichbaren klinischen Isolaten.

Der Selektionsversuch zeigte, dass eine verringerte Aktivität von DnaQ zu der Entwicklung von Fluorchinolonresistenz beitragen kann, weshalb im Anschluss fluorchinolonresistente klinische Isolate hinsichtlich Veränderungen des *dnaQ*-Strukturgens untersucht wurden. Dabei wurden zahlreiche Variationen der DNA-Sequenz festgestellt, deren Auswirkungen auf die Mutationsrate charakterisiert wurden. Das für die Charakterisierung hergestellte Testsystem bestand aus plasmidcodierten *dnaQ*-Allelen von verschiedenen Stämmen mit

Variationen in der *dnaQ*-Sequenz. Die Bestimmung der Mutationsrate im identischen Stammhintergrund stellte eine hohe Korrelierbarkeit der Ergebnisse sicher. Die verschiedenen untersuchten *dnaQ*-Allele bewirkten keine signifikant erhöhten Mutationsraten im Testsystem in Gegenwart des Wildtypallels. In dem untersuchten Kollektiv lagen folglich keine dominanten *dnaQ*-Mutatorallele vor.

Die Untersuchung der *dnaQ*-Sequenz in klinischen Isolaten zeigte zudem eine bisher unbeschriebene Mutation 23 Basenpaare stromaufwärts des *dnaQ*-Strukturgens. Ein Stamm der diese Mutation in Kombination mit einer *dnaQ*-Strukturgenmutation aufweist, zeigt eine deutlich reduzierte *dnaQ*-Expression. Plasmidcodiert bewirkte dieses *dnaQ*-Allel keine Erhöhung der Mutationsrate, doch weisen die Ursprungsstämme dieser Allele selbst leicht erhöhte Mutationsraten auf.

Des Weiteren wurde ein Testsystem erfolgreich etabliert, mit dem die relative DNA-Superspiralisierung bestimmt werden kann; ein Faktor dessen Einfluss auf die *dnaQ*-Expression bekannt ist. In einem qRT-PCR-Assay wurden der Superspiralisierungsgrad und die *dnaQ*-Expression ausgehend von derselben RNA-Probe bestimmt. Dies erfolgte in Stämmen, deren Superspiralisierungsgrad durch verschiedene Fluorchinolonresistenzmutationen verändert ist. Die Bestimmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Wachstums zeigte jedoch keine direkte Korrelation auf transkriptionaler Ebene zwischen den beiden Messgrößen auf.

6. Summary

Research on the development of chromosomally encoded resistance revealed a step-wise process, often including a simultaneous (double) mutation at two positions of both spatially unrelated target genes. Several mechanisms regulate bacterial mutation rates, keeping it generally very low. A randomly occurring mutation at two positions therefore does not seem very plausible.

In this work, a possible mechanism leading to an increased probability of double mutations was investigated: An increase in mutation rates caused by deficiency in *dnaQ*-mediated proofreading, potentially due to alerations in the global DNA supercoiling degree as a consequence of the accumulation of two topoisomerase mutations. We investigated this hypothesis using site-directed mutagenesis. Two point-mutations were successfully integrated into the *dnaQ* gene in the *E. coli* chromosome, decreasing proofreading proficiency significantly and thereby creating a mutator strain. The applied method leaves no scars in the DNA sequence, thereby yielding a pair of isogenic strains differing only in *dnaQ* sequence. Both strains were characterized in a selection experiment with high concentrations of ciprofloxacin. The alterations in *dnaQ* led to a several hundred-fold increase in double mutations. The patterns of resistance mutations in the mutants were comparable to those of characterized fluoroquinolone-resistant clinical isolates. All but one of the generated strains showed two additional resistance mutations in comparison to the parent strain. The mutants received in the experiment demonstrated a reduction in fluoroquinolone susceptibility comparable or even higher than that of clinical isolates with similar patterns of resistance mutations.

The experimental data provided evidence for a DnaQ-deficiency as a possible contributor to the resistance development. Consequently, screening for variations in the *dnaQ* sequence of fluoroquinolone-resistant clinical isolates was performed. Several mutations were identified, whose effect on the mutation rate was investigated in a readily comparable assay. This assay consisted of plasmid-borne *dnaQ* alleles from several *E. coli* strains with variations in *dnaQ* sequence. The determination of mutation rates in a genetically identical strain background provided for a high correlation. In the experiment, the different plasmid-borne alleles showed no influence on the mutation rate with the wildtype *dnaQ* allele present.

Sequencing furthermore revealed a previously unknown mutation 23 base pairs upstream of *dnaQ*. In combination with a mutation in the structural gene, this mutation led to a drastic decrease in *dnaQ*-expression. This specific allele encoded on a plasmid did not lead to an increased mutation rate, but the strain itself displayed a moderately higher rate.

Furthermore, a test system was successfully established to measure DNA supercoiling, a factor known to influence *dnaQ*-expression. DNA-supercoiling was measured in parallel with *dnaQ*-expression in a qRT-PCR assay. Measurements were performed in strains with altered supercoiling due to fluoroquinolone resistance mutations. Thus, the possibility of fluoroquinolone resistance mutations favoring the emergence of additional mutations was investigated. The results indicated no direct correlation of DNA-supercoiling and *dnaQ*-expression at a transcriptional level.

7. Anhänge

7.1 Gefahrstoffverzeichnis

In Tabelle 7.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten KMR-Substanzen der Kategorien I und II aufgelistet.

Tabelle 7.1: Liste der verwendeten KMR-Substanzen

Cas-Nr.	IUPAC-Bezeichnung	Verwendung & Menge	Kategorie
67-66-3	Trichlormethan (Chloroform)	Phenol-Chloroform-Extraktion; Menge ca. 480 µL	Karzinogen; Kategorie 2; H351
1239-45-8	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium-bromid (Ethidiumbromid)	Agarose-Gelelektrophorese; Menge höchstens 4 µL einer 1 %-igen Lösung	Keimzellmutagen; Kategorie 2; H341
75-12-7	Formamid	Sequenzierung; Menge 30 µL	Reproduktionstoxisch; Kategorie 1B; H360D
108-95-2	Benzenol (Phenol)	Phenol-Chloroform-Extraktion; Menge ca. 500 µL	Keimzellmutagen; Kategorie 2; H341

In Tabelle 7.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Gefahrstoffe aufgelistet.

Tabelle 7.2: Liste der verwendeten Gefahrstoffe

Gefahrstoff	GHS-Kennzeichnung	H-Sätze	P-Sätze
2-Mercaptoethanol		301-310-330-315-318-410	280-273-302+352-304+340-305+351+338-309-310
Ammoniumchlorid		302-319	305+351+338
Calciumchlorid-Dihydrat		319	305+351+338
Chloroform		302-315-351-373	302+352-314
Citronensäure-Monohydrat		318	305+351+338-311
EDTA		319	305+351+338

Gefahrstoff	GHS-Kennzeichnung	H-Sätze	P-Sätze
Essigsäure		226-314	280-301+330+331-307+310-305+351+338
Ethanol		225	210
Ethidiumbromid		341-330-302	281-302+352-305+351+338-304+340-309-310
Formamid		360D	201-308+313
Isoamylalkohol		226-332-335; EUH066	305+351+338
Isopropanol		225-319-336	210-233-305+351+338
Kaliumhydroxid		302-314	280-301+330+331-305+351+338-309-310
Methanol		225-331-311-301-370	210-233-280-302+352
MOPS		315-319-335	261-305+351+338
Natriumdodecylsulfat		302-312-315-319-335	210-280-304+340-305+351+338-309+310
Natriumhydroxid		314	280-301+330+331-309-310-305+351+338
Natriumsalicylat		302-319	260-305+351+338
Nickelsulfat		350-341-360-372-332-302-315-334-317-410	201-280-273-308+313-342+311-302+352
Phenol		341-331-311-301-373-314	280-302+352-301+330+331-309-310-305+351+338
Phosphorsäure		314	280-301+330+331-305+351+338-309+310

Gefahrstoff	GHS-Kennzeichnung	H-Sätze	P-Sätze
Salzsäure		314-335	260-301+330+331-303+361+353-305+351+338-405-501
sec-Butanol		226-319-335-336	210-304+340-305+351+338
Tris		315-319-335	261-280-305+351+338-321-405-501
Xylencyanol		315-319-335	261-305+351+338

7.2 Abkürzungsverzeichnis

In Tabelle 7.3 sind alle verwendeten Abkürzungen verzeichnet.

Tabelle 7.3: Liste der verwendeten Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
®	*registered*
µ	mikro (10^{-6})
A	Ampere/Adenin
AAC	Aminoacyltransferase
Abb.	Abbildung
ad	lateinisch auf
Amp^R	Ampicillinresistenz
ARMS	*amplification refractory mutation system*
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B. subtilis	*Bacillus subtilis*
bp	Basenpaare/*base pairs*
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy
cDNA	*complimentary/copy DNA*
CFU	*colony forming units*
Cip	Ciprofloxacin
Clm	Chloramphenicol
Clm^R	Chloramphenicolresistenz
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
C_T	*cycle threshhold*
Da	Dalton

Abkürzung	Bedeutung
ddNTP	2’,3’-Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH_2O	Reinstwasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*desoxyribonucleic acid*
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	*double stranded DNA*
E. coli	*Escherichia coli*
EB	*elution buffer*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPI	Effluxpumpeninhibitor
et al.	lateinisch et alia (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
F	Farad
FRT	*flippase recognition target*
fw	forward
g	Gramm/Gravitationskonstante
G	Guanin
GFP	*green fluorescent protein*
ggf.	gegebenenfalls
GK	Glycerinkulturnummer
GSP	Gen-spezifischer Primer
GTE-Puffer	Glucose-Tris-EDTA-Puffer
h	Stunde
HTH	*helix-turn-helix*
inkl.	inklusive
k	kilo (10^3)
Kan^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare
KBE	koloniebildende Einheiten
L	Liter
LB	Luria-Bertani
m	milli (10^{-3})
M	Molar (mol/L)
mar	*multiple antibiotic resistance*
MDR	*muliple drug resistance*
MFS	*major facilitator superfamily*
MHB	Müller-Hinton Bouillon
MHK	minimale Hemmkonzentration
MIC	*minimum inhibitory concentration*
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	*messenger RNA*
MTP	Mikrotiterplatte
n	nano (10^{-9})

Abkürzung	Bedeutung
N-	Amino
n.b.	nicht bestimmt
n.d.	*not determined*
NAC	*no amplification control*
Novo	Novobiocin
NTC	*no template control*
OD	optische Dichte
ORF	*open reading frame*
ori	origin of replication
p	pico (10^{-12})
PA*β*N	Phenylalanyl-arginyl-β-naphthylamid
PCR	*polymerase chain reaction*
pH	lateinisch potentia hydrogeni
QRDR	*quinolone resistance determining region*
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR
Qsc	*quotient of supercoiling*
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
Rif^R	Rifampicinresistenz
RNA	*ribonucleic acid*
RND	resistance nodulation cell division
rpm	*rounds/revelation/rotations per minute*
RT	Raumtemperatur
rv	reverse
s	Sekunde
SDS	*sodium dodecyl sulfate*
SOEing	*splicing by overlap extension*
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tet	Tetracyclin
Tet^R	Tetracyclinresistenz
TFB	*transformation buffer*
T_M	Schmelztemperatur
Topo	Topoisomerase
™	*trademark*
u	*units*
U	Uracil
ÜNK	Übernachtkultur
ÜTK	Übertagkultur
UV	Ultraviolett
V	Volt
WHO	World Health Organisation

Abkürzung	Bedeutung
z.B.	zum Beispiel
Δ	Deletion/Differenz
Ω	Ohm

In Tabelle 7.4 sind die proteinogenen Aminosäuren mit den dazugehörigen Abkürzungen aufgelistet.

Tabelle 7.4: Liste der Aminosäuren mit Abkürzungen

Aminosäuren	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

7.3 Gene

Die in dieser Arbeit benannten Gene und die jeweiligen dazugehörigen Proteine sind in Tabelle 7.5 aufgeführt.

Tabelle 7.5: Liste der Genbezeichnungen

Gen	Protein
aac	Aminoglykosidacetyltransferasen
acrA	periplasmatisches Adapterprotein AcrA der AcrAB-TolC Effluxpumpe
acrB	Pumpenprotein AcrB der AcrAB-TolC Effluxpumpe

Gen	Protein
acrR	lokaler Repressor AcrR von *acrAB*
cysG	Sirohäm-Synthase
dnaE	Alpha-Untereinheit der Polymerase III
dnaQ/mutD	Epsilon-Untereinheit der Polymerase III
gyrA	A-Untereinheit der Gyrase
gyrB	B-Untereinheit der Gyrase
holE	Theta-Untereinheit der Polymerase III
lexA	Repressor der SOS-Antwort LexA
marA	globaler Transkriptionsfaktor MarA
marR	Repressor des mar Operons MarR
mdoG	Protein G der Glucan-Biosynthese
mutH	DNA *mismatch repair* Protein MutH
mutL	DNA *mismatch repair* Protein MutL
mutS	DNA *mismatch repair* Protein MutS
mutT	Nucleosidtriphosphatase MutT
mutY	Adenin DNA-Glykosylase
ompF	*outer membrane protein* F
oqx	Eflluxpumpe QepA
parC	A-Untereinheit der Topo IV
parE	B-Untereinheit der Topo IV
qepA	Eflluxpumpe QepA
qnr	Gyrase-Schutzproteine
recA	Recombinase A mit Protease- und Nukleaseaktivität
soxR	Repressor von *soxS*
soxS	globaler Transkriptionsfaktor SoxS
tolC	Porin TolC in der äußeren Membran
topA	A-Untereinheit der Topo I
umuC	Untereinheit C der Polymerase V
umuD	Untereinheit D der Polymerase V
uvrC	Endonulease-Untereinheit der Excinuklease UvrABC
uvrD	DNA-abhängige Helikase II
yegV	putative Zuckerkinase
yhcM	putatives Protein mit NTP-Hydrolase Domäne

7.4 Publikationen

M. Petschulies, A. Heisig, P. Heisig „Mutator *dnaQ* Favors the Accumulation of a Double Mutation in an *E.coli gyrA* Mutant in One Step to Yield High-Level Fluoroquinolone Resistance", **2012**, 52nd ICAAC, San Francisco, USA (Poster).

M. Petschulies, A. Heisig, P. Heisig „The Role of *dnaQ* in the Development of High-Level Fluoroquinolone Resistance", **2012**, 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Hamburg, Deutschland (Poster).

7.5 Lebenslauf

Marco Petschulies
Geboren am 20.11.1982 in Aalen

Seit 10/2013	Referent in der Abteilung Arzneimittel des Gemeinsamen Bundesausschuss (Berlin)
10/2009 – 03/2013	Promotion an der Universität Hamburg in der Abteilung pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Peter Heisig über den Einfluss von *dnaQ* auf die Entwicklung von Fluorchinolonresistenz
07/2009 – 05/2013	Nebentätigkeit als Apotheker in der Vitalhus Apotheke Norderstedt (Schleswig-Holstein)
04/2008 - 03/2009	Praktisches Jahr in der Apotheke am Langenhorner Markt (Hamburg) *Abschluss: Drittes Staatsexamen Pharmazie*
04/2006 - 03/2008	Hauptstudium der Pharmazie, Universität Hamburg (Hamburg) *Abschluss: Zweites Staatsexamen Pharmazie* *Wahlpflichtpraktikum im Bereich der pharmazeutischen Technologie*
10/2003 - 02/2006	Grundstudium der Pharmazie, Eberhard Karls Universität Tübingen (Baden-Württemberg)

	Abschluss: Erstes Staatsexamen Pharmazie
	Famulatur in der Limes Apotheke Wasseralfingen
11/2002 – 08/2003	Zivildienst im Ostalbklinikum Aalen (Baden-Württemberg)
Bis 06/2002	Kopernikus-Gymnasium Wasseralfingen (Baden-Württemberg)
	Abschluss: Abitur
	Leistungskurse: Englisch und Bildende Kunst

7.6 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Heisig für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können. Ferner bedanke ich mich für die freundliche und konstruktive Atmosphäre und die anhaltende fachliche Unterstützung und Motivation. Vielen Dank auch für die Chance, die ICAAC in San Francisco zu besuchen, wofür ich auch der Niemann-Stiftung zu Dank verpflichtet bin.

Herrn Prof. Dr. Hahn danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Meinen Prüfern bei meiner Disputation, Herrn Prof. Dr. Bisping und Frau Dr. Paschke-Kratzin, danke ich ebenso.

Bei Frau Dr. Heisig möchte ich mich für ihre engagierte Mitbetreuung und die zahlreichen praktischen Hilfestellungen und Denkanstöße bedanken, sowie für die Hilfe bei den Sequenzierungen.

Bei Antje Schnasse, Tatjana Claussen und Gudrun Melles bedanke ich mich für die Hilfe bei der Sequenzierung und bei der Betreuung der Praktika. Sabine Badziong danke ich für die Unterstützung bei allen verwaltungstechnischen und organisatorischen Angelegenheiten. Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die sehr freundliche, kollegiale Zusammenarbeit, die vielen konstruktiven Gespräche und die angenehme Atmosphäre, die ich in bester Erinnerung behalten werde.

Für die große Hilfe bei der Abgabe meiner Dissertation und der Organisation der Disputation danke ich Katja Carstens und Janina Wenk ganz herzlich.

Hans-Peter Sfeir, Saskia Scheel und Marion Gerecht danke ich für die Übernahme des Lektorats für diese Arbeit. Bei allen Freunden und Verwandten, die mir dabei halfen alle

Höhen und Tiefen der Promotion zu überstehen, möchte ich mich ebenfalls bedanken. Für die Unterstützung und stete Motivation möchte ich mich bei Saskia Scheel bedanken. Überhaupt erst möglich wurde mein Werdegang durch die ununterbrochene Unterstützung meiner Eltern in jeder Hinsicht und zu jeder Zeit. Dafür gilt ihnen mein ganz besonderer Dank.

7.7 Eidesstattliche Versicherung

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.

Potsdam, 19. Oktober 2014 …….

Marco Petschulies

7.8 Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Marco Petschulies, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Potsdam, 19. Oktober 2014 …….

Marco Petschulies

8. Literaturverzeichnis

1 Tenover, F C, und J E McGowan Jr. „Reasons for the Emergence of Antibiotic Resistance“. *The American Journal of the Medical Sciences* 311, Nr. 1 (Januar 1996): 9–16.

2 Courvalin, P. „Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria.“ *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, Nr. 7 (Juli 1994): 1447–1451.

3 Robert Koch-Institut: ARS, https://ars.rki.de, Datenstand: 20.07.2014; Zugriff 23.07.2014

4 „EARS-Net Database“. Zugegriffen 3. Mai 2013. european center for disease control http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/database.aspx

5 Dobbin, C, M Maley, J Harkness, R Benn, M Malouf, A Glanville, und P Bye. „The impact of pan-resistant bacterial pathogens on survival after lung transplantation in cystic fibrosis: results from a single large referral centre“. *Journal of Hospital Infection* 56, Nr. 4 (April 2004): 277–282. doi:10.1016/j.jhin.2004.01.003.

6 Hsueh, Po-Ren, Lee-Jene Teng, Cheng-Yi Chen, Wen-Hwei Chen, Shen-Wu Ho, und Kwen-Tay Luh. „Pandrug-Resistant Acinetobacter baumannii Causing Nosocomial Infections in a University Hospital, Taiwan“. *Emerging Infectious Diseases* 8, Nr. 8 (August 2002): 827–832. doi:10.3201/eid0808.020014.

7 Humphries, Romney M., Theodoros Kelesidis, Jennifer Dien Bard, Kevin W. Ward, Debika Bhattacharya, und Michael A. Lewinski. „Successful Treatment of Pan-resistant Klebsiella Pneumoniae Pneumonia and Bacteraemia with a Combination of High-dose Tigecycline and Colistin“. *Journal of Medical Microbiology* 59, Nr. 11 (11. Januar 2010): 1383–1386. doi:10.1099/jmm.0.023010-0.

8 Spellberg, Brad. „New Antibiotic Development: Barriers and Opportunities in 2012“ Newsletter Vol. 30 No. 1. Zugegriffen 3. Mai 2013. http://www.tufts.edu/med/apua/news/news-newsletter-vol-30-no-1-2.shtml.

9 Kaper, James B., James P. Nataro, und Harry L. T. Mobley. „Pathogenic Escherichia Coli“. *Nature Reviews Microbiology* 2, Nr. 2 (Februar 2004): 123–140. doi:10.1038/nrmicro818.

10 Mayo Clinic. „*E. coli*“, Zugegriffen 19. April 2013. http://www.mayoclinic.com/health/e-coli/DS01007.

11 Drekonja, Dimitri M, und James R Johnson. „Urinary Tract Infections“. *Primary Care* 35, Nr. 2 (Juni 2008): 345–367, vii. doi:10.1016/j.pop.2008.01.001.

12 Stoll BJ, Hansen NI. „Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection“. *JAMA* 292, Nr. 19 (17. November 2004): 2357–2365. doi:10.1001/jama.292.19.2357.

13 WHO. „Ausbrüche von Infektionen mit *E. coli* O104:H4“. Zugegriffen 19. April 2013. http://www.euro.who.int/de/where-we-work/member-states/germany/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection.

14 Chad L. Mayer, Caitlin S. Leibowitz, Shinichiro Kurosawa, Deborah J. Stearns-Kurosawa “Shiga Toxins and the Pathophysiology of Hemolytic Uremic Syndrome in Humans and Animals” Toxins (Basel) 2012 November; 4(11): 1261–1287. Published online 2012 November 8. doi: 10.3390/toxins4111261

15 „Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. - Leitlinien & Empfehlungen“. Zugegriffen 19. April 2013. http://www.p-e-g.org/econtext/leitlinien. S-3 Leitlinie AWMF-Register-Nr. 043/044 Harnwegsinfektionen

16 Watson, J. D., und F. H. C. Crick. „Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid“. *Nature* 171, Nr. 4356 (25. April 1953): 737–738. doi:10.1038/171737a0.

17 Kunkel, Thomas A. „DNA Replication Fidelity“. *Journal of Biological Chemistry* 279, Nr. 17 (23. April 2004): 16895–16898. doi:10.1074/jbc.R400006200.

18 Kunkel, Meyer, Loeb. „Single-strand binding protein enhances fidelity of DNA synthesis in vitro”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 76, No. 12, pp. 6331-6335, December 1979

19 Denamur, Erick, und Ivan Matic. „Evolution of Mutation Rates in Bacteria“. *Molecular Microbiology* 60, Nr. 4 (2006): 820–827. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05150.x.

20 Gefter, M L, Y Hirota, T Kornberg, J A Wechsler, und C Barnoux. „Analysis of DNA Polymerases II and 3 in Mutants of Escherichia Coli Thermosensitive for DNA Synthesis“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68, Nr. 12 (Dezember 1971): 3150–3153.

21 Kong, X P, R Onrust, M O'Donnell, und J Kuriyan. „Three-dimensional Structure of the Beta Subunit of E. Coli DNA Polymerase III Holoenzyme: a Sliding DNA Clamp“. *Cell* 69, Nr. 3 (1. Mai 1992): 425–437.

22 Pritchard, A E, H G Dallmann, B P Glover, und C S McHenry. „A Novel Assembly Mechanism for the DNA Polymerase III Holoenzyme DnaX Complex: Association of Deltadelta' with DnaX(4) Forms DnaX(3)deltadelta'“. *The EMBO Journal* 19, Nr. 23 (1. Dezember 2000): 6536–6545. doi:10.1093/emboj/19.23.6536.

23 Jeruzalmi, D, O Yurieva, Y Zhao, M Young, J Stewart, M Hingorani, M O'Donnell, und J Kuriyan. „Mechanism of Processivity Clamp Opening by the Delta Subunit Wrench of the Clamp Loader Complex of E. Coli DNA Polymerase III“. *Cell* 106, Nr. 4 (24. August 2001): 417–428.

24 McHenry, Charles S. „DNA Replicases from a Bacterial Perspective“. *Annual Review of Biochemistry* 80 (7. Juni 2011): 403–436. doi:10.1146/annurev-biochem-061208-091655.

25 Maki, H, und A Kornberg. „Proofreading by DNA Polymerase III of Escherichia Coli Depends on Cooperative Interaction of the Polymerase and Exonuclease Subunits“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, Nr. 13 (Juli 1987): 4389–4392.

26 Derbyshire, Victoria, Julia K. Pinsonneault, und Catherine M. Joyce. „[28] Structure-function analysis of 3' → 5'-exonuclease of DNA polymerases“. In *Methods in Enzymology*, 363–385. herausgegeben von Judith L. Campbell. Academic Press, 1995. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687995620303.

27 Lehtinen, Duane A, und Fred W Perrino. „Dysfunctional Proofreading in the Escherichia Coli DNA Polymerase III Core“. *The Biochemical Journal* 384, Nr. Pt 2 (1. Dezember 2004): 337–348. doi:10.1042/BJ20040660.

28 Stefan, Alessandra, Luca Reggiani, Stefano Cianchetta, Annalisa Radeghieri, Antonio Gonzalez Vara y Rodriguez, und Alejandro Hochkoeppler. „Silencing of the Gene Coding for the Epsilon Subunit of DNA Polymerase III Slows down the Growth Rate of Escherichia Coli Populations“. *FEBS Letters* 546, Nr. 2–3 (10. Juli 2003): 295–299.

29 Damagnez, V, M P Doutriaux, und M Radman. „Saturation of mismatch repair in the mutD5 mutator strain of Escherichia coli.“ *Journal of Bacteriology* 171, Nr. 8 (August 1989): 4494–4497.

30 Schaaper, R M, und M Radman. „The Extreme Mutator Effect of Escherichia Coli mutD5 Results from Saturation of Mismatch Repair by Excessive DNA Replication Errors“. *The EMBO Journal* 8, Nr. 11 (November 1989): 3511–3516.

31 Marinus, M G, und N R Morris. „Isolation of Deoxyribonucleic Acid Methylase Mutants of Escherichia Coli K-12“. *Journal of Bacteriology* 114, Nr. 3 (Juni 1973): 1143–1150.

32 Geier, G E, und P Modrich. „Recognition Sequence of the Dam Methylase of Escherichia Coli K12 and Mode of Cleavage of Dpn I Endonuclease“. *The Journal of Biological Chemistry* 254, Nr. 4 (25. Februar 1979): 1408–1413.

33 Kunkel, Thomas A., und Dorothy A. Erie. „DNA Mismatch Repair*“. *Annual Review of Biochemistry* 74, Nr. 1 (2005): 681–710. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243.

34 Beckman, Robert A., und Lawrence A. Loeb. „Efficiency of Carcinogenesis with and Without a Mutator Mutation“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, Nr. 38 (19. September 2006): 14140–14145. doi:10.1073/pnas.0606271103.

35 Glickman, B. W., und M. Radman. „Escherichia Coli Mutator Mutants Deficient in Methylation-instructed DNA Mismatch Correction“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77, Nr. 2 (2. Januar 1980): 1063–1067.

36 LeClerc, J. Eugene, Baoguang Li, William L. Payne, und Thomas A. Cebula. „High Mutation Frequencies Among Escherichia Coli and Salmonella Pathogens“. *Science* 274, Nr. 5290 (15. November 1996): 1208–1211. doi:10.1126/science.274.5290.1208.

37 Blázquez, Jesús. „Hypermutation as a Factor Contributing to the Acquisition of Antimicrobial Resistance“. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 37, Nr. 9 (1. November 2003): 1201–1209. doi:10.1086/378810.

38 Wiegand, Irith, Alexandra K. Marr, Elena B. M. Breidenstein, Kristen N. Schurek, Patrick Taylor, und Robert E. W. Hancock. „Mutator Genes Giving Rise to Decreased Antibiotic Susceptibility in Pseudomonas Aeruginosa“. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, Nr. 10 (10. Januar 2008): 3810–3813. doi:10.1128/AAC.00233-08.

39 Essen, L O, und T Klar. „Light-driven DNA Repair by Photolyases“. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63, Nr. 11 (Juni 2006): 1266–1277. doi:10.1007/s00018-005-5447-y.

40 Olsson, M, und T Lindahl. „Repair of Alkylated DNA in Escherichia Coli. Methyl Group Transfer from O6-methylguanine to a Protein Cysteine Residue“. *The Journal of Biological Chemistry* 255, Nr. 22 (25. November 1980): 10569–10571.

41 Moolenaar, Geri F., Celine Moorman, und Nora Goosen. „Role of the Escherichia Coli Nucleotide Excision Repair Proteins in DNA Replication“. *Journal of Bacteriology* 182, Nr. 20 (15. Oktober 2000): 5706–5714. doi:10.1128/JB.182.20.5706-5714.2000.

42 Lewin, Benjamin. *Genes IX*. 9. Auflage. Jones and Bartlett Publishers, 2008.

43 Kow, Yoke W. „Base Excision Repair in E. Coli—an Overviewa“. *Annals of the New York Academy of Sciences* 726, Nr. 1 (1994): 178–180. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb52812.x.

44 Grollman, Arthur P., und Masaaki Moriya. „Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within“. *Trends in Genetics* 9, Nr. 7 (Juli 1993): 246–249. doi:10.1016/0168-9525(93)90089-Z.

45 Duncan, B K, und B Weiss. „Specific Mutator Effects of Ung (uracil-DNA Glycosylase) Mutations in Escherichia Coli“. *Journal of Bacteriology* 151, Nr. 2 (August 1982): 750–755.

46 Notley-McRobb, Lucinda, Rachel Pinto, Shona Seeto, und Thomas Ferenci. „Regulation of mutY and Nature of Mutator Mutations in Escherichia Coli Populations Under Nutrient Limitation“. *Journal of Bacteriology* 184, Nr. 3 (Februar 2002): 739–745.

47 Chayot, Romain, Benjamin Montagne, Didier Mazel, und Miria Ricchetti. „An End-joining Repair Mechanism in Escherichia Coli“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, Nr. 5 (2. Februar 2010): 2141–2146. doi:10.1073/pnas.0906355107.

48 Smith, Gerald R. „How RecBCD Enzyme and Chi Promote DNA Break Repair and Recombination: a Molecular Biologist’s View“. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76, Nr. 2 (6. Januar 2012): 217–228. doi:10.1128/MMBR.05026-11.

49 Kuzminov, Andrei. „Recombinational Repair of DNA Damage inEscherichia Coli and Bacteriophage λ“. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63, Nr. 4 (12. Januar 1999): 751–813.

50 Cox, Michael M. „RECOMBINATIONAL DNA REPAIR OF DAMAGED REPLICATION FORKS IN ESCHERICHIA COLI: Questions“. *Annual Review of Genetics* 35, Nr. 1 (2001): 53–82. doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.090016.

51 Michel, Bénédicte, S. Dusko Ehrlich, und Marilyne Uzest. „DNA Double-strand Breaks Caused by Replication Arrest“. *The EMBO Journal* 16, Nr. 2 (15. Januar 1997): 430–438. doi:10.1093/emboj/16.2.430.

52 Radman, M. „SOS Repair Hypothesis: Phenomenology of an Inducible DNA Repair Which Is Accompanied by Mutagenesis“. *Basic Life Sciences* 5A (1975): 355–367.

53 Michel, Benedicte. „After 30 Years of Study, the Bacterial SOS Response Still Surprises Us“. *PLoS Biology* 3, Nr. 7 (Juli 2005). doi:10.1371/journal.pbio.0030255.

54 Janion, Celina. „Inducible SOS Response System of DNA Repair and Mutagenesis in Escherichia coli“. *International Journal of Biological Sciences* (2008): 338–344. doi:10.7150/ijbs.4.338.

55 Sassanfar, M, und J W Roberts. „Nature of the SOS-inducing Signal in Escherichia Coli. The Involvement of DNA Replication“. *Journal of Molecular Biology* 212, Nr. 1 (5. März 1990): 79–96. doi:10.1016/0022-2836(90)90306-7.

56 Tippin, Brigette, Phuong Pham, und Myron F Goodman. „Error-prone Replication for Better or Worse“. *Trends in Microbiology* 12, Nr. 6 (Juni 2004): 288–295. doi:10.1016/j.tim.2004.04.004.

57 Beaber, John W, Bianca Hochhut, und Matthew K Waldor. „SOS Response Promotes Horizontal Dissemination of Antibiotic Resistance Genes“. *Nature* 427, Nr. 6969 (1. Januar 2004): 72–74. doi:10.1038/nature02241.

58 Da Re, Sandra, Fabien Garnier, Emilie Guérin, Susana Campoy, François Denis, und Marie-Cécile Ploy. „The SOS Response Promotes qnrB Quinolone-resistance Determinant Expression“. *EMBO Reports* 10, Nr. 8 (August 2009): 929–933. doi:10.1038/embor.2009.99.

59 Dorman, C. J. (2004). H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nature Reviews Microbiology*, 2(5), 391-400.

60 Richard Wheeler (Zephyris), “Supercoiled structure of circular DNA molecules with low writhe. Note that the helical nature of the DNA duplex is omitted for clarity.” 13 April 2007 Source: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/1/1e/Circular_DNA_Supercoiling.png, Aufgerufen am 18.05.2014

61 Sinden, R.R. *DNA Structure and Function*. Gulf Professional Publishing, 1994.

62 Liu, L F, und J C Wang. „Supercoiling of the DNA Template During Transcription“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, Nr. 20 (Oktober 1987): 7024–7027.

63 Massé, E, und M Drolet. „Relaxation of Transcription-induced Negative Supercoiling Is an Essential Function of Escherichia Coli DNA Topoisomerase I“. *The Journal of Biological Chemistry* 274, Nr. 23 (4. Juni 1999): 16654–16658.

64 Heddle, J G, T Lu, X Zhao, K Drlica, und A Maxwell. „gyrB-225, a Mutation of DNA Gyrase That Compensates for Topoisomerase I Deficiency: Investigation of Its Low Activity and Quinolone Hypersensitivity“. *Journal of Molecular Biology* 309, Nr. 5 (22. Juni 2001): 1219–1231. doi:10.1006/jmbi.2001.4733.

65 Gellert, M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, und H. A. Nash. „DNA Gyrase: An Enzyme That Introduces Superhelical Turns into DNA". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73, Nr. 11 (11. Januar 1976): 3872–3876.

66 Sugino, A, N P Higgins, und N R Cozzarelli. „DNA gyrase subunit stoichiometry and the covalent attachment of subunit A to DNA during DNA cleavage." *Nucleic Acids Research* 8, Nr. 17 (11. September 1980): 3865–3874.

67 Wang, J C. „Moving One DNA Double Helix Through Another by a Type II DNA Topoisomerase: The Story of a Simple Molecular Machine". *Quarterly Reviews of Biophysics* 31, Nr. 2 (Mai 1998): 107–144.

68 Orphanides, G, und A Maxwell. „Evidence for a conformational change in the DNA gyrase-DNA complex from hydroxyl radical footprinting." *Nucleic Acids Research* 22, Nr. 9 (11. Mai 1994): 1567–1575.

69 DiGate, R J, und K J Marians. „Identification of a Potent Decatenating Enzyme from Escherichia Coli". *The Journal of Biological Chemistry* 263, Nr. 26 (15. September 1988): 13366–13373.

70 Hiasa, H, und K J Marians. „Topoisomerase III, but Not Topoisomerase I, Can Support Nascent Chain Elongation During Theta-type DNA Replication". *The Journal of Biological Chemistry* 269, Nr. 51 (23. Dezember 1994): 32655–32659.

71 Anderson, Virginia E., Thomas D. Gootz, und Neil Osheroff. „Topoisomerase IV Catalysis and the Mechanism of Quinolone Action". *Journal of Biological Chemistry* 273, Nr. 28 (7. Oktober 1998): 17879–17885. doi:10.1074/jbc.273.28.17879.

72 Zechiedrich, E L, A B Khodursky, S Bachellier, R Schneider, D Chen, D M Lilley, und N R Cozzarelli. „Roles of Topoisomerases in Maintaining Steady-state DNA Supercoiling in Escherichia Coli". *The Journal of Biological Chemistry* 275, Nr. 11 (17. März 2000): 8103–8113.

73 Snoep, Jacky L, Coen C van der Weijden, Heidi W Andersen, Hans V Westerhoff, und Peter Ruhdal Jensen. „DNA Supercoiling in Escherichia Coli Is Under Tight and Subtle Homeostatic

Control, Involving Gene-expression and Metabolic Regulation of Both Topoisomerase I and DNA Gyrase“. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 269, Nr. 6 (März 2002): 1662–1669.

74 Higgins, C F, C J Dorman, D A Stirling, L Waddell, I R Booth, G May, und E Bremer. „A Physiological Role for DNA Supercoiling in the Osmotic Regulation of Gene Expression in S. Typhimurium and E. Coli“. *Cell* 52, Nr. 4 (26. Februar 1988): 569–584.

75 LESHER, G Y, E J FROELICH, M D GRUETT, J H BAILEY, und R P BRUNDAGE. „1,8-NAPHTHYRIDINE DERIVATIVES. A NEW CLASS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS“. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* 91 (September 1962): 1063–1065.

76 Appelbaum, P.C., und P.A. Hunter. „The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives“. *International Journal of Antimicrobial Agents* 16, Nr. 1 (September 2000): 5–15. doi:10.1016/S0924-8579(00)00192-8.

77 Rubinstein, Ethan. „History of Quinolones and Their Side Effects“. *Chemotherapy* 47, Nr. Suppl. 3 (2001): 3–8. doi:10.1159/000057838.

78 Oliphant, Catherine M, und Gary M Green. „Quinolones: a Comprehensive Review“. *American Family Physician* 65, Nr. 3 (1. Februar 2002): 455–464.

79 Naber, KG, Adam, D, “Classification of fluoroquinolones”. International Journal of Antimicrobial Agents, Volume 10, Issue 4, November 1998, Pages 255–257. http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(98)00059-4

80 Drlica, Karl, Hiroshi Hiasa, Robert Kerns, Muhammad Malik, Arkady Mustaev, und Xilin Zhao. „Quinolones: Action and Resistance Updated“. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 9, Nr. 11 (August 2009): 981–998. doi:10.2174/156802609789630947.

81 Hawkey, Peter M. „Mechanisms of Quinolone Action and Microbial Response“. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 Suppl 1 (Mai 2003): 29–35. doi:10.1093/jac/dkg207.

82 Cheng, Guyue, Haihong Hao, Menghong Dai, Zhenli Liu, und Zonghui Yuan. „Antibacterial action of quinolones: From target to network“. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Zugegriffen 29. April 2013. doi:10.1016/j.ejmech.2013.01.057.

83 Howard, B M, R J Pinney, und J T Smith. „Function of the SOS Process in Repair of DNA Damage Induced by Modern 4-quinolones“. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 45, Nr. 7 (Juli 1993): 658–662.

84 Ikeda, H, I Kawasaki, und M Gellert. „Mechanism of Illegitimate Recombination: Common Sites for Recombination and Cleavage Mediated by E. Coli DNA Gyrase“. *Molecular & General Genetics: MGG* 196, Nr. 3 (1984): 546–549.

85 Malik, Muhammad, Xilin Zhao, und Karl Drlica. „Lethal Fragmentation of Bacterial Chromosomes Mediated by DNA Gyrase and Quinolones“. *Molecular Microbiology* 61, Nr. 3 (2006): 810–825. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05275.x.

86 Kohanski, Michael A, Daniel J Dwyer, Boris Hayete, Carolyn A Lawrence, und James J Collins. „A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics“. *Cell* 130, Nr. 5 (7. September 2007): 797–810. doi:10.1016/j.cell.2007.06.049.

87 Dwyer, Daniel J, Michael A Kohanski, Boris Hayete, und James J Collins. „Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in Escherichia coli“. *Molecular Systems Biology* 3 (13. März 2007): 91. doi:10.1038/msb4100135.

88 Jacoby, G. A. „Mechanisms of Resistance to Quinolones“. *Clinical Infectious Diseases* 41, Nr. Supplement 2 (15. Juli 2005): S120–S126. doi:10.1086/428052.

89 Heisig, P. „Genetic Evidence for a Role of parC Mutations in Development of High-level Fluoroquinolone Resistance in Escherichia Coli“. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, Nr. 4 (April 1996): 879–885.

90 Hooper, David C. „Mechanisms of fluoroquinolone resistance“. *Drug Resistance Updates* 2, Nr. 1 (Februar 1999): 38–55. doi:10.1054/drup.1998.0068.

91 Willmott, C J, und A Maxwell. „A Single Point Mutation in the DNA Gyrase A Protein Greatly Reduces Binding of Fluoroquinolones to the gyrase-DNA Complex“. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37, Nr. 1 (Januar 1993): 126–127.

92 Hawkey, Peter M. „Mechanisms of Quinolone Action and Microbial Response“. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 Suppl 1 (Mai 2003): 29–35. doi:10.1093/jac/dkg207.

93 Breines, D M, S Ouabdesselam, E Y Ng, J Tankovic, S Shah, C J Soussy, und D C Hooper. „Quinolone Resistance Locus nfxD of Escherichia Coli Is a Mutant Allele of the parE Gene Encoding a Subunit of Topoisomerase IV“. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, Nr. 1 (Januar 1997): 175–179.

94 Hopkins, Davies, Threlfall. “Mechanisms of quinolone resistance in Escherichia coli and Salmonella: Recent developments”. International Journal of Antimicrobial Agents, Volume 25, Issue 5, May 2005, Pages 358–373

95 Ariza, R R, S P Cohen, N Bachhawat, S B Levy, und B Demple. „Repressor mutations in the marRAB operon that activate oxidative stress genes and multiple antibiotic resistance in Escherichia coli.“ *Journal of Bacteriology* 176, Nr. 1 (Januar 1994): 143–148.

96 Strahilevitz, Jacob, George A. Jacoby, David C. Hooper, und Ari Robicsek. „Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: a Multifaceted Threat“. *Clinical Microbiology Reviews* 22, Nr. 4 (10. Januar 2009): 664–689. doi:10.1128/CMR.00016-09.

97 Martínez-Martínez, L, A Pascual, und G A Jacoby. „Quinolone Resistance from a Transferable Plasmid“. *Lancet* 351, Nr. 9105 (14. März 1998): 797–799. doi:10.1016/S0140-6736(97)07322-4.

98 Tran, John H., George A. Jacoby, und David C. Hooper. „Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with Escherichia Coli DNA Gyrase“. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, Nr. 1 (1. Januar 2005): 118–125. doi:10.1128/AAC.49.1.118-125.2005.

99 Robicsek, Ari, Jacob Strahilevitz, George A Jacoby, Mark Macielag, Darren Abbanat, Chi Hye Park, Karen Bush, und David C Hooper. „Fluoroquinolone-modifying Enzyme: a New Adaptation of a Common Aminoglycoside Acetyltransferase“. *Nature Medicine* 12, Nr. 1 (Januar 2006): 83–88. doi:10.1038/nm1347.

100 Bagel, S., Hüllen, V., Wiedemann, B., & Heisig, P. (1999). Impact of gyrA and parC Mutations on Quinolone Resistance, Doubling Time, and Supercoiling Degree of Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *43*(4), 868-875.

101 Ansgar Schulte. „Stabilität hoher Fluorchinolonresistenz bei Enterobakterien ohne Selektionsdruck“. 2001, Dissertation, Bonn.

102 Simone Bagel. „Adhärenzeigenschaften chinolonresistenter Escherichia coli Isolate“. Dissertation, Bonn, 1998.

103 Sternglanz, R, S DiNardo, K A Voelkel, Y Nishimura, Y Hirota, K Becherer, L Zumstein, und J C Wang. „Mutations in the Gene Coding for Escherichia Coli DNA Topoisomerase I Affect Transcription and Transposition“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, Nr. 5 (Mai 1981): 2747–2751.

104 Steck, T R, R J Franco, J Y Wang, und K Drlica. „Topoisomerase Mutations Affect the Relative Abundance of Many Escherichia Coli Proteins“. *Molecular Microbiology* 10, Nr. 3 (November 1993): 473–481.

105 Bolivar, F, R L Rodriguez, P J Greene, M C Betlach, H L Heyneker, H W Boyer, J H Crosa, und S Falkow. „Construction and Characterization of New Cloning Vehicles. II. A Multipurpose Cloning System“. *Gene* 2, Nr. 2 (1977): 95–113.

106 Clinical And Laboratory Standards Institute. „Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically“. 9th Edition (M07–A9), 2012.

107 Clinical And Laboratory Standards Institute. „Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests“. 11th Edition (M02–A11), 2012.

108 McFarland J. „The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines.“ *Journal of the American Medical Association* XLIX, Nr. 14 (5. Oktober 1907): 1176–1178. doi:10.1001/jama.1907.25320140022001f.

109 Hanahan, D. „Studies on Transformation of Escherichia Coli with Plasmids“. *Journal of Molecular Biology* 166, Nr. 4 (5. Juni 1983): 557–580.

110 Dower, W J, J F Miller, und C W Ragsdale. „High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation.“ *Nucleic Acids Research* 16, Nr. 13 (11. Juli 1988): 6127–6145.

111 Poteete, Anthony R. „What Makes the Bacteriophage λ Red System Useful for Genetic Engineering: Molecular Mechanism and Biological Function“. *FEMS Microbiology Letters* 201, Nr. 1 (2001): 9–14. doi:10.1111/j.1574-6968.2001.tb10725.x.

112 Gay, P, D Le Coq, M Steinmetz, E Ferrari, und J A Hoch. „Cloning structural gene sacB, which codes for exoenzyme levansucrase of Bacillus subtilis: expression of the gene in Escherichia coli.“ *Journal of Bacteriology* 153, Nr. 3 (März 1983): 1424–1431.

113 Macherey-Nagel. „RNA Isolation: User manual NucleoSpin RNA“, Februar 2013.

114 Birnboim, H C, und J Doly. „A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA“. *Nucleic Acids Research* 7, Nr. 6 (24. November 1979): 1513–1523.

115 Suedlabor SLG. User manual „HiYield Plasmid Mini DNA-Kit“, 2012.

116 Macherey-Nagel. „PCR clean-up Gel extraction: User manual Nucleospin Gel and PCR Clean-up“, Januar 2012.

117 Beckman Coulter Inc. „User manual: Genome Lab GeXP Genetic Analysis System“, 2012.

118 Sanger, F, S Nicklen, und A R Coulson. „DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, Nr. 12 (Dezember 1977): 5463–5467.

119 Life Technologies. „TOPO® TA for subcloning“. Zugegriffen 16. Dezember 2013. http://www.lifetechnologies.com/de/de/home/life-science/cloning/topo/topo-ta-cloning/topo-ta-for-subcloning.html.

120 Thermo Scientific. „Support for NanoDrop Products - www.nanodrop.com“. Zugegriffen 24. Mai 2013. http://www.nanodrop.com/Support.aspx?Type=User%20Guides&Cat=NanoDrop%201000.

121 Agilent Technologies. „2100 Bioanalyzer Instrument“. Zugegriffen 14. Mai 2013. http://www.genomics.agilent.com/en/Bioanalyzer-System/2100-Bioanalyzer-Instrument/?cid=AG-PT-106&tabId=AG-PR-1001.

122 Agilent Technologies. „2100 Expert User´s Guide“. Zugegriffen 14. Mai 2013. http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/Public/G2946-90004_Vespucci_UG_eBook_%28NoSecPack%29.pdf.

123 Life Technologies. „Qubit® 2.0 Fluorometer“. Zugegriffen 14. Mai 2013. http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/brands/Product-Brand/Qubit/qubit-fluorometer.html.

124 Thermo Scientific. „Maxima Reverse Transcriptase“. Zugegriffen 15. Mai 2013. http://www.thermoscientificbio.com/reverse-transcription-rtpcr-rtqpcr/maxima-reverse-transcriptase/.

125 Thermo Scientific. „Product Information: Maxima Reverse Transcriptase“, 2012.

126 Saiki, R K, D H Gelfand, S Stoffel, S J Scharf, R Higuchi, G T Horn, K B Mullis, und H A Erlich. „Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase“. *Science (New York, N.Y.)* 239, Nr. 4839 (29. Januar 1988): 487–491.

127 Thermo Scientific. „DreamTaq DNA Polymerase“. Zugegriffen 15. Mai 2013. http://www.thermoscientificbio.com/pcr-enzymes-master-mixes-and-reagents/dreamtaq-dna-polymerase/.

128 Thermo Scientific. „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase“. Zugegriffen 15. Mai 2013. http://www.thermoscientificbio.com/pcr-enzymes-master-mixes-and-reagents/phusion-high-fidelity-dna-polymerase/.

129 Horton, R M. „PCR-Mediated Recombination and Mutagenesis. SOEing Together Tailor-Made Genes“. *Molecular Biotechnology* 3, Nr. 2 (April 1995): 93–99. doi:10.1007/BF02789105.

130 Higuchi, R, G Dollinger, P S Walsh, und R Griffith. „Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences“. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 10, Nr. 4 (April 1992): 413–417.

131 Higuchi, R, C Fockler, G Dollinger, und R Watson. „Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions“. *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 11, Nr. 9 (September 1993): 1026–1030.

132 Life Technologies. „SYBR® Green Realtime-PCR Master Mixes“. Zugegriffen 15. Mai 2013. http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/Products-and-Services/Applications/PCR/real-time-pcr/real-time-pcr-reagents/sybr-green-real-time-master-mixes.html.

133 Sambrook, John J., und David David William Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol. 2*. CSHL Press, 2001.

134 Helling, Robert B., Howard M. Goodman, und Herbert W. Boyer. „Analysis of Endonuclease EcoRI Fragments of DNA from Lambdoid Bacteriophages and Other Viruses by Agarose-Gel Electrophoresis“. *Journal of Virology* 14, Nr. 5 (November 1974): 1235–1244.

135 Thermo Scientific. „GeneRuler 100 bp DNA Ladder“. Zugegriffen 14. Mai 2013. http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/generuler-100-bp-dna-ladder-ready-to-use-100-to-1000-bp/.

136 Thermo Scientific. „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“. Zugegriffen 14. Mai 2013. http://www.thermoscientificbio.com/nucleic-acid-electrophoresis/generuler-1-kb-dna-ladder-ready-to-use-250-to-10000-bp/.

137 Howard, B M, R J Pinney, und J T Smith. „Function of the SOS Process in Repair of DNA Damage Induced by Modern 4-quinolones“. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 45, Nr. 7 (Juli 1993): 658–662.

138 Newmark, Kathryn G, Erin K O'Reilly, Jennifer Reineke Pohlhaus, und Kenneth N Kreuzer. „Genetic Analysis of the Requirements for SOS Induction by Nalidixic Acid in Escherichia Coli“. *Gene* 356 (15. August 2005): 69–76. doi:10.1016/j.gene.2005.04.029.

139 Schröder, Wiebke, Christiane Goerke, und Christiane Wolz. „Opposing effects of aminocoumarins and fluoroquinolones on the SOS response and adaptability in Staphylococcus aureus“. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 68, Nr. 3 (März 2013): 529–538. doi:10.1093/jac/dks456.

140 Quiñones, A, und S Neumann. „The ssb-113 allele suppresses the dnaQ49 mutator and alters DNA supercoiling in Escherichia coli“. *Molecular microbiology* 25, Nr. 2 (Juli 1997): 237–246.

141 Murata-Kamiya, Naoko, Hiroyuki Kamiya, Hiroshi Kaji, und Hiroshi Kasai. „Mutational specificity of glyoxal, a product of DNA oxidation, in the lacI gene of wild-type Escherichia coli W3110“. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 377, Nr. 2 (Juli 1997): 255–262. doi:10.1016/S0027-5107(97)00083-3.

142 Kasai, H., N. Iwamoto-Tanaka, und S. Fukada. „DNA Modifications by the Mutagen Glyoxal: Adduction to G and C, Deamination of C and GC and GA Cross-linking.“ *Carcinogenesis* 19, Nr. 8 (8. Januar 1998): 1459–1465. doi:10.1093/carcin/19.8.1459.

143 Fijalkowska, I J, und R M Schaaper. „Mutants in the Exo I motif of Escherichia coli dnaQ: defective proofreading and inviability due to error catastrophe.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, Nr. 7 (2. April 1996): 2856–2861.

144 Manrubia, Susanna C., Esteban Domingo, und Ester Lázaro. „Pathways to Extinction: Beyond the Error Threshold“. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, Nr. 1548 (27. Juni 2010): 1943–1952. doi:10.1098/rstb.2010.0076.

145 Chen, Peiqiu, und Eugene I. Shakhnovich. „Lethal Mutagenesis in Viruses and Bacteria“. *Genetics* 183, Nr. 2 (Oktober 2009): 639–650. doi:10.1534/genetics.109.106492.

146 Griffith, Becker, Wolf. “Characterization of TetD as a transcriptional activator of a subset of genes of the Escherichia coli SoxS/MarA/Rob regulon”. Molecular Microbiology (2005) 56 (4), 1103–1117

147 Datsenko, K A, und B L Wanner. „One-step Inactivation of Chromosomal Genes in Escherichia Coli K-12 Using PCR Products“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, Nr. 12 (6. Juni 2000): 6640–6645. doi:10.1073/pnas.120163297.

148 Herring, Christopher D, Jeremy D Glasner, und Frederick R Blattner. „Gene Replacement Without Selection: Regulated Suppression of Amber Mutations in Escherichia Coli“. *Gene* 311 (5. Juni 2003): 153–163.

149 Lee, David J, Lewis E H Bingle, Karin Heurlier, Mark J Pallen, Charles W Penn, Stephen J W Busby, und Jon L Hobman. „Gene Doctoring: a Method for Recombineering in Laboratory and Pathogenic Escherichia Coli Strains“. *BMC Microbiology* 9 (2009): 252. doi:10.1186/1471-2180-9-252.

150 Newton, C R, A Graham, L E Heptinstall, S J Powell, C Summers, N Kalsheker, J C Smith, und A F Markham. „Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS).“ *Nucleic Acids Research* 17, Nr. 7 (11. April 1989): 2503–2516.

151 Grodzicker, T., J. Williams, P. Sharp, und J. Sambrook. „Physical Mapping of Temperature-sensitive Mutations of Adenoviruses“. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 39 (1. Januar 1974): 439–446. doi:10.1101/SQB.1974.039.01.056.

152 Gram, H. „Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten.“ *Fortschritte der Medicin*. 2:185-189. (1884).

153 Fijalkowska, I J, und R M Schaaper. „Effects of Escherichia Coli dnaE Antimutator Alleles in a Proofreading-deficient mutD5 Strain“. *Journal of Bacteriology* 177, Nr. 20 (Oktober 1995): 5979–5986.

154 Miller, Keith, Alexander John O'Neill, und Ian Chopra. „Response of Escherichia Coli Hypermutators to Selection Pressure with Antimicrobial Agents from Different Classes“. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, Nr. 6 (Juni 2002): 925–934.

155 Heisig, P., und R. Tschorny. „Characterization of Fluoroquinolone-resistant Mutants of Escherichia Coli Selected in Vitro.“ *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, Nr. 6 (6. Januar 1994): 1284–1291. doi:10.1128/AAC.38.6.1284.

156 Sáenz, Yolanda, Joaquim Ruiz, Myriam Zarazaga, Meritxell Teixidó, Carmen Torres, und Jordi Vila. „Effect of the Efflux Pump Inhibitor Phe-Arg-β-naphthylamide on the MIC Values of the Quinolones, Tetracycline and Chloramphenicol, in Escherichia Coli Isolates of Different Origin“. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53, Nr. 3 (3. Januar 2004): 544–545. doi:10.1093/jac/dkh117.

157 Hooper, David C. „Mechanisms of fluoroquinolone resistance“. *Drug Resistance Updates* 2, Nr. 1 (Februar 1999): 38–55. doi:10.1054/drup.1998.0068.

158 Reinhardt, A. K., C. M. Bebear, M. Kobisch, I. Kempf, und A. V. Gautier-Bouchardon. „Characterization of Mutations in DNA Gyrase and Topoisomerase IV Involved in Quinolone Resistance of Mycoplasma gallisepticum Mutants Obtained In Vitro“. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, Nr. 2 (Februar 2002): 590–593. doi:10.1128/AAC.46.2.590-593.2002.

159 Weigel, L. M., G. J. Anderson, und F. C. Tenover. „DNA Gyrase and Topoisomerase IV Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance in Proteus Mirabilis“. *Antimicrobial*

Agents and Chemotherapy 46, Nr. 8 (8. Januar 2002): 2582–2587. doi:10.1128/AAC.46.8.2582-2587.2002.

160 Akasaka, Takaaki, Mayumi Tanaka, Akihito Yamaguchi, und Kenichi Sato. „Type II Topoisomerase Mutations in Fluoroquinolone-Resistant Clinical Strains of Pseudomonas aeruginosa Isolated in 1998 and 1999: Role of Target Enzyme in Mechanism of Fluoroquinolone Resistance“. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, Nr. 8 (August 2001): 2263–2268. doi:10.1128/AAC.45.8.2263-2268.2001.

161 Marcusson, Linda L., Niels Frimodt-Møller, und Diarmaid Hughes. „Interplay in the Selection of Fluoroquinolone Resistance and Bacterial Fitness“. *PLoS Pathog* 5, Nr. 8 (7. August 2009): e1000541. doi:10.1371/journal.ppat.1000541.

162 Takano, K, Y Nakabeppu, H Maki, T Horiuchi, und M Sekiguchi. „Structure and Function of dnaQ and mutD Mutators of Escherichia Coli“. *Molecular & General Genetics: MGG* 205, Nr. 1 (Oktober 1986): 9–13.

163 Miller, J.H. „Short Course in Bacterial Genetics“. In *CSH Press o:429*, 1992.

164 Slupska, Malgorzata M., Angela G. King, Louise I. Lu, Rose H. Lin, Emily F. Mao, Chantal A. Lackey, Ju-Huei Chiang, Claudia Baikalov, und Jeffrey H. Miller. „Examination of the Role of DNA Polymerase Proofreading in the Mutator Effect of Miscoding tRNAs“. *Journal of Bacteriology* 180, Nr. 21 (November 1998): 5712–5717.

165 Nomura, T, H Aiba, und A Ishihama. „Transcriptional Organization of the Convergent Overlapping dnaQ-rnh Genes of Escherichia Coli“. *The Journal of Biological Chemistry* 260, Nr. 11 (10. Juni 1985): 7122–7125.

166 Huang, Yiping, Dan K Braithwaite, und Junetsu Ito. „Evolution of dnaQ, the gene encoding the editing 3’ to 5’ exonuclease subunit of DNA polymerase III holoenzyme in Gram-negative bacteria“. *FEBS Letters* 400, Nr. 1 (2. Januar 1997): 94–98. doi:10.1016/S0014-5793(96)01361-0.

167 Lindgren, Patricia Komp, Åsa Karlsson, und Diarmaid Hughes. „Mutation Rate and Evolution of Fluoroquinolone Resistance in Escherichia Coli Isolates from Patients with Urinary Tract

Infections“. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, Nr. 10 (10. Januar 2003): 3222–3232. doi:10.1128/AAC.47.10.3222-3232.2003.

168 Sugino, Akio, N. Patrick Higgins, Patrick O. Brown, Craig L. Peebles, und Nicholas R. Cozzarelli. „Energy Coupling in DNA Gyrase and the Mechanism of Action of Novobiocin“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75, Nr. 10 (10. Januar 1978): 4838–4842.

169 Champoux, J J. „DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism“. *Annual Review of Biochemistry* 70 (2001): 369–413. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.369.

170 Wang, James C. „Cellular Roles of DNA Topoisomerases: a Molecular Perspective“. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3, Nr. 6 (Juni 2002): 430–440. doi:10.1038/nrm831.

171 Mraheil, M. A., Heisig, A., & Heisig, P. (2013). An improved assay for the detection of alterations in bacterial DNA supercoiling in vivo. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, *68*(7), 541-548.

172 Abu Mraheil, Mobarak. Entwicklung eines molekularbiologischen Testsystems zum Nachweis von Inhibitoren bakterieller Topoisomerasen, deren Wirkung und des DNA-Superspiralisierungsgrades in vivo. Hamburg: Staats- und Universitätsbibliothek Carl von Ossietzky, 2005. Dissertation

173 Tanaka, K, Y Takayanagi, N Fujita, A Ishihama, und H Takahashi. „Heterogeneity of the principal sigma factor in Escherichia coli: the rpoS gene product, sigma 38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase Escherichia coli.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, Nr. 8 (15. April 1993): 3511–3515.

174 Quiñones, Ariel, Claudia Kücherer, Reinhard Piechocki, und Walter Messer. „Reduced Transcription of the Rnh Gene in Escherichia Coli Mutants Expressing the SOS Regulon Constitutively“. *Molecular and General Genetics MGG* 206, Nr. 1 (1. Januar 1987): 95–100. doi:10.1007/BF00326542.

175 Foster, Patricia L., und Amy D. Sullivan. „Interactions between epsilon, the proofreading subunit of DNA polymerase III, and proteins involved in the SOS response of Escherichia coli“. *Molecular & general genetics : MGG* 214, Nr. 3 (November 1988): 467–473.

176 Urios, A, G Herrera, V Aleixandre, und M Blanco. „Expression of the recA gene is reduced in Escherichia coli topoisomerase I mutants“. *Mutation research* 243, Nr. 4 (1990): 267–272.

177 Alekshun, Michael N, und Stuart B Levy. „The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals“. *Trends in Microbiology* 7, Nr. 10 (1. Oktober 1999): 410–413. doi:10.1016/S0966-842X(99)01589-9.

178 Echols, H, C Lu, und P M Burgers. „Mutator Strains of Escherichia Coli, mutD and dnaQ, with Defective Exonucleolytic Editing by DNA Polymerase III Holoenzyme“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, Nr. 8 (April 1983): 2189–2192.

179 Maruyama, M, T Horiuchi, H Maki, und M Sekiguchi. „A Dominant (mutD5) and a Recessive (dnaQ49) Mutator of Escherichia Coli“. *Journal of Molecular Biology* 167, Nr. 4 (15. Juli 1983): 757–771.

180 Maki, H, T Horiuchi, und M Sekiguchi. „Structure and Expression of the dnaQ Mutator and the RNase H Genes of Escherichia Coli: Overlap of the Promoter Regions“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, Nr. 23 (Dezember 1983): 7137–7141.

181 Cox, E C, und D L Horner. „Structure and Coding Properties of a Dominant Escherichia Coli Mutator Gene, mutD“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, Nr. 8 (April 1983): 2295–2299.

182 Boe, L, M Danielsen, S Knudsen, J B Petersen, J Maymann, und P R Jensen. „The Frequency of Mutators in Populations of Escherichia Coli“. *Mutation Research* 448, Nr. 1 (14. März 2000): 47–55.

183 LeClerc, J E, B Li, W L Payne, und T A Cebula. „High Mutation Frequencies Among Escherichia Coli and Salmonella Pathogens“. *Science (New York, N.Y.)* 274, Nr. 5290 (15. November 1996): 1208–1211.

184 Denamur, Erick, Stéphane Bonacorsi, Antoine Giraud, Patrick Duriez, Farida Hilali, Christine Amorin, Edouard Bingen, u. a. „High Frequency of Mutator Strains Among Human

Uropathogenic Escherichia Coli Isolates“. *Journal of Bacteriology* 184, Nr. 2 (15. Januar 2002): 605–609. doi:10.1128/JB.184.2.605-609.2002.

185 Richardson, Anthony R., Zhong Yu, Tanja Popovic, und Igor Stojiljkovic. „Mutator clones of Neisseria meningitidis in epidemic serogroup A disease“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, Nr. 9 (30. April 2002): 6103–6107. doi:10.1073/pnas.092568699.

186 Oliver, Antonio, Rafael Cantón, Pilar Campo, Fernando Baquero, und Jesús Blázquez. „High Frequency of Hypermutable Pseudomonas Aeruginosa in Cystic Fibrosis Lung Infection“. *Science* 288, Nr. 5469 (19. Mai 2000): 1251–1253. doi:10.1126/science.288.5469.1251.

187 Oliver, Antonio, Fernando Baquero, und Jesús Blázquez. „The Mismatch Repair System (mutS, mutL and uvrD Genes) in Pseudomonas Aeruginosa: Molecular Characterization of Naturally Occurring Mutants“. *Molecular Microbiology* 43, Nr. 6 (März 2002): 1641–1650.

188 Björkholm, Britta, Maria Sjölund, Per G. Falk, Otto G. Berg, Lars Engstrand, und Dan I. Andersson. „Mutation Frequency and Biological Cost of Antibiotic Resistance in Helicobacter Pylori“. Zugegriffen 11. April 2013. http://www.pnas.org.

189 Krishnaswamy, S, J A Rogers, R J Isbell, und R G Fowler. „The High Mutator Activity of the dnaQ49 Allele of Escherichia Coli Is Medium-dependent and Results from Both Defective 3’→5’ Proofreading and Methyl-directed Mismatch Repair“. *Mutation Research* 288, Nr. 2 (August 1993): 311–319.

190 Schaaper, R M. „Base Selection, Proofreading, and Mismatch Repair During DNA Replication in Escherichia Coli“. *The Journal of Biological Chemistry* 268, Nr. 32 (15. November 1993): 23762–23765.

191 Modrich, P. „Mechanisms and Biological Effects of Mismatch Repair“. *Annual Review of Genetics* 25, Nr. 1 (1991): 229–253. doi:10.1146/annurev.ge.25.120191.001305.

192 Fijalkowska, Iwona J., Roel M. Schaaper, und Piotr Jonczyk. „DNA Replication Fidelity in Escherichia Coli: a multi-DNA Polymerase Affair“. *FEMS Microbiology Reviews* 36, Nr. 6 (2012): 1105–1121. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00338.x.

193 Chopra, Ian, Alexander J O'Neill, und Keith Miller. „The Role of Mutators in the Emergence of Antibiotic-resistant Bacteria". *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 6, Nr. 3 (Juni 2003): 137–145.

194 Miller, J H, A Suthar, J Tai, A Yeung, C Truong, und J L Stewart. „Direct Selection for Mutators in Escherichia Coli". *Journal of Bacteriology* 181, Nr. 5 (März 1999): 1576–1584.

195 Ginetti, F, M Perego, A M Albertini, und A Galizzi. „Bacillus Subtilis mutS mutL Operon: Identification, Nucleotide Sequence and Mutagenesis". *Microbiology (Reading, England)* 142 (Pt 8) (August 1996): 2021–2029.

196 O'Neill, Alexander J, und Ian Chopra. „Insertional Inactivation of mutS in Staphylococcus Aureus Reveals Potential for Elevated Mutation Frequencies, Although the Prevalence of Mutators in Clinical Isolates Is Low". *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50, Nr. 2 (August 2002): 161–169.

197 Foster, Patricia L., und Amy D. Sullivan. „Interactions between epsilon, the proofreading subunit of DNA polymerase III, and proteins involved in the SOS response of Escherichia coli". *Molecular & general genetics : MGG* 214, Nr. 3 (November 1988): 467–473.

198 Tang, Mengjia, Xuan Shen, Ekaterina G. Frank, Mike O'Donnell, Roger Woodgate, und Myron F. Goodman. „UmuD′$_2$C is an error-prone DNA polymerase, Escherichia coli pol V". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, Nr. 16 (3. August 1999): 8919–8924.

199 Quiñones, A. „Regulation of the dnaQ gene of Escherichia coli in mutants expressing the SOS regulon constitutively". *Journal of basic microbiology* 30, Nr. 5 (1990): 353–362.

200 Hauh-Jyun Candy Chen, Yu-Chin Chen. "Analysis of Glyoxal-Induced DNA Cross-Links by Capillary Liquid Chromatography Nanospray Ionization Tandem Mass Spectrometry". Chem. Res. Toxicol., 2009, 22 (7), pp 1334–1341

201 R G Martin and J L Rosner. "Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to mar operator sequences". PNAS 1995 92 (12) 5456-5460

202 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. The Journal of Bacteriology 178:2216-2223.

203 White, Alekshun, McDermot. “Frontiers in Antibacterial Resistance: A Tribute to Stuart B. Levy” ACM Press, Washington, DC, 2005

204 Barbosa, T. M., and S. B. Levy. 2000. Differential Expression of over 60 Chromosomal Genes in Escherichia coli by Constitutive Expression of MarA. The Journal of Bacteriology 182:3467-3474.

205 Martin, R. G., and J. L. Rosner. 2002. Genomics of the marA/soxS/robregulon of Escherichia coli: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data. Molecular Microbiology 44:1611-1624.

206 Okusu, H., Ma, D., & Nikaido, H. (1996). AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of Escherichia coli multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. Journal of Bacteriology, 178(1), 306-308.

207 Andersen, J., Forst, S. A., Zhao, K., Inouye, M., & Delihas, N. (1989). The function of micF RNA. micF RNA is a major factor in the thermal regulation of OmpF protein in Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry, 264(30), 17961-17970.

208 Maxwell, A. „The Interaction Between Coumarin Drugs and DNA Gyrase“. *Molecular Microbiology* 9, Nr. 4 (August 1993): 681–686.

209 Maxwell, A. (1997). DNA gyrase as a drug target. *Trends in microbiology*, *5*(3), 102-109.

210 Baranello, Laura, David Levens, Ashutosh Gupta, und Fedor Kouzine. „The Importance of Being Supercoiled: How DNA Mechanics Regulate Dynamic Processes“. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1819, Nr. 7 (Juli 2012): 632–638. doi:10.1016/j.bbagrm.2011.12.007.

211 Andersson, D. I., and D. Hughes. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nature Reviews. Microbiology 8:260-271.

212 Andersson, D. I., and B. R. Levin. 1999. The biological cost of antibiotic resistance. Current Opinion in Microbiology 2:489-493.

213 Stefan, Alessandra, Luca Reggiani, Stefano Cianchetta, Annalisa Radeghieri, Antonio Gonzalez Vara y Rodriguez, und Alejandro Hochkoeppler. „Silencing of the Gene Coding for the Epsilon Subunit of DNA Polymerase III Slows down the Growth Rate of Escherichia Coli Populations“. *FEBS Letters* 546, Nr. 2–3 (10. Juli 2003): 295–299.

214 Fijalkowska, I J, und R M Schaaper. „Effects of Escherichia Coli dnaE Antimutator Alleles in a Proofreading-deficient mutD5 Strain“. *Journal of Bacteriology* 177, Nr. 20 (Oktober 1995): 5979–5986.

215 Taft-Benz, Sharon A, und Roel M Schaaper. „The Theta Subunit of Escherichia Coli DNA Polymerase III: a Role in Stabilizing the Epsilon Proofreading Subunit“. *Journal of Bacteriology* 186, Nr. 9 (Mai 2004): 2774–2780.

216 Schaaper, R M. „The Mutational Specificity of Two Escherichia Coli dnaE Antimutator Alleles as Determined from lacI Mutation Spectra“. *Genetics* 134, Nr. 4 (August 1993): 1031–1038.

217 Fijalkowska, I. J., R. L. Dunn, und R. M. Schaaper. „Mutants of Escherichia Coli with Increased Fidelity of DNA Replication“. *Genetics* 134, Nr. 4 (August 1993): 1023–1030.

218 Hill, T M, B Sharma, M Valjavec-Gratian, und J Smith. „Sfi-independent Filamentation in Escherichia Coli Is lexA Dependent and Requires DNA Damage for Induction“. *Journal of Bacteriology* 179, Nr. 6 (März 1997): 1931–1939.

219 Lederer, Franziska L, Tobias J Günther, Johannes Raff, und Katrin Pollmann. „E. Coli Filament Formation Induced by Heterologous S-layer Expression“. *Bioengineered Bugs* 2, Nr. 3 (Juni 2011): 178–181.

220 Smith, H. J., Nichol, K. A., Hoban, D. J., & Zhanel, G. G. (2003). Stretching the mutant prevention concentration (MPC) beyond its limits. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51(6), 1323-1325.

221 Gillespie, Stephen H, Shreya Basu, Anne L Dickens, Denise M O'Sullivan, und Timothy D McHugh. „Effect of Subinhibitory Concentrations of Ciprofloxacin on Mycobacterium

Fortuitum Mutation Rates“. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56, Nr. 2 (August 2005): 344–348. doi:10.1093/jac/dki191.

222 Mesak, Lili Rosana, Vivian Miao, und Julian Davies. „Effects of Subinhibitory Concentrations of Antibiotics on SOS and DNA Repair Gene Expression in Staphylococcus aureus“. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, Nr. 9 (September 2008): 3394–3397. doi:10.1128/AAC.01599-07.

223 Bayer Pharmaceuticals Corporation. „Cipro“. Zugegriffen 15. April 2013. http://www.fda.gov/downloads/Drugs/EmergencyPreparedness/BioterrorismandDrugPreparedness/UCM130802.pdf.

224 Lamers, R. P., Cavallari, J. F., & Burrows, L. L. (2013). The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAβN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. *PloS one*, *8*(3), e60666.

225 Fowler, R. G., Degnen, G. E., & Cox, E. C. (1974). Mutational specificity of a conditional Escherichia coli mutator, mutD5. Molecular and General Genetics MGG, 133(3), 179-191.

226 Scheuermann, R, S Tam, P M Burgers, C Lu, und H Echols. „Identification of the Epsilon-subunit of Escherichia Coli DNA Polymerase III Holoenzyme as the dnaQ Gene Product: a Fidelity Subunit for DNA Replication“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, Nr. 23 (Dezember 1983): 7085–7089.

227 Cisneros, G. Andres, Lalith Perera, Roel M. Schaaper, Lars C. Pedersen, Robert E. London, Lee G. Pedersen, und Thomas A. Darden. „Reaction mechanism of the ε subunit of E. coli DNA polymerase III: Insights into active site metal coordination and catalytically significant residues“. *Journal of the American Chemical Society* 131, Nr. 4 (4. Februar 2009): 1550–1556. doi:10.1021/ja8082818.

228 Hamdan, Samir, Paul D Carr, Susan E Brown, David L Ollis, und Nicholas E Dixon. „Structural Basis for Proofreading During Replication of the Escherichia Coli Chromosome“. *Structure (London, England: 1993)* 10, Nr. 4 (April 2002): 535–546.

229 Bressanin, Daniela, Alessandra Stefan, Fabrizio Dal Piaz, Stefano Cianchetta, Luca Reggiani, und Alejandro Hochkoeppler. „Proteolysis of the Proofreading Subunit Controls the

Assembly of Escherichia Coli DNA Polymerase III Catalytic Core“. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1794, Nr. 11 (November 2009): 1606–1615. doi:10.1016/j.bbapap.2009.07.011.

230 Atlung, Tove, Bjarke Bak Christensen, und Flemming G. Hansen. „Role of the Rom Protein in Copy Number Control of Plasmid pBR322 at Different Growth Rates inEscherichia coliK-12“. *Plasmid* 41, Nr. 2 (März 1999): 110–119. doi:10.1006/plas.1998.1386.

231 Taft-Benz, S. A., & Schaaper, R. M. (1998). Mutational analysis of the 3’→ 5’ proofreading exonuclease of Escherichia coli DNA polymerase III. Nucleic acids research, 26(17), 4005-4011.

232 Goldberger, Robert F. „Autogenous Regulation of Gene Expression The Mechanism by Which a Protein Directly Controls Expression of Its Own Structural Gene Is Described“. *Science* 183, Nr. 4127 (3. Januar 1974): 810–816. doi:10.1126/science.183.4127.810.

233 McFall, Elizabeth. „Genetic structure of the D-serine deaminase system of Escherichia coli“. *Journal of Molecular Biology* 9, Nr. 3 (1964): 746–753. doi:10.1016/S0022-2836(64)80179-0.

234 Gellert, M, M H O’Dea, T Itoh, und J Tomizawa. „Novobiocin and Coumermycin Inhibit DNA Supercoiling Catalyzed by DNA Gyrase“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, Nr. 12 (Dezember 1976): 4474–4478.

235 Dorman, Charles J. „DNA Supercoiling and Bacterial Gene Expression“. *Science Progress* 89, Nr. Pt 3–4 (2006): 151–166.

236 Dorman, Charles J. „Genome Architecture and Global Gene Regulation in Bacteria: Making Progress Towards a Unified Model?“ *Nature Reviews Microbiology* 11, Nr. 5 (Mai 2013): 349–355. doi:10.1038/nrmicro3007.

237 Garner, M M, G Felsenfeld, M H O’Dea, und M Gellert. „Effects of DNA supercoiling on the topological properties of nucleosomes.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, Nr. 9 (Mai 1987): 2620–2623.

238 Sinden, Richard R., und David W. Ussery. „[18] Analysis of DNA structure in vivo using psoralen photobinding: Measurement of supercoiling, topological domains, and DNA-protein

interactions“. In *Methods in Enzymology*, 319–335. herausgegeben von James E. Dahlberg David M.J. Lilley. Academic Press, 1992.

239 Paget, M. S., & Helmann, J. D. (2003). The sigma70 family of sigma factors. Genome Biol, 4(1), 203.

240 Lonetto, M., Gribskov, M., & Gross, C. A. (1992). The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. Journal of bacteriology, 174(12), 3843.

241 Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A., & Takahashi, H. (1993). Heterogeneity of the principal sigma factor in Escherichia coli: the rpoS gene product, sigma 38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase Escherichia coli. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90(8), 3511-3515.

242 Bustin, S A. „Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems“. *Journal of molecular endocrinology* 29, Nr. 1 (August 2002): 23–39.

243 Baranauskas, Aurimas, Sigitas Paliksa, Gediminas Alzbutas, Mindaugas Vaitkevicius, Judita Lubiene, Virginija Letukiene, Sigitas Burinskas, Giedrius Sasnauskas, und Remigijus Skirgaila. „Generation and Characterization of New Highly Thermostable and Processive M-MuLV Reverse Transcriptase Variants“. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS* 25, Nr. 10 (Oktober 2012): 657–668. doi:10.1093/protein/gzs034.

244 Pfaffl, Michael W. „A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-time RT–PCR“. *Nucleic Acids Research* 29, Nr. 9 (1. Mai 2001): e45.

245 Zhou, Kang, Lihan Zhou, Qing E. Lim, Ruiyang Zou, Gregory Stephanopoulos, und Heng-Phon Too. „Novel Reference Genes for Quantifying Transcriptional Responses of Escherichia Coli to Protein Overexpression by Quantitative PCR“. *BMC Molecular Biology* 12, Nr. 1 (23. April 2011): 18. doi:10.1186/1471-2199-12-18. Gen: *cysG*

246 Hruz, Tomas, Markus Wyss, Mylene Docquier, Michael W. Pfaffl, Sabine Masanetz, Lorenzo Borghi, Phebe Verbrugghe, u. a. „RefGenes: Identification of Reliable and Condition Specific Reference Genes for RT-qPCR Data Normalization“. *BMC Genomics* 12, Nr. 1 (21. März 2011): 156. doi:10.1186/1471-2164-12-156. Gen: *yegV*

247 Schaaper, R. M., & Cornacchio, R. O. B. I. N. (1992). An Escherichia coli *dnaE* mutation with suppressor activity toward mutator *mutD*5. *Journal of bacteriology*, 174(6), 1974-1982.