

Untersuchungen zur Rolle des *ramRA*-Operons bei
der Ausprägung multipler Antibiotikaresistenz in
Citrobacter-Arten

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

vorgelegt an der
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften im
Fachbereich Chemie der
Universität Hamburg

Von
Alexander Anhorn
Hamburg, 2017

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde durchgeführt in der Zeit vom März 2011 bis September 2014 in der Abteilung für Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie im Fachbereich Chemie an der MIN-Fakultät der Universität Hamburg unter der fachlichen Leitung von Prof. Dr. Peter Heisig.

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

Termin der Disputation: 19. Mai 2017

*Unter einer Million Möglichkeiten ist diejenige die beste,
für die man sich entscheidet.*

Für Nicola
Für meine Eltern
Für mich

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1 Antibiotika und Resistenz.....	1
I.2 Grundlagen der Antibiotikaresistenz	5
I.2.1 Mechanismen der Antibiotikaresistenz am Beispiel der Fluorchinolone	7
I.2.2 Multiple drug resistance	12
I.3 Multiple Antibiotikaresistenz bei verändertem Efflux/Influx Verhältnis.....	12
I.3.1 Die Effluxpumpen der Enterobakterien	13
I.3.2 Die MDR-Effluxpumpe AcrAB-TolC.....	14
I.4 Regulatoren der AcrAB-TolC Effluxpumpe	19
I.4.1 Lokale Regulatoren der AcrAB-TolC Effluxpumpe	19
I.4.2 Globale Regulatoren der AcrAB-TolC Effluxpumpe.....	20
I.4.2.1 Regulation durch MarA	22
I.4.2.2 Regulation durch SoxS.....	24
I.4.2.3 Regulation durch Rob	26
I.4.2.4 Regulation durch RamA	27
I.4.2.5 Die Interaktion an der marbox.....	32
I.5 Bakterien der Gattung <i>Citrobacter</i>	33
I.5.1 Allgemeine Klassifizierung von <i>Citrobacter</i> Spezies	33
I.5.2 Klinische Bedeutung.....	34
I.5.3 Antibiotikatherapie und Resistenzlage	35
I.6 Ziel der Arbeit	37
II. Material und Methoden	38
II.1 Material	38
II.1.1 Oligonukleotide.....	38
II.1.2 Plasmide.....	40
II.1.3 Bakterienstämme	40
II.1.4 DNA-Größenstandards	42
II.1.5 Verwendete Kits	42
II.1.6 Enzyme	42
II.1.7 Nährmedien.....	43
II.1.8 Puffer und Lösungen.....	44
II.1.9 Chemikalien.....	44
II.1.10 Geräte	46

Inhaltsverzeichnis

II.1.11 Verbrauchsmaterialien	47
II.1.12 Software	48
II.2 Methoden.....	48
II.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	48
II.2.1.1 Kultivierung von Bakterien.....	48
II.2.1.2 Lagerung von Bakterienkulturen	49
II.2.1.3 Überwachung des Kulturwachstums mittels optischer Dichte.....	49
II.2.1.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	49
II.2.1.5 Stammtypisierung mittels biochemischer Reaktionsprofile.....	50
II.2.1.6 Stammtypisierung mittels massenspektrometrischer Profile	50
II.2.2 Molekularbiologie Methoden.....	50
II.2.2.1 Isolierung der Gesamt-DNA aus Bakterien.....	50
II.2.2.2 Plasmidisolierung und -aufreinigung	51
II.2.2.2.1 Mini-Prep Ansatz.....	51
II.2.2.2.2 Midi-Prep-Ansatz.....	52
II.2.2.2.3 Mini-Prep-Ansatz mit kommerziellem Kit.....	53
II.2.2.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer Lösung.....	53
II.2.2.3.1 Photometrische Bestimmung im NanoDrop	53
II.2.2.3.2 Konzentrationsabschätzung auf dem Agarosegel.....	53
II.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	53
II.2.2.5 Restriktionsverdau.....	54
II.2.2.6 Dephosphorylierung.....	54
II.2.2.7 Ligation.....	54
II.2.2.8 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	55
II.2.2.8.1 Herstellung CaCl ₂ -kompetenter Zellen.....	55
II.2.2.8.2 Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Zellen	55
II.2.2.8.3 Herstellung elektrokompenter Zellen für die Elektroporation.....	56
II.2.2.9 Elektroporation.....	56
II.2.2.10 PCR	56
II.2.2.11 Site-Specific-Mutagenesis (SSM) PCR	58
II.2.2.12 ARMS-PCR.....	59
II.2.2.13 Aufreinigung von PCR- und Restriktionsverdauprodukten	59
II.2.2.13.1 Aufreinigung mittels kommerziellem Kit	59
II.2.2.13.2 DNA-Aufreinigung nach Isolierung aus Agarosegelen	59
II.2.2.13.3 Aufreinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung	59

Inhaltsverzeichnis

II.2.2.14 Sequenzierung	60
II.2.3 Lumineszenzmessung	61
II.2.4 Bioinformatische Methoden	61
II.2.4.1 Sequenzdatenverarbeitung und Stammbaumberechnung	61
II.2.4.2 3D-Strukturmodellierung und Modellbewertung	62
II.2.4.3 Dynamiksimulation in 3D-Strukturmodellen.....	62
III. Ergebnisse.....	64
III.1 Analyse der DNA-Sequenz des <i>ramRA</i> -Operons in <i>Citrobacter</i>	64
III.1.1 Speziesidentifizierung der verwendeten <i>Citrobacter</i> -Stämme	64
III.1.1.1 Biochemische Stammcharakterisierung.....	65
III.1.1.2 Massenspektrometrische Stammcharakterisierung.....	69
III.1.1.3 Molekulargenetische Stammcharakterisierung.....	70
III.1.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Speziesidentifizierung.....	76
III.1.2 Sequenzierung des <i>ramRA</i> -Operons in drei <i>Citrobacter</i> Spezies.....	77
III.1.3 Prüfung der Operonstruktur in <i>C. rodentium</i>	89
III.1.4 <i>In silico</i> Untersuchungen des Transkriptionsfaktors RamA aus <i>Citrobacter koseri</i>	91
III.2 Untersuchung der DNA-Interaktion im N-Terminus von RamA <i>in vitro</i>	94
III.2.1 Konstruktion des <i>ramA</i> -Überexpressionsplasmides pHPAR19-01.3	95
III.2.2 Erstellung von Plasmiden zur Überexpression von RamA mit den Alaninsubstitutionsvarianten W37A, R41A und W37A+R41A.....	104
III.2.3 Konstruktion eines <i>pacrA</i> -Luziferase Reporterplasmides	107
III.2.4 Analyse der RamA-Substitutionsmutationsvarianten auf die <i>pacrA</i> - Promotorktivität sowie die Ausprägung des MDR-Phänotyps.....	110
III.3 Untersuchung des Einflusses einer <i>ramA</i> -Überexpression auf die Ausprägung eines MDR- Phänotypes in <i>Citrobacter</i>	113
III.3.1 Prüfung eines <i>ramA</i> -abhängigen MDR-Phänotypes in <i>Citrobacter freundii</i>	113
III.3.2 Prüfung eines MDR-Phänotyps bei heterologer <i>ramA</i> -Überexpression in verschiedenen Enterobakterien.....	114
III.3.3 Prüfung des Einflusses von <i>marA</i> , <i>soxS</i> und <i>rob</i> sowie <i>tolC</i> auf den <i>ramA</i> - abhängigen MDR-Effekt	116
IV. Diskussion.....	120
IV.1 Zur Speziesidentifikation im Genus <i>Citrobacter</i>	120
IV.1.1 Prüfung einzelner Methoden zur Speziesidentifikation	120

Inhaltsverzeichnis

IV.1.2 Zur Speziesbestimmung und -abgrenzung im Genus <i>Citrobacter</i>	122
IV.2 Analyse des <i>ramRA</i> -Operons im Genus <i>Citrobacter</i> im Vergleich zu anderen Spezies.....	123
IV.2.1 Analyse der <i>ramRA</i> -Operontopologie im Genus <i>Citrobacter</i>	125
IV.2.2 Homologievergleich der Gene des <i>ramRA</i> -Operons.....	127
IV.2.2.1 Analyse der Sequenzvariation in RamA	128
IV.2.2.2 Analyse der Sequenzvariation in RamR	130
IV.2.2.3 Analyse der Sequenzvariation in RomA.....	133
IV.2.2.4 Analyse des <i>ramR-ramA</i> intergenischen Bereiches in Spezies ohne <i>romA</i> - Gen.....	134
IV.2.2.5 Analyse der Variation in regulatorischen Bereichen im <i>ramRA</i> -Operon.....	136
IV.2.2.6 Phylogenie der <i>ram</i> -Gene.....	141
IV.2.2.7 Syntenie-Analyse in der Operonumgebung.....	143
IV.2.2.8 Homologievergleich von RamA mit Vertretern der AraC/XylS Proteinfamilie.....	147
IV.3 RamA und multiple drug resistance (MDR) in <i>Citrobacter spec.</i>	148
IV.3.1 Zur Überexpression von <i>ramA</i> in <i>Citrobacter</i> und anderen Enterobakterien.....	149
IV.3.2 Einfluss von Effluxpumpen.....	152
IV.3.3 Induktion des MDR-Phänotypes durch Überexpression in den <i>E. coli</i> Δ <i>marA</i> , Δ <i>soxS</i> und Δ <i>rob</i> Mutanten	153
IV.4 Analyse der DNA-Interaktion von RamA aus <i>Citrobacter koseri</i>	155
IV.4.1 Untersuchungen zur DNA-Interaktion im Strukturmodell <i>in silico</i>	155
IV.4.2 Vergleich des RamA-Modells mit der Struktur von MarA.....	157
IV.4.3 Vergleich der DNA-Interaktionen von MarA und RamA.....	160
IV.4.4 Einfluss der Aminosäuren W37 und R41 in RamA auf die Aktivierung des <i>pacrA</i> -Promotors	163
IV.4.4.1 <i>In silico</i> Analyse der RamA-Substitutionsmutationsvarianten im Modell.....	165
IV.5 Ausblick	170
V. Zusammenfassung	173
VI. Summary.....	175
VII. Literaturverzeichnis	177
VIII. Anhang.....	192
VIII.1 Ergänzende Sequenzdaten zur vorliegenden Arbeit	192
VIII.1.1 Sequenzierung von <i>ramRA</i> in den <i>Citrobacter</i> Spezies:.....	192
VIII.1.1.1 Contig-Sequenz des <i>ramRA</i> -Operons in <i>Citrobacter farmeri</i> GK2519	192
VIII.1.1.2 Contig-Sequenz des <i>ramRA</i> -Operons in <i>Citrobacter sedlakii</i> GK2552	193

Inhaltsverzeichnis

VIII.1.1.3 Contig-Sequenz des <i>ramRA</i> -Operons in <i>Citrobacter werkmanii</i> GK708.....	195
VIII.1.1.4 Partielle Sequenz des <i>ramRA</i> -Operons in <i>Citrobacter rodentium</i> GK1253.....	196
VIII.1.1.5 Analytierte DNA-Sequenz im Vektor pHPAR19-01.3.....	196
VIII.1.2 Alignments.....	197
VIII.1.2.1 <i>gyrA</i> -Alignment.....	197
VIII.1.2.2 <i>gyrB</i> -Alignment.....	198
VIII.1.2.3 Alignment der DNA-Sequenzen des <i>ramRA</i> -Operons in <i>Citrobacter spec.</i>	203
VIII.1.2.4 RamR-Alignment.....	209
VIII.1.2.5 RomA Alignment.....	211
VIII.1.2.6 RamA Alignment.....	212
VIII.2 Gefahrstoffverzeichnis.....	213
VIII.3 Abkürzungsverzeichnis.....	215
VIII.4 Publikationen zu dieser Dissertation.....	222
VIII.5 Lebenslauf.....	223
VIII.6 Danksagung.....	225
VIII.7 Eidesstattliche Erklärung.....	226

I. Einleitung

I.1 Antibiotika und Resistenz

Die Entdeckung und therapeutische Anwendung von Antibiotika ist eine der bedeutendsten Entwicklungen in der Medizingeschichte. Mit diesen Substanzen, die ausschließlich und selektiv auf Bakterien wirken, wurde es möglich, Krankheitserreger gezielt zu bekämpfen, ohne dabei den menschlichen Organismus zu schädigen.

Das durch Paul Ehrlich 1910 in der Syphilis-Therapie eingeführte Arsphenamin, mit dem Handelsnamen Salvarsan, zählt zu den ersten erfolgreich eingesetzten Antibiotika. Diese synthetische organische Arsenverbindung erwies sich als therapeutisch wirksam in der Behandlung von Spirochäten-Infektionen (Lloyd et al. 2005). Das erste Antibiotikum mit breitem Wirkungsspektrum wurde 1935 auf den Markt gebracht. Die Substanz Sulfonamidochrysoidin mit dem Handelsnamen Prontosil war der erste therapeutisch eingesetzte Vertreter der Sulfonamide, die sich von den Azofarbstoffen ableiteten. Die antibakterielle Wirkung wurde von Gerhard Domagk untersucht und beschrieben, wofür er 1939 den Nobelpreis für Medizin erhielt (Domagk 1935).

Eine weitere herausragende Bedeutung kommt der Entdeckung der antibakteriellen Wirkung von Substanzen von Schimmelpilzen zu. Nachdem diese durch Alexander Fleming 1928 an dem Ascomyceten *Penicillium notatum* untersucht und beschrieben wurde, sollte es jedoch noch bis zum Jahr 1942 dauern, bis die antibakteriell wirksame Substanz Penicillin in ausreichender Menge isoliert und therapeutisch eingesetzt werden konnte. Auch Alexander Fleming wurde für seine Untersuchungen 1945 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet (Fleming 1929).

Penicillin, der erste Vertreter der β -Lactam Antibiotika, war das erste nicht-synthetisch hergestellte Antibiotikum. Auch die danach folgenden Wirkstoffe Streptomycin, entdeckt durch Schatz, Bugle, und Waksman (1944) und das erste Tetracyclin Aureomycin, beschrieben von Duggar (1948), wurden biotechnologisch hergestellt aus *Streptomyces*-Arten (Madigan and Martinko 2006; Gupta, Rodrigues, and Soman 2015).

Doch Antibiotika wirken nicht immer und auch nicht gegen jeden Krankheitserreger. Vielmehr gibt es eine Vielzahl natürlicher Resistenzen, die Bakterien gegen ganze Substanzklassen unempfindlich machen. Diese Beobachtung wurde für Penicillin bereits 1940 noch lange vor der ersten therapeutischen Nutzung gemacht. Ebenso waren zur selben Zeit auch bereits Sulfonamid-Resistenzen bekannt (Davies and Davies 2010).

Eine Resistenz erwächst aus natürlich vorhandenen Resistenzfaktoren, z. B. übertragbaren Resistenzgenen auf mobilen DNA-Elementen wie Plasmiden, oder auch aus Mutationen in Genen

I. Einleitung

für z.B. die Angriffsziele der Antibiotika. Derartige Resistenzfaktoren liegen unabhängig von einer Antibiotikatherapie in geringer Zahl zufällig und natürlich vor. So erkannte man schon früh, dass dem Erfolg in der Antibiotika-therapie Grenzen gesetzt sind. Heute sind für alle Antibiotikaklassen Resistenzen bekannt. Eine Übersicht therapeutisch genutzter Antibiotika verschiedener Klassen, deren Wirkort und der entsprechend bekannten Resistenzmechanismen ist in **Tabelle I-1** aufgeführt.

Tabelle I-1: Übersicht der Wirkorte und bekannter Resistenzmechanismen therapeutisch eingesetzter Antibiotika (nach Morar and Wright 2010)

Substanzklasse	Beispielsubstanz	Wirkort	Resistenz
β-Lactame	Penicilline, Cephalosporine, Peneme, Monobactame	Peptidoglycan- Biosynthese	Hydrolyse, Efflux, Zielstrukturveränderung
Aminoglycoside	Gentamicin	Translation	Phosphorylierung, Acetylierung, Efflux, Zielstrukturveränderung
Glycopeptide	Vancomycin	Peptidoglycan- Biosynthese	Veränderte Peptidoglycan- Biosynthese
Tetracycline	Minocyclin	Translation	Monooxygenierung, Efflux, Zielstrukturveränderung
Macrolide	Erythromycin	Translation	Hydrolyse, Glycosylierung, Phosphorylierung, Efflux, Zielstrukturveränderung
Lincosamide	Clindamycin	Translation	Nucleotidylierung, Efflux, Zielstrukturveränderung
Streptogramine	Synercid	Translation	C-O Lyase, Acetylierung, Efflux, Zielstrukturveränderung
Oxacolidinone	Linezolid	Translation	Efflux, Zielstrukturveränderung
Chloramphenicol	Chloramphenicol	Translation	Acetylierung, Efflux, Zielstrukturveränderung
Chinolone	Ciprofloxacin	DNA-Replikation	Acetylierung, Efflux, Zielstrukturveränderung
Pyrimidine	Trimethoprim	C1-Metabolismus	Efflux, Zielstrukturveränderung
Sulfonamide	Sulfamethoxazol	C1-Metabolismus	Efflux, Zielstrukturveränderung
Rifamycine	Rifampin	Transkription	ADP-Ribosylierung, Efflux, Zielstrukturveränderung
Lipopeptide	Daptomycin	Zellmembran	Zielstrukturveränderung
Kationische Peptide	Colistin	Zellmembran	Efflux, Zielstrukturveränderung

Heute steht in Deutschland eine Bandbreite von insgesamt über 210 zugelassener Präparate und Darreichungsformen für die antibiotische Therapie zur Verfügung. Diese stammen jedoch aus weniger als 20 Substanzklassen (Internetquelle: "Rote Liste" 2016).

Von der Entdeckung bis zur Zulassung als Arzneimittel müssen neue Substanzen einen vielstufigen Prozess der Prüfung durchlaufen. Unter einer Vielzahl bereits bekannter oder neu

I. Einleitung

entdeckter antibakterieller Substanzen müssen diese ausgewählt und optimiert werden, die sich durch eine hohe Wirksamkeit, ein entsprechendes Wirkprofil und eine adäquate Wirkdauer auszeichnen und gleichzeitig eine geringe Toxizität bei einer therapeutischen Dosierung besitzen. Außerdem muss die Produktion wirtschaftlich sein.

Diese Kriterien erfüllten in den letzten 30 Jahren lediglich Substanzen aus vier Substanzklassen, die jeweils einen andersartigen Wirkungsmechanismus aufwiesen und die Marktreife erlangten: die Oxazolidinone (Linezolid, im Jahr 2000), die Lipopeptide (Daptomycin, im Jahr 2003), dann 2011 das Fidaxomicin gegen *Clostridium difficile* und das Diarylquinolin Bedaquilin in der Tuberkulosetherapie (Lewis 2013).

Ein Beispiel für eine vielversprechende neue antibakterielle Substanz aus einer neuartigen Substanzklasse ist Lugdunin. Sie wird von Bakterien der Art *Staphylococcus lugdunensis* gebildet, die bei einem Teil der Bevölkerung als Kommensale die menschliche Nase besiedeln. Lugdunin zeigte eine wachstumshemmende Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus*, welcher ebenfalls die Nase besiedeln kann und im Falle einer Resistenz gegenüber Methicillin (MRSA) ein erhebliches Risikopotential übertragbarer schwer therapierbarer Infektionen birgt. Die Struktur gleicht keinem bekannten Antibiotikum. Auch wenn der Wirkungsmechanismus bislang unbekannt ist, ist doch zu erwarten, dass auch dieser andersartig ist. Die weitere Entwicklung wird zeigen, ob die Substanz die Kriterien eines Arzneistoffes erfüllen wird (Zipperer et al. 2016). Heute muss man davon ausgehen, dass bestimmte Resistenzmuster, also Kombinationen verschiedener Resistenzen, bei einer Vielzahl von Bakterienstämmen erst durch den Einsatz von Antibiotika entstehen konnten. Dieses kann eine Vielzahl von Gründen haben, wie z. B. die Wahl inadäquater Wirkstoffe auf Basis einer unzureichenden Diagnose oder eine zu geringe Wirkstoffdosis gepaart mit mangelnder Hygiene. Die Resistenzen entstehen dabei meist nicht während einer Antibiotikatherapie, sondern liegen bereits zu Beginn vor. Resistente Bakterienstämme besitzen dann unter einer Antibiose einen Selektionsvorteil und können persistieren. Es existiert also ein Reservoir an zufälligen Mutationen und Resistenzgenen in der Umwelt, in Krankenhäusern und auch in der Massentierhaltung.

Man beobachtet heute außerdem, dass die Anzahl der Berichte von multiresistenten Keimen, also Bakterienstämme, die gegen die Antibiotika der Standardtherapie resistent sind, steigt, sowohl in den Entwicklungsländern als auch in den Industrienationen. Ein bedeutendes Beispiel sind bestimmte multiresistente Stämme des Erregers der Tuberkulose: *Mycobacterium tuberculosis* der Beijing Linie. Diese sind gegen die Antibiotika der ersten Wahl Rifampicin und Isoniazid resistent und haben sich bereits global ausgebreitet (Merker et al. 2015).

Das wachsende Problem der Multiresistenzen wurde von Wissenschaft und Politik erkannt und es wird bereits darauf reagiert. So gibt es nationale wie weltweite Bestrebungen den Einsatz von

I. Einleitung

Antibiotika genau zu überwachen und zu begrenzen. Die EU-Kommission verabschiedete 2011, auf einen Beschluss des Europaparlamentes hin, einen Aktionsplan zur Bekämpfung der wachsenden Bedrohung durch Antibiotikaresistenzen ("Action plan against the rising threats from Antimicrobial Resistance"). Dieser machte es sich zur Aufgabe, den richtigen und sinnvollen Einsatz von Antibiotika bei Mensch und Tier zu sichern und zu überwachen, den Ausbruch von Infektionskrankheiten und deren Verbreitung einzudämmen, die Entwicklung neuer Substanzen zu fördern und auch die Ausbildung sowie die Kommunikation und den Austausch zwischen medizinischem und wissenschaftlichem Fachpersonal zu fördern (Internetquelle: "Action at EU Level - European Commission" 2016).

Teil dieses Aktionsplanes der EU-Kommission ist auch das Programm „NewDrugs4BadBugs“. Dieses fördert die Zusammenarbeit zwischen öffentlichen und privaten Partnern, wie universitären Forschungseinrichtungen, Kliniken und Arzneimittelfirmen. Ziel ist es, die Erforschung neuer Antibiotika voran zu bringen, Erfahrungen aus der Forschung und Entwicklung auszutauschen, Zulassungsstudien zu verbessern sowie ökonomische Modelle zu entwickeln, um auch finanzielle Anreize für die kostenintensive Entwicklung neuer Arzneistoffe zu schaffen (hier speziell in der Themengruppe „DRIVE-AB“). Insbesondere die Kostenintensität ist eine große Herausforderung. Mit Antibiotika können im Gegensatz zu Medikamenten zur Behandlung von chronischen Erkrankungen wie Diabetes oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen geringere finanzielle Erfolge erzielt werden. So wird mit Antibiotika nur über einen verhältnismäßig kurzen Zeitraum von Tagen bis Wochen pro Patient therapiert, nämlich bis die Infektion überwunden ist. In dem oben genannten Aktionsplan der EU-Kommission ist deshalb auch eine finanzielle Forschungsförderung enthalten, welche die Kooperation zwischen Pharmaunternehmen und Forschungsinstituten mit über 220 Mio Euro unterstützt (Internetquelle: "Combating Antibiotic Resistance: New Drugs 4 Bad Bugs (ND4BB)" 2016).

Speziell die Überwachung des richtigen Einsatzes von Antibiotika wird in sogenannten Surveillance Programmen wie die DART2020 (Internetquelle: „Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie“ 2020) realisiert. Das Ziel dabei ist es Antibiotika nur dann einzusetzen, wenn sie wirklich benötigt werden und nicht etwa bei Viruserkrankungen oder bei absehbarem niedrigem Therapieerfolg durch natürlich vorliegende Resistenzen der Krankheitserreger. Somit soll einem übermäßigen Gebrauch entgegengewirkt werden. Ein weiteres Ziel ist es, bestimmte Antibiotikaklassen nur als Reservesubstanzen einzusetzen, wenn andere Therapiemaßnahmen versagt haben. Außerdem wird in entsprechenden Programmen der geografische Ursprung und die Verbreitung von Resistenzen genau überwacht, um möglichst effektive Maßnahmen dagegen ausloten zu können (Internetquelle: BMG 2016).

Surveillance-Programme und auch Forschungsförderungen sind allerdings Maßnahmen, die noch

überwiegend in den entwickelten Industrieländern greifen können, da hier entsprechende Infrastrukturen und Gesetze bestehen, die den Einsatz von Antibiotika beispielsweise durch eine Verschreibungspflicht von vornherein regeln. Entgegengesetzt liegt der größte Verbrauch von Antibiotika eher in Ländern wie China, Brasilien und allen voran Indien, in denen die Abgabe von Arzneimitteln inklusive Antibiotika an den Endverbraucher weniger stark reguliert und somit auch eine Überwachung des Einsatzes von Antibiotika vielfach eine größere Herausforderung ist, als in den westlichen Industrienationen (Van Boeckel et al. 2014). Es ist eine große Herausforderung angewendete Therapiekonzepte zu harmonisieren, um die Wirkung von Antibiotika zu erhalten.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil für die Erhaltung der Wirkung der Antibiotika ist die Grundlagenforschung zur Entstehung von Resistenzen und der zugrunde liegenden Resistenzmechanismen. Nur wenn diese genau verstanden werden, wird es auch in Zukunft möglich sein, entscheidende Ursachen für den Wirkungsverlust eines Antibiotikums und auch die Ausbreitung von Resistenzen zu identifizieren und entsprechend reagieren zu können. Zu diesem Verständnis soll die hier vorliegende Dissertationsarbeit beitragen.

I.2 Grundlagen der Antibiotikaresistenz

Als „Antibiotika“ werden therapeutisch eingesetzte Substanzen bezeichnet, die schon in geringer Konzentration eine selektive Toxizität gegenüber Mikroorganismen besitzen und auf diese wachstumshemmend oder bakterizid wirken. Dabei wurden früher unter dem Begriff „Antibiotikum“ lediglich diejenigen Antiinfektiva bezeichnet, die als natürliche Stoffwechselprodukte aus anderen Mikroorganismen gewonnen wurden, also biologischen Ursprungs waren. Diesen war die Gruppe der synthetisch hergestellten Chemotherapeutika gegenübergestellt. Da Antiinfektiva heute vielfach auch halbsynthetisch hergestellt werden und ebenso Substanzen biologischen Ursprungs auch vollständig synthetisiert werden, hat diese Begriffsabgrenzung weitestgehend an Bedeutung verloren. Außerdem ist die Bezeichnung ‚Chemotherapeutikum‘, die auch synonym für ‚Antiinfektivum‘ verwendet wurde, heute allgemein den Substanzen der Tumorthherapie vorbehalten.

Eine klinische Resistenz gegenüber einem Antibiotikum zeigt sich bei einer Unempfindlichkeit gegenüber der höchstmöglichen erreichbaren therapeutischen Serum- bzw. Gewebekonzentration dieser Substanz. Diese ist somit geringer, als die niedrigste Konzentration, bei der die Substanz noch hemmend wirkt, ausgedrückt durch die minimale Hemmkonzentration (MHK). Die Schwellenwerte der MHK, ab denen man von einer klinisch relevanten Resistenz spricht, werden von unabhängigen Organisationen wie dem Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI), der British Society For Antimicrobial Chemotherapy (BSAC) oder dem European Committee on

I. Einleitung

Antimicrobial Susceptability Testing (EUCAST) in Form von *break points* veröffentlicht, die sich nach der therapeutisch eingesetzten Konzentration der jeweiligen Substanzen richten (Internetquelle: "Home Page - CLSI" 2015; "EUCAST: EUCAST" 2015; "BSAC - The British Society for Antimicrobial Chemotherapy" 2015). Bei der Betrachtung von Resistenzen ist somit grundsätzlich zwischen der Resistenz als Mechanismus, z. B. eine Mutation, und der Stärke der Resistenzausprägung zu differenzieren, die darüber entscheidet, ob eine klinische Resistenz vorliegt oder nicht.

Antibiotika lassen sich grundsätzlich in zwei Typen einteilen: **1.** bakteriostatisch wirksame, die eine weitere Vermehrung der Mikroorganismen hemmen und **2.** bakterizid wirksame, welche zu einer Abtötung und somit zu einer deutlichen Verringerung der Anzahl der lebenden Mikroorganismen führen. Per Definition führen bakterizide Antibiotika zu einer Reduktion der Lebendzellzahl um 99,9 % innerhalb von 18-24 Stunden (Pankey and Sabath 2004). Dabei muss berücksichtigt werden, dass prinzipiell alle Antibiotika bei Erreichen einer genügend hohen Konzentration eine bakterizide Wirkung haben. Diese als minimale bakterizide Konzentration (MBK) bezeichnete Konzentration ist bei den bakteriostatisch wirksamen Antibiotika deutlich höher als die MHK, während bakterizide Antibiotika schon mit Erreichen der MHK zu einer signifikanten Keimreduktion führen.

Prinzipiell kann die Resistenz einer Spezies generell existieren (primäre Resistenz) oder aber erworben sein (sekundäre Resistenz). Dabei kann sich eine Resistenz über drei verschiedene Mechanismen ausprägen: **A)** durch eine Veränderung der Zielstruktur, also des Wirkortes der jeweiligen Substanz, **B)** durch eine enzymatische Inaktivierung der Substanz und **C)** durch eine verringerte Konzentration in der Zelle. Letztere kann in Folge eines erniedrigten Influx sowie eines erhöhten Efflux zustande kommen (Tenover 2006). Alle drei Prinzipien sind in **Abbildung I-1** schematisch dargestellt.

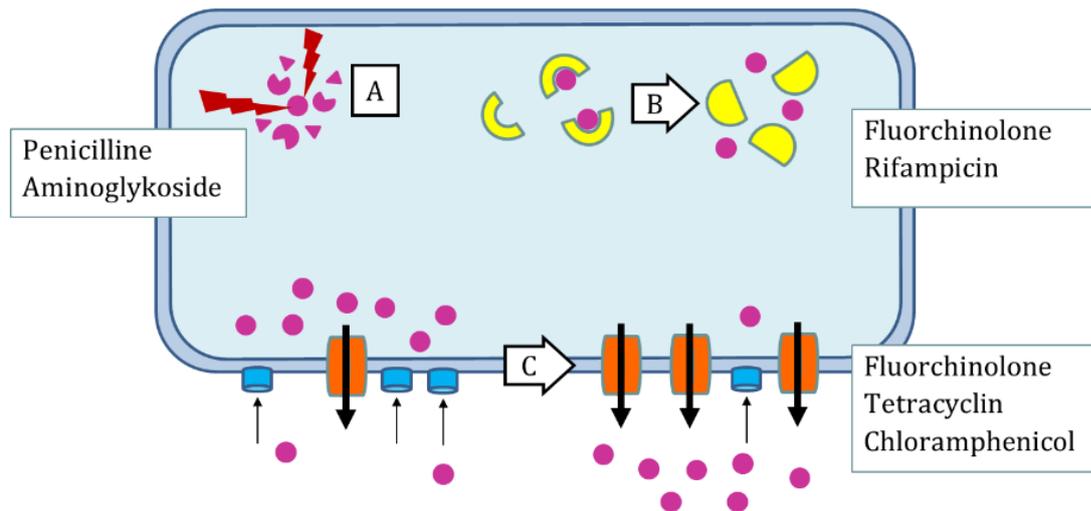


Abbildung I-1: Schematische Darstellung grundsätzlicher Mechanismen der Antibiotikaresistenz. A: enzymatische Veränderung oder Degradation des Antibiotikums, B: Veränderung des Wirkortes des Antibiotikums, C: Veränderung der Zellpermeabilität durch verringerten Influx und gesteigerten Efflux. Zu den Mechanismen sind jeweils Beispiele betroffener Antibiotikaklassen genannt (Abbildung erstellt nach Tenover (2006)).

Alle bekannten Resistenzmechanismen gehen dabei auf eine genetische Veränderung im Bakterium zurück. Diese können chromosomal- oder plasmidkodierte Gene betreffen. Insbesondere Resistenzgene, die für Enzyme kodieren werden häufig auf Plasmiden zwischen Bakterienzellen durch Konjugation übertragen. Darüber hinaus können Ereignisse wie Phageninfektionen, homologe Rekombinationen oder auch die Mobilisierung von Genen durch Transposasen vom Chromosom zu Plasmiden zu einer Übertragung von Resistenzeigenschaften zwischen Bakterienzellen führen (Shousha et al. 2015). Alle Mechanismen der Resistenzbildung werden im folgenden Kapitel am Beispiel der Gruppe der Fluorchinolone dargestellt.

I.2.1 Mechanismen der Antibiotikaresistenz am Beispiel der Fluorchinolone

Chinolone sind Hemmstoffe der bakteriellen Gyrase, weswegen sie auch als Gyrasehemmer bezeichnet werden. Es handelt sich um synthetisch hergestellte Substanzen, die eine bakterizide Wirkung haben. Die wirksameren Fluorchinolone unterscheiden sich von den älteren nichtfluorierten Vertretern durch ein breiteres Wirkspektrum, eine allgemein verbesserte Pharmakodynamik, eine höhere Wirkstärke sowie eine erschwerte Resistenzentwicklung.

Die modernen Chinolone und Fluorchinolone eint ein Chinolon Grundgerüst, das sich vom Chinolin ableitet und ein Stickstoff-Atom enthält. Sie unterscheiden sich darin von dem ersten Chinolon, der Nalidixinsäure, die noch ein Naphthyridingrundgerüst mit zwei Stickstoff-Atomen besitzt und somit streng genommen ein Naphtyridon ist. Nalidixinsäure wurde 1962 bei der Synthese des Malariawirkstoffes Chloroquin entdeckt (Lesher et al. 1962). Durch eine geringe systemische Bioverfügbarkeit infolge eines schlechten Resorptionsverhaltens nach oraler Gabe,

I. Einleitung

war der Gebrauch der Nalidixinsäure auf die Behandlung von Harnwegsinfekten beschränkt. Die Wirksamkeit war auf gramnegative Erreger begrenzt. Danach folgte eine schrittweise Weiterentwicklung der Substanz, die zu einer stetigen Verbreiterung des Wirkspektrums und der Verstärkung der Wirksamkeit führte. Zu den ersten Veränderungen gehörte der Wechsel vom NaphthyridinGrundgerüst zum Chinolingrundgerüst, die Fluorierung an Position 6 und das Anfügen eines Piperazinylrestes an Position 7. Damit war das erste Fluorchinolon im engeren Sinne entstanden, das Norfloxacin.

Heute unterscheidet man vier Generationen der Fluorchinolone: **1.** Harnwegstherapeutika mit schlechter Gewebegängigkeit und Wirkung gegenüber gramnegativen Stäbchen inklusive Pseudomonaden, z. B. Norfloxacin und Pefloxacin; **2.** Standardfluorchinolone mit verbreitertem Wirkspektrum und stärkerer Wirkung gegenüber gramnegativen Stäbchen, Pseudomonaden und einigen grampositiven, z. B. Ciprofloxacin, Ofloxacin und Enofloxacin; **3.** Fluorchinolone mit erhöhter Wirksamkeit gegen grampositive und atypische Bakterien wie Mykobakterien und Chlamydien, z. B. Levofloxacin und Sparfloxacin; **4.** Fluorchinolone mit zusätzlicher Wirkung gegenüber Anaerobiern, z. B. Moxifloxacin und Gatifloxacin. Die Fluorchinolone der 2., 3. und 4. Generation werden neben der Therapie von Harnwegsinfekten auch bei Pneumonien, Gastritis und nosokomialer Infektionen eingesetzt (Naber and Adam 1998; Blondeau 2000; Blondeau 2004; Appelbaum and Hunter 2000; Oliphant and Green 2002; Emmerson and Jones 2003).

I. Einleitung

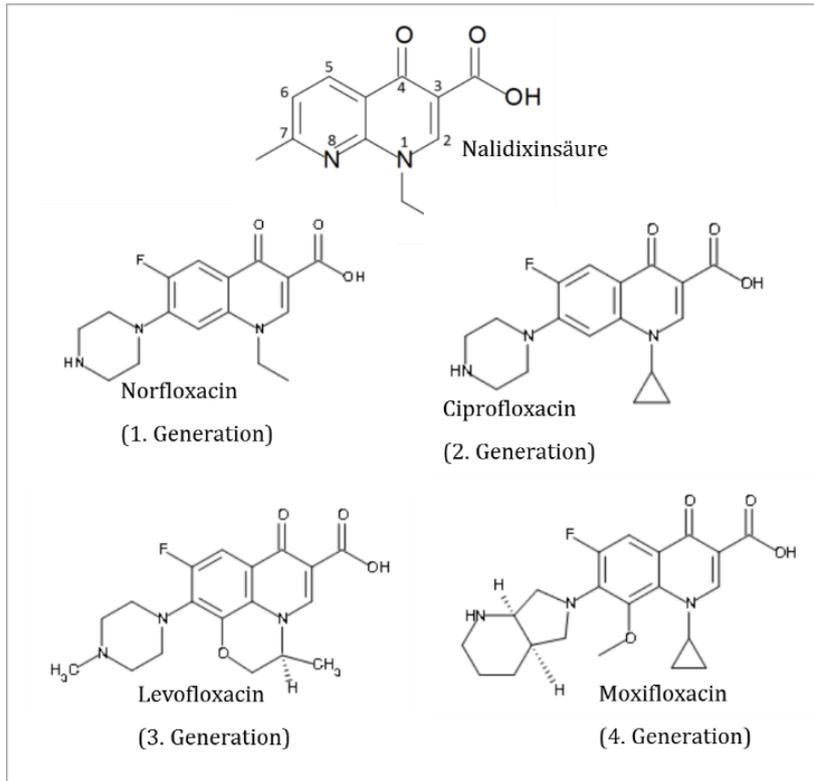


Abbildung I-2: Typische Vertreter der vier Generationen der Fluorchinolone und die Muttersubstanz Nalidixinsäure (nach Mutschler et al. 2001).

Fluorchinolone interagieren mit der bakteriellen Topoisomerase II (Gyrase) und Topoisomerase IV, die an der Verwindung und Entwindung der DNA-Doppelhelix beteiligt sind. Beide Prozesse finden während der DNA-Replikation oder der Transkription statt und ermöglichen es, die DNA-Doppelhelix dichter und somit raumsparender in der Zelle zu packen. Eine lokale Entwindung wiederum ermöglicht es dann z. B. der DNA-Polymerase während der Transkription an der DNA zu binden.

Beide Topoisomerasen sind Typ 2 Topoisomerasen, die unter ATP-Verbrauch eine Öffnung des Doppelstrangs vermitteln. Dabei wird die Phosphodiesterbindung eines Einzelstranges gespalten, die beiden Einzelstränge verwunden und anschließend wieder verschlossen. Die Gyrase vermittelt ein negatives *supercoiling* der DNA-Helix und besteht aus einem Tetramer der beiden Untereinheiten GyrA und GyrB. Die Untereinheiten der Topoisomerase IV, ParE und ParC, bilden ebenso ein Tetramer und vermitteln die Trennung beider Tochterchromosomen nach der Replikation der bakteriellen chromosomalen DNA (Hooper 1999; Blower et al. 2016; Bellon et al. 2004, Laponogov et al. 2009; Laponogov et al. 2010).

Die Fluorchinolone wirken im sogenannten ternären Komplex. Dieser besteht aus der Gyrase bzw. der Topoisomerase IV, der DNA und dem Antibiotikum. So binden die Fluorchinolone im GyrAB-DNA-Komplex zwischen den beiden Basenpaaren, die den Doppelstrangbruch flankieren (Blower

I. Einleitung

et al. 2016). Das Fluorchinolon bewirkt dabei, dass der Enzym-DNA-Komplex im Zustand der gespaltenen DNA, dem sogenannten *cleavage complex*, stabilisiert und dadurch arretiert wird. Der ablaufende Prozess der Replikation oder Transkription ist dann blockiert (Cheng et al. 2013). Somit häufen sich bei fortlaufender DNA-Replikation die Doppelstrangbrüche, was letztlich wahrscheinlich durch die Folgen einer übersteigerten Stressantwort zum schnellen Tod der Zelle führt (Kohanski et al. 2007; Peter Heisig 2009).

Eine Resistenzentwicklung kommt primär durch die Veränderung der Zielstruktur zustande. Dabei handelt es sich um Punktmutationen in den Genen *gyrA*, *gyrB*, *parE* und *parC*, die in ganz bestimmten Bereichen, den *quinolone resistance determining regions* (QRDR), zu Aminosäuresubstitutionen führen. Insbesondere die Aminosäuren Serin 83 und Aspartat 87 der QRDR von GyrA, die Aminosäure Serin 464 in GyrB sowie die Aminosäurepositionen Serin 80 und Glutamat 84 in ParC sind häufig durch Punktmutationen in den entsprechenden Codons der jeweiligen Gene verändert. Die genannten Aminosäuren in GyrA befinden sich sterisch in der Umgebung des aktiven Zentrums, welches das offene 5'-Phosphatende im *cleavage complex* bindet, wenn auch die genaue Bedeutung der einzelnen Aminosäuren noch nicht bekannt ist (Hooper 1999; Blower et al. 2016).

Im Prozess der Entwicklung von hochresistenten Bakterienstämmen kommt es zur schrittweisen Akkumulation von Zielstrukturmutationen, wobei Veränderungen in ParC und ParE erst bei vorangegangener *gyrA*-Mutation zu einer erhöhten Resistenz beitragen (P Heisig 1996; P. Heisig and Tschorny 1994).

Ein weiterer Resistenzmechanismus gegenüber Fluorchinolonen, die durch eine chromosomale genetische Veränderung zustande kommt, ist die dauerhaft erhöhte Expression von Effluxpumpen mit breitem Substratspektrum. Die wichtigste Effluxpumpe in diesem Zusammenhang ist bei *E. coli* der dreiteilige Proteinkomplex AcrAB-TolC. Die vermehrte Bildung dieser Pumpe führt dazu, dass das Antibiotikum verstärkt aus der Zelle ausgeschleust und dessen Konzentration am Wirkort somit deutlich verringert wird. Dieses kann mit einer gleichzeitig verringerten Expression von Porinen in der Zellmembran einhergehen, wodurch bereits die Aufnahme der Substanz in die Zelle verringert wird. Das veränderte Efflux/Influx Verhältnis kommt durch chromosomale Mutationen in den Genen der Transkriptionsfaktoren zustande, welche die Expression der Porine und der Effluxpumpe steuern. Diese betreffen vor allem die Transkriptionsfaktoren MarA, SoxS, Rob und bei Salmonella und *Klebsiella* auch RamA. Dabei sind die genannten Gene meist nicht selbst mutiert, sondern vielmehr deren Regulatoren. So führt beispielsweise eine Deletion in *ramR*, dem Repressor von *ramA*, zur Aufhebung der negativen Transkriptionskontrolle. Infolge dessen wird *ramA* stärker exprimiert, was dann wiederum eine stärkere Expression der Effluxpumpe zur Folge hat (Hooper 1999; Davin-Regli et al. 2008). Auf

I. Einleitung

die genannte Regulationskaskade wird im Folgenden detaillierter eingegangen, da sie den Rahmen für die Untersuchungsobjekte dieser Arbeit stellt.

Neben den Resistenzmechanismen, die durch eine chromosomale Genveränderung verursacht werden, sind für Fluorchinolone auch verschiedene auf Plasmiden übertragbare bekannt (PMQR – *plasmid mediated quinolone resistance*). Zum einen sind das die Qnr-Proteine, welche die Topoisomerasen vor der Arretierung im ternären DNA-Topoisomerase-Fluorchinolone Komplex schützen bzw. diesen auflösen. Sie weisen eine DNA-ähnliche repetitive Pentapeptidstruktur auf und man nimmt an, dass sie in ihrer Bindung mit der DNA konkurrieren. Der genaue Wirkungsmechanismus ist bislang ungeklärt. Heute sind mit QnrA, QnrB, QnrC, QnrD, QnrS und QnrVC sechs verschiedene Proteine unterschiedlichen Ursprungs bekannt, für die bereits jeweils mehrere Varianten beschrieben sind (Jacoby, Strahilevitz, and Hooper 2014; Rodríguez-Martínez et al. 2010).

Ein weiterer PMQR-Mechanismus, der eine enzymatische Inaktivierung von Fluorchinolonen vermittelt, ist mit der AAC(6′)-Ib-cr Acetyltransferase bekannt. Die Acetylierungen durch Acetyltransferasen ist ein typischer Resistenzmechanismus gegenüber Aminoglykosiden wie Kanamycin oder Amikacin. Durch die zwei Substitutionsmutationen, Tryptophan 102 zu Arginin und Aspartat 179 zu Tyrosin, sind die Acetyltransferasen auch aktiv gegenüber den Fluorchinolonen Ciprofloxacin und Norfloxacin, die beide ein sekundäres Amin am Piperazinylrest besitzen. Dieser wird von der Acetyltransferase acetyliert (Jacoby, Strahilevitz, and Hooper 2014).

Der dritte heute bekannte PMQR-Mechanismus beruht auf den übertragbaren Effluxpumpen QepA der *major facilitator* (MFS) Familie und OqxAB der *resistance-nodulation-division* (RND) Familie. Während QepA eine gesteigerte Unempfindlichkeit spezifisch gegenüber Fluorchinolonen, insbesondere Ciprofloxacin und Norfloxacin, vermittelt, umfasst das Substratspektrum von OqxAB auch Chloramphenicol, Trimethoprim und vor allem Olaquinox, welches namensgebend für die Effluxpumpe war (Jacoby, Strahilevitz, and Hooper 2014).

Resistenzen gegenüber Chinolonen, die durch Mutationen in der Gyrase verursacht werden, wurden bereits in der frühen Phase nach der Einführung der Substanzklasse 1960 berichtet (Gellert et al. 1977; Andersson and MacGowan 2003). Dagegen wurde die erste übertragbare PMQR erst 1998 beschrieben (Martinez, Bartolomé, and de la Cruz 1988). Dieses zeigt, dass im weiteren Verlauf der Anwendung der Fluorchinolone immer das Risiko der Entstehung neuer Resistenzmechanismen bestehen wird.

Weiter können auch Mechanismen, die nicht zu einer klinischen Resistenz aber, wohl aber zu einer erhöhten Toleranz gegenüber einem Antibiotikum führen, das Zeitfenster deutlich vergrößern, in dem die Bakterien teilungsfähig sind und somit die Selektion von weiteren

Zielstrukturmutationen begünstigen (Jacoby 2005).

I.2.2 Multiple drug resistance

Mikroorganismen, die Resistenzen gegenüber mehreren Antibiotika aufweisen, werden als multiresistent bezeichnet (engl. *multiple drug resistant*, MDR). Eine exakte Definition wurde von Magiorakos et al. (2012) vorgeschlagen. Danach werden Bakterienstämme, die mindestens gegenüber jeweils einer Substanz aus drei Substanzklassen unempfindlich sind, als *multiple drug resistant* bezeichnet.

Hierbei handelt es sich häufig um pathogene Keime, in denen sich mehrere Resistenzeigenschaften akkumuliert haben. Infolge dessen bleiben bei einer Infektion nur noch wenige oder gar keine Therapieoptionen mit Antibiotika mehr offen. Die Gefahr besteht vor allem durch entsprechende Bakterienstämme in Krankenhäusern, die sich hier schneller übertragen und dann ausbreiten können. Diese bieten somit ein Reservoir für genetische Resistenzeigenschaften, die wiederum auf andere Bakterienstämme übertragen werden können. Ein Beispiel hierfür ist die Beijing Linie des Tuberkuloseerregers *Mycobacterium tuberculosis*. Diese MDR-Erreger sind resistent gegen die Antibiotika der ersten Wahl für eine Behandlung: Rifampicin und Isoniazid. Ihre Ausbreitung lässt sich durch modernste Methoden der Genomsequenzierung weltweit nachvollziehen und in klonale Subgruppen unterteilen. Dabei wird die Genomsequenz der Bakterienstämme analysiert und auf übereinstimmende Muster geprüft. Aus diesen Übereinstimmungen lässt sich dann wiederum ein Stammbaum der Bakterienstämme erstellen, der dann Aufschluss über den Ursprung ihrer Ausbreitung gibt. Dieses wurde z. B. für die Bakterienstämme der Beijing Linie des Tuberkuloseerregers *Mycobacterium tuberculosis* durchgeführt (Merker et al. 2015).

I.3 Multiple Antibiotikaresistenz bei verändertem Efflux/Influx Verhältnis

Von allen Mechanismen, die zu einer Antibiotikaresistenz führen, stellt die Zellmembran die basale Abwehr gegenüber toxischen Substanzen dar. Da die Lipid-Doppelschicht auch Substanzen ausgrenzt, welche die Zelle für den Stoffwechsel benötigt, wird die unspezifische Aufnahme von Vitaminen, Zuckern und Aminosäuren durch Porine gewährleistet. Die in der äußeren Membran der gramnegativen Bakterien lokalisierten *outer membrane proteins* (OMPs oder auch Porine) bilden Poren in der äußeren Membran, durch welche wasserlösliche Substanzen in die Zelle gelangen können. Um toxische Stoffwechselprodukte oder durch Porine aufgenommene Substanzen oder Signalmoleküle aus der Zelle ausschleusen zu können, besitzen alle Gramnegativen mehrere Transportersysteme für den Efflux. Da diese zumeist ein breites Substratspektrum aufweisen, spielen sie bei der Resistenzbildung gegenüber Antibiotika eine

wichtige Rolle. So kann ein gesteigerter Efflux bei simultan reduziertem Influx zu einer Verringerung der Empfindlichkeit gegenüber mehreren Antibiotika verschiedener Substanzklassen führen, was auch als *multiple-drug-resistance* (MDR) Phänotyp bezeichnet wird (Davin-Regli et al. 2008; H. Nikaido and Pagès 2012; Delmar, Su, and Yu 2014). Die Ausbildung des MDR-Phänotyps einzig über einen gesteigerten Efflux führt häufig nicht zu einer klinisch relevanten Resistenz. Jedoch verschafft er unter dem Selektionsdruck einer Antibiotikaeinwirkung einen Vorteil, durch den eine größere Anzahl an Bakterien überlebt. Somit steigt auch die Wahrscheinlichkeit der Entstehung weiterer Mutationen, die wiederum zu einer erhöhten Resistenz führen und somit erneut einen Selektionsvorteil verschaffen können. Das Hervorbringen von Zielstrukturmutationen und die Entstehung hochresistenter Stämme unter Antibiotikatherapie kann somit durch den MDR-Phänotyp begünstigt werden. Insbesondere Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen tauchen häufig in Kombination mit einem MDR-Phänotyp auf (Oethinger et al. 2000; Baucheron et al. 2002; Jacoby 2005).

Eine weitere wichtige Rolle spielen Effluxpumpen für das Ausschleusen von Signalmolekülen für die Zell-Zellkommunikation (Yang, Lopez, and Zechiedrich 2006), für die Ausprägung von Virulenzeigenschaften (Webber et al. 2009) sowie für die Zellteilung (Lau and Zgurskaya 2005).

I.3.1 Die Effluxpumpen der Enterobakterien

Man teilt die heute bekannten Effluxpumpen aufgrund von Aminosäure-Sequenzhomologien, Funktionsmechanismus und Substratspezifität in fünf Superfamilien ein: **1.** die *adenosine triphosphate* (ATP) *binding cassette* (ABC) Transporter, z. B. Sav1866 aus *Staphylococcus*, **2.** Die *major facilitator superfamily* (MFS), z. B. EmrD aus *E. coli*, **3.** die *resistance-nodulation-division* (RND) Superfamilie, z. B. AcrB aus *E. coli*, **4.** die *small multidrug resistance* (SMR) Superfamilie, z. B. EmrE aus *E. coli* und **5.** die *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE) Superfamilie mit als NorM-VC aus *Vibrio cholera* als Beispiel (Higgins 2007; Delmar, Su, and Yu 2014; He et al. 2010). Während die Effluxpumpen der ABC-Superfamilie die Energie für den Transport direkt aus der Hydrolyse von ATP ziehen, transportieren die MFS-, SMR- und RND-Pumpen abhängig vom Protonengradienten, der sich über der inneren Zellmembran erstreckt. Transporter der MATE-Superfamilie funktionieren ebenfalls gradientenabhängig über einen H⁺ oder Na⁺-Antiport. Einzig die RND-Transporter überspannen dabei die innere und äußere Membran und können Substrate aus dem Cytosol direkt über den periplasmatischen Spalt hinweg in das umgebende Milieu transportieren. Die Superfamilien sind in **Abbildung I-3** schematisch dargestellt.

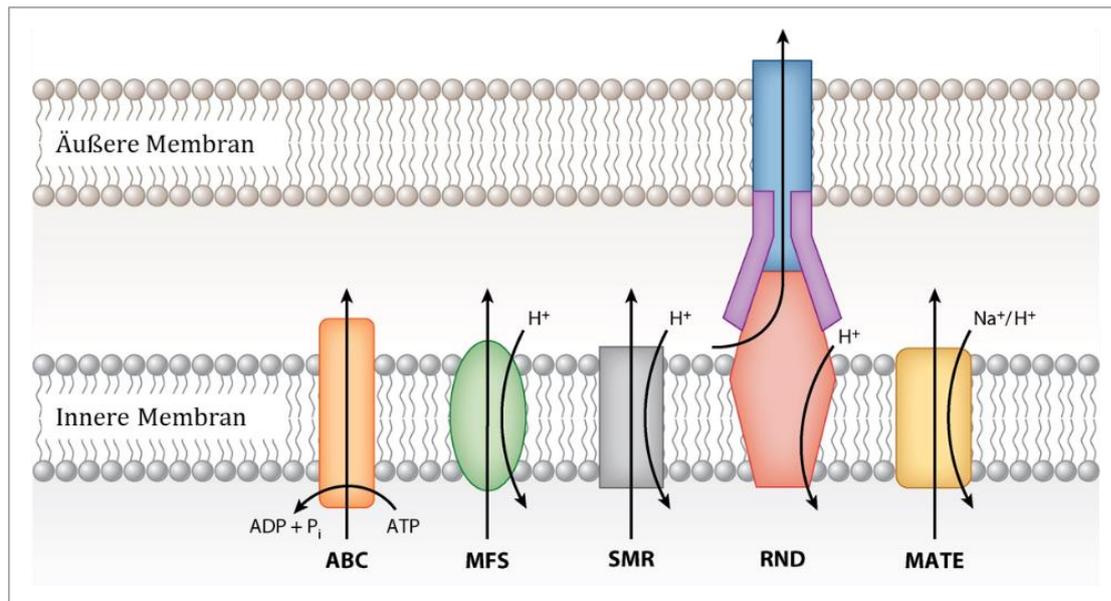


Abbildung I-3: Schematische Darstellung der fünf Superfamilien bakterieller Effluxpumpen (Delmar, Su, and Yu 2014).

Die RND-Transporter lassen sich weiter in zwei Unterfamilien einteilen: **1.** die hydrophoben sowie amphiphilen Efflux RND-Pumpen (HAE-RND), zu denen die AcrB Pumpe zählt und **2.** die Schwermetall RND-Pumpen (*heavy metal*, HME-RND), zu denen die Pumpe CusA gehört, die eine Toleranz gegenüber den toxischen Metallen Kupfer und Silber vermittelt (Long et al. 2010). Da in dieser Arbeit insbesondere die Bedeutung einer veränderten Regulation der RND-Effluxpumpe AcrAB-TolC für der Ausprägung einer erhöhten Antibiotikatoleranz im Fokus steht, wird im Folgenden auf diese detailliert eingegangen.

I.3.2 Die MDR-Effluxpumpe AcrAB-TolC

Die Effluxpumpe AcrAB-TolC aus *E. coli* und anderen gramnegativen Enterobakterien wie *Salmonella enterica* bildet zusammen mit der ebenfalls dreiteiligen Pumpe MexAB-OprM aus *Pseudomonas aeruginosa* den Archetyp der RND-Transporter. Ihre dreiteilige Struktur, bestehend aus den Komponenten AcrA, AcrB und TolC überspannt den periplasmatischen Raum vollständig, wobei die eigentliche Pumpe AcrB in der inneren Membran und der Tunnel TolC transmembranal in der äußeren Membran lokalisiert sind (siehe **Abbildung I-4**). AcrA stellt ein stabilisierendes Verbindungsstück zwischen AcrB und TolC dar. Wenngleich auch von allen drei Komponenten, AcrA, AcrB und TolC die Proteinstrukturen bekannt sind (Mikolosko et al. 2006; Murakami et al. 2002; Koronakis et al. 2000), gelang die kristallografische Darstellung des gesamten Komplexes bislang nicht. Stöchiometrische Analysen ergaben jedoch, dass die Komponenten AcrB : AcrA : TolC in einem Verhältnis von 3 : 6 : 3 vorliegen (Janganan et al. 2011).

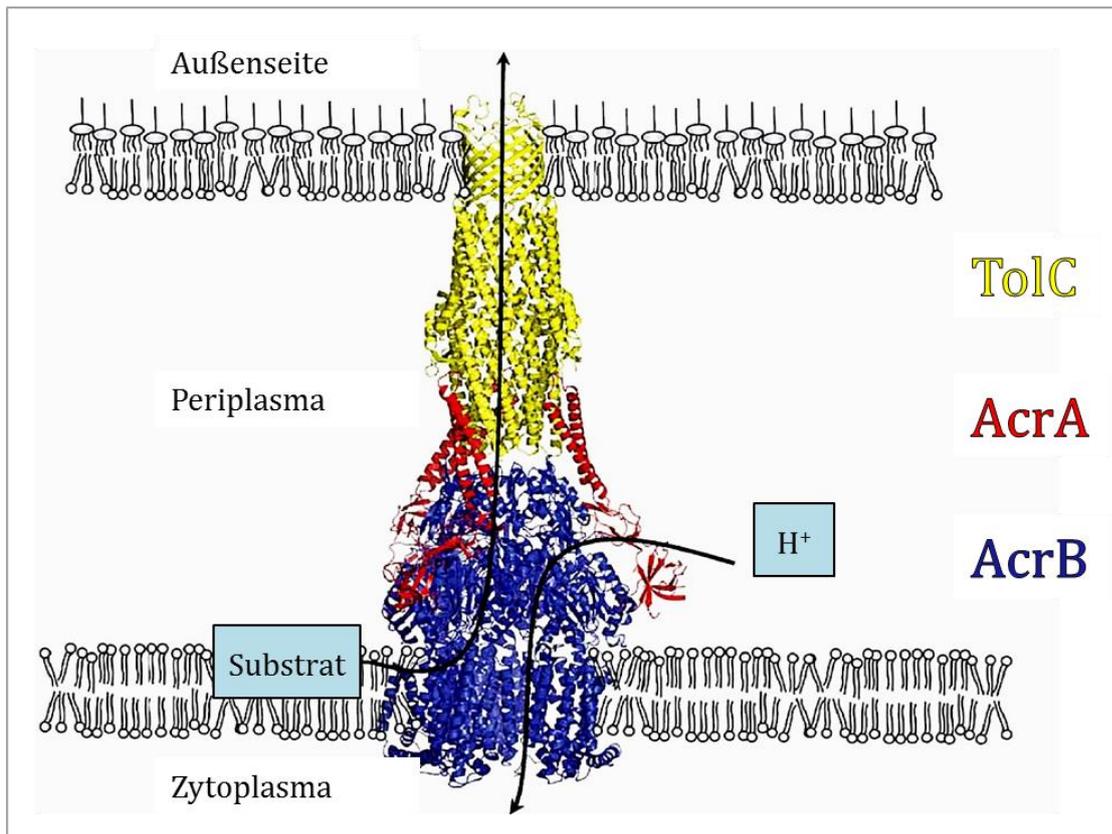


Abbildung I-4: Die dreiteilige MDR Effluxpumpe AcrAB-TolC. Nach Seeger et al. 2008.

AcrB bildet demnach ein Trimer in der inneren Membran und besitzt eine Transmembrandomäne, bestehend aus 12 α -Helices und eine porenförmige TolC-Bindedomäne, die mit drei zentralen α -Helices eine Art Trichter bildet, auf dem das TolC-Trimer aufsitzt (Tamura et al. 2005; Murakami et al. 2002). Beim Transportvorgang kommt dem AcrB-Trimer die Aufgabe der Substrataufnahme und -selektion sowie die Substratweitergabe an den TolC-Tunnel zu. Dabei durchlaufen die AcrB-Monomere in rotierender Folge drei Konformationsstufen: L (locker/frei, engl. *loose*), T (eng/gespannt, engl. *tight*) und O (offen, engl. *open*) (Pos 2009; Murakami et al. 2006) (siehe **Abbildung I-5**). In der L-Konformation kommt es zur Bindung des Substrates, welches hin zur T-Konformation durch einen sich öffnenden helicalen Tunnel in eine hydrophobe Substrattasche innerhalb von AcrB transportiert wird. Diese Tasche besteht ausschließlich in der T-Konformation. In der sich anschließenden O-Konformation kommt es zur Freigabe des Substrates in den TolC-Tunnel. Die Substrataufnahme findet an einer lateralen Tasche von AcrB in der L-Konformation statt, die sich direkt über der inneren Membran auf der periplasmatischen Seite befindet. Nach wie vor ist ungeklärt, ob sämtliche Substrate dort aus der inneren Zellmembran oder dem Periplasma aufgenommen werden. Eine Substrataufnahme direkt aus dem Cytosol ist jedoch unwahrscheinlich (Pos 2009).

I. Einleitung

Die Energie für den Transport und die Konformationsänderungen innerhalb des AcrB-Trimers stammt aus dem Protonengradienten. Dessen elektrochemisches Energiepotential wird über einen H⁺/Substrat-Antiport in eine physische Bewegung umgewandelt. Die Protonen werden dabei aus dem Periplasma von AcrB in der L-Konformation aufgenommen. Eine transiente Protonierung führt dann zur Bildung der T- und O-Konformation. Der Vorgang der anschließenden Deprotonierung ist bislang jedoch unverstanden (Murakami et al. 2006; Sennhauser et al. 2007). Im Gegensatz zur ATPase findet bei der funktionellen Rotation der AcrB-Konformationsstufen sehr wahrscheinlich keine physische Drehbewegung statt (Pos 2009).

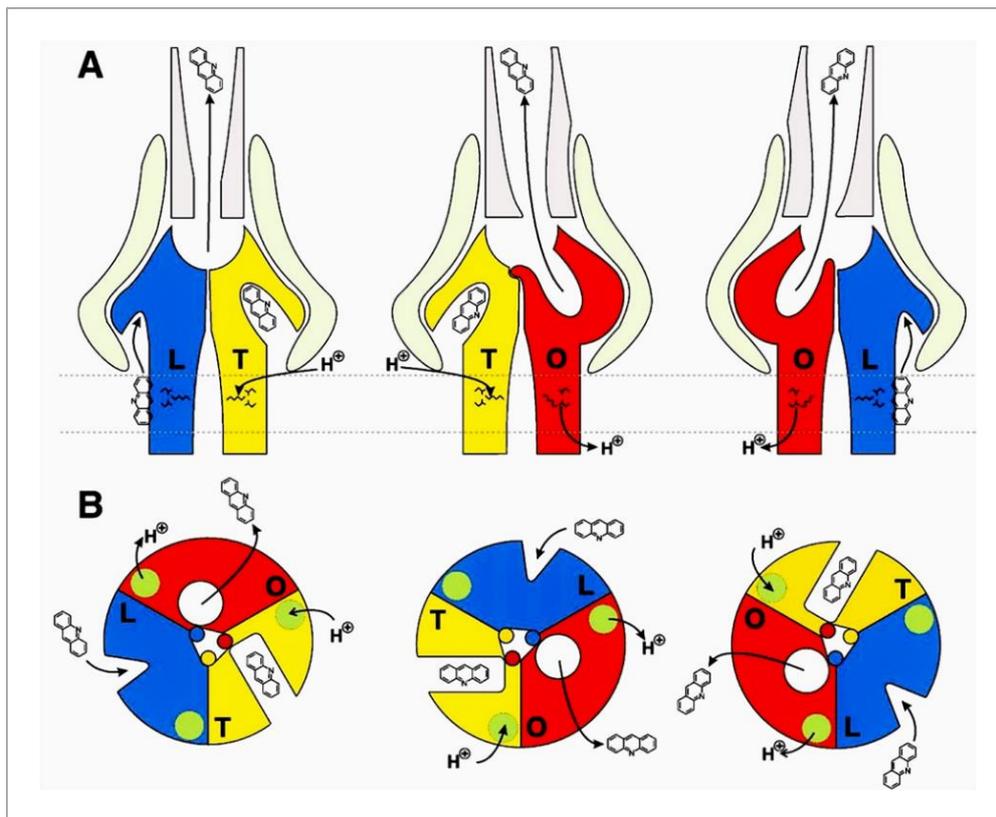


Abbildung I-5: Schematische Darstellung des Pumpmechanismus bei der Substrataufnahme aus der inneren Membran oder dem Periplasma und Weitergabe an den TolC-Tunnelkomplex A) in der Seitenansicht der AcrAB-TolC-Effluxpumpe und B) in der Aufsicht auf das AcrB-Trimer. AcrB-Konformationsstufen: L: Substratbindung (locker/frei, engl. *loose*), T: Substrataufnahme (eng/gespannt, engl. *tight*) und O: Substratfreigabe (offen, engl. *open*). Die Konformationsänderung in AcrB wird durch AcrA auf den TolC-Tunnel übertragen und verursacht in diesem eine peristaltische Bewegung der Monomere (Seeger et al. 2008).

Die Substratspezifität kommt wahrscheinlich durch die genannte hydrophobe Substrattasche der T-Konformation von AcrB zustande (Elkins and Nikaido 2002; Murakami et al. 2006; Pos 2009). Das Substratspektrum umfasst eine Vielzahl an Substanzen unterschiedlicher Größe strukturell nicht verwandter Stoffgruppen (siehe **Abbildung I-6**). Zu diesen gehören kurzkettige

I. Einleitung

Kohlenwasserstoffe, aromatische Verbindungen, Farbstoffe, Detergenzien und Antiseptika wie das Acriflavin, welches namensgebend für die Acr-Proteine war (Nakamura 1965; Nakamura 1968). Daneben umfasst das Substratspektrum auch diverse Antibiotika aus verschiedenen Substanzklassen wie Ciprofloxacin (Fluorchinolone), Minocyclin (Tetracycline), Oxacillin (β -Lactam) und Erythromycin (Macrolide) (Seeger et al. 2008). Eine Gemeinsamkeit lässt sich jedoch im überwiegend lipophilen Anteil der Substanzen finden (Seeger et al. 2008). Für β -Lactamantibiotika wurde gezeigt, dass diese nur bei genügender Lipophilie der Seitenkette durch die AcrAB-TolC Pumpe transportiert werden können (H. Nikaido et al. 1998). Aktuellere Untersuchungen haben ergeben, dass die Substratspezifität auch abhängig von AcrZ ist. Dieses kleine nadelförmige Protein ist konserviert in den Enterobakterien und bildet einen Komplex mit AcrB. Die genaue Bedeutung ist jedoch noch ungeklärt (Hobbs et al. 2012; Du et al. 2014).

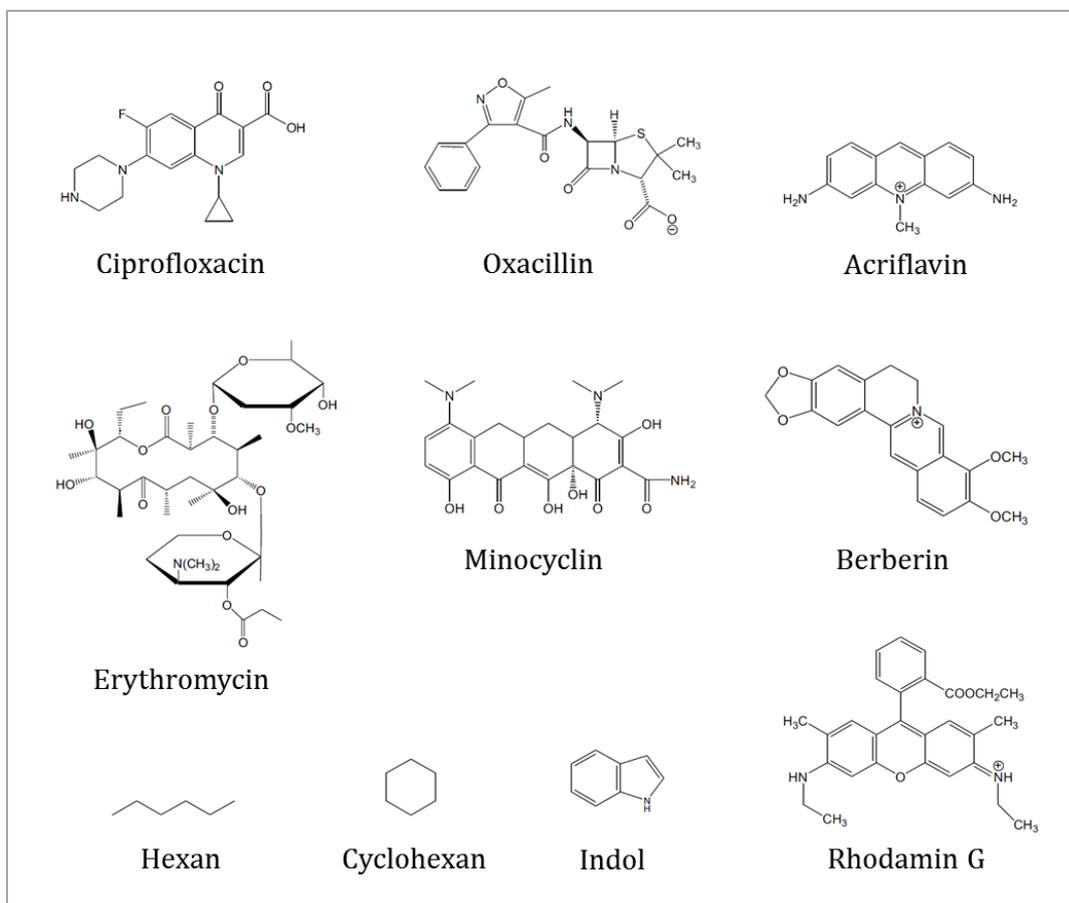


Abbildung I-6: Beispiele für Substanzen des Substratspektrums der AcrAB-TolC-Effluxpumpe. Nach Pos 2009.

Der Tunnel durch das Periplasma und über die äußere Membran besteht aus einem TolC-Trimer. Die Transmembrandomäne besteht aus β -Faltblättern, die eine Faserstruktur (engl. *β -barrel*) bilden und so eine Pore in der äußeren Membran formen. Die AcrB proximale Tunneldomäne

I. Einleitung

besteht dagegen aus parallelen α -Helices. Liegt das TolC-Trimer isoliert vor, ist dieser helicale Tunnel durch eine Verschraubung der Helices geschlossen. Der Vorgang der Öffnung vollzieht sich sehr wahrscheinlich durch die direkte Interaktion mit AcrA bei der Assemblierung des AcrA-AcrB-TolC Pumpenkomplexes, indem der TolC-Tunnel dauerhaft geöffnet ist (Koronakis et al. 2000; Bavro et al. 2008; Janganan et al. 2013; Du et al. 2014). Die durch AcrB in den TolC-Tunnel transportierten Substrate passieren diesen sehr wahrscheinlich nicht einzeln, sondern aufgereiht in direkter Folge hintereinander weg (Pos 2009), wobei sie, unterstützt durch eine peristaltische Bewegung der TolC-Monomere aus der Zelle geschleust werden (Vaccaro, Scott, and Sansom 2008).

Diese Peristaltik wird dabei sehr wahrscheinlich über die AcrA-Monomere von der funktional rotierenden AcrB-Pumpe auf die TolC-Tunnelproteine übertragen (Seeger et al. 2006) (siehe **Abbildung I-5**). Weiter kommt AcrA eine stabilisierende Rolle des gesamten Pumpenkomplexes zu, indem es einen Trichter um die AcrB-TolC-Kontaktregion herum formt. Darüber hinaus ist im Prozess der Assemblierung der gesamten Pumpe eine Konformationsänderung in AcrA in der membranproximalen Domäne, die an AcrB bindet, entscheidend für die Ausbildung des funktionalen AcrAB-TolC Komplexes. Die exakte Reihenfolge der Assemblierung ist noch nicht genau verstanden. Auf Grund von Interaktionsstudien wurde postuliert, dass zunächst AcrB und TolC einen Komplex bilden, an den dann das AcrA-Hexamer bindet (Tikhonova, Yamada, and Zgurskaya 2011). Die Ausbildung des dreiteiligen Gesamtkomplexes benötigt keine weitere Energie und geschieht substratunabhängig (Tikhonova and Zgurskaya 2004).

Der AcrAB-TolC Effluxpumpe wird neben der Funktion der Abwehr von toxischen Substanzen wie Gallensalzen, die das Überleben der Enterobakterien im Darm ermöglicht (Thanassi, Cheng, and Nikaido 1997) auch eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Virulenz pathogener *Salmonella enterica* oder *Pseudomonas aeruginosa* Stämme zugesprochen (Piddock 2006; H. Nikaido and Pagès 2012; E. Nikaido, Yamaguchi, and Nishino 2008). Ebenso wird vermutet, dass der Transport von Signalmolekülen des *quorum sensing* eine wichtige Funktion der AcrAB-TolC Effluxpumpe darstellt (Rahmati et al. 2002). Von entscheidender klinischer Bedeutsamkeit ist jedoch, dass Antibiotika der unterschiedlichsten Substanzklassen zu ihrem Substratspektrum gehören und eine gesteigerte Expression der Pumpenkomponenten zur Ausbildung eines MDR-Phänotyps führt (Davin-Regli et al. 2008). Unter allen Effluxpumpen sind die MDR Transporter AcrAB-TolC und MexAB-TolC am häufigsten durch eine Überproduktion an der Resistenzbildung klinisch relevanter Isolate beteiligt, die mit humanen Infektionskrankheiten assoziiert sind (H. Nikaido and Pagès 2012). Auch bei der Ausbildung von Fluorchinolonresistenzen in hochresistenten Bakterienstämmen spielt der AcrAB-TolC abhängige MDR-Phenotyp eine entscheidende Rolle. So führt die verringerte Empfindlichkeit eines Bakteriums mit MDR-Phänotyp alleine zwar nicht zu

einer klinischen Resistenz gegenüber dem Antibiotikum, jedoch begünstigt sie die Entstehung von Mutationen in den Zielstrukturen der Fluorchinolone und somit das Hervorbringen klinisch relevanter Resistenzen (Oethinger et al. 2000; Baucheron et al. 2002; Jacoby 2005).

Die Mechanismen, die zu einer Überproduktion der MDR-Pumpe AcrAB-TolC und in Folge dessen zu einem erhöhtem Efflux und der Ausbildung des MDR-Phänotyps führen, beruhen zumeist auf chromosomalen Mutationen im Regulationsnetzwerk der Gene der Pumpenkomponenten *acrAB* und *tolC* (Davin-Regli et al. 2008). Auf dieses Regulationsnetzwerk soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

I.4 Regulatoren der AcrAB-TolC Effluxpumpe

Die Zellen der Enterobakterien sind in der Lage das Efflux/Influx Verhältnis an ihren Membranen dynamisch zu modulieren, wodurch sie sich wechselnden Umgebungsbedingungen anpassen können. Diese Anpassung erfolgt maßgeblich über eine vermehrte Expression von Efflux-Pumpen bzw. über eine verminderte Expression von Porinen (Davin-Regli et al. 2008). Das Verhältnis zwischen Efflux und Influx ist also nicht fest vorgegeben, sondern vielmehr das Resultat ineinander greifender Regulationsmechanismen, in denen unterschiedliche Regulationsfaktoren verschiedenste Reize aus dem Zelläußeren aber auch -inneren wahrnehmen und weitergeben. Durch ihr breites Substratspektrum spielt die AcrAB-TolC Effluxpumpe dabei eine entscheidende Rolle.

Nach dem heutigen Kenntnisstand wird ein erhöhter Efflux und die damit einhergehende erhöhte Resistenz maßgeblich durch den Expressionsstatus der Pumpengene beeinflusst. So findet man in klinischen MDR-Isolaten häufig eine erhöhte Expression der Gene *acrA* und *acrB* (Swick et al. 2011). Der Effluxstatus wird dabei maßgeblich durch die genetische Regulation bewirkt (Li and Nikaido 2004; Grkovic, Brown, and Skurray 2002; H. Nikaido and Pagès 2012). Bei den Regulatoren kann unterschieden werden zwischen jenen, die lokal und jenen, die global in der Zelle aktiv sind. Das Regulon, also die Gesamtheit der von ihnen regulierten Gene, beinhaltet bei den lokalen Regulationsfaktoren ausschließlich die Gene der Pumpe. Dagegen ist das Regulon der globalen Regulationsfaktoren sehr viel umfassender. Über diese Regulatoren ist die Zelle in der Lage den Efflux sowohl zu stimulieren als auch zu vermindern.

I.4.1 Lokale Regulatoren der AcrAB-TolC Effluxpumpe

Der lokale Transkriptionsregulator der *acrA*- und *acrB*-Expression ist das Protein AcrR (Ma et al. 1996). Dessen Gen *acrR* wird konstitutiv exprimiert und ist in einem Operon mit den Genen *acrA* und *acrB* organisiert (siehe **Abbildung I-7**). Letztere werden ausgehend von einem Promotorbereich transkribiert, der eine Bindestelle für AcrR enthält. Gebunden an diese

Operatorsequenz auf der DNA wirkt AcrR als Repressor der *acrAB*-Expression, da er das Voranschreiten des RNA-Polymerasekomplexes bei der Transkription blockiert (Routh et al. 2009). AcrR gehört zur Familie der TetR-Transkriptionsfaktoren und ist in der homodimeren Form aktiv, wobei die 28 bp lange Bindestelle 5'-TTTACATACATTTGTGAATGTATGTACC-3' von zwei AcrR-Homodimeren gebunden wird (Su, Rutherford, and Yu 2007). Diese Bindung wird durch die Interaktion mit verschiedenen Substanzen inhibiert, was für Ethidium, Proflavin und Rhodamin 6G gezeigt werden konnte (Su, Rutherford, and Yu 2007; Su, Nikaido, and Yu 2007). AcrR ist also auch ein Sensor chemischer Signale, der die Expression der AcrAB-TolC Effluxpumpe beeinflusst. Mutationen, die zu einem Funktionsverlust von AcrR führen, sind mit einer dauerhaften Überexpression und somit auch mit der Bildung eines MDR-Phänotyps assoziiert. Dieses wurde auch in klinischen MDR-Isolaten beschrieben (Pradel and Pagès 2002; Olliver et al. 2004).

Ein weiterer lokaler Repressor ist AcrS, dessen Gen *acrS* in einem Operon mit den Genen *acrE* und *acrF* lokalisiert ist. Letztere kodieren für die Komponenten der AcrEF-TolC Effluxpumpe, die in weiten Teilen homolog zur AcrAB-TolC Effluxpumpe ist (Ma et al. 1993), als Multisubstrattransporter in Zusammenhang mit Antibiotikaresistenzen jedoch eine untergeordnete Rolle spielt (Nishino and Yamaguchi 2004; Sulavik et al. 2001). Untersuchungen haben gezeigt, dass AcrS potentiell auch als Repressor im *acrRAB*-Operon aktiv sein kann und an die gleiche Bindestelle wie AcrR bindet. Die physiologische Bedeutung ist bislang noch unzureichend geklärt, die Interaktion der Regulatoren beider Pumpensysteme deutet jedoch darauf hin, dass über die kreuzweise Repression eine für die Zelle unvorteilhafte Übersteigerung des Efflux verhindert werden kann (Hirakawa et al. 2008).

I.4.2 Globale Regulatoren der AcrAB-TolC Effluxpumpe

Eine Überexpression von *acrAB* und *tolC* als Reaktion der Wechselwirkung mit einer sehr viel größeren Zahl und Diversität an Substanzen aus der Zellumgebung aber auch mit Stoffwechselmetaboliten aus dem Zellinneren ist von globalen Transkriptionsfaktoren abhängig. Die Regulatoren mit dem größten Einfluss in den Enterobakterien sind MarA, SoxS, Rob und RamA, wobei letzterer z. B. in *Salmonella*, *Klebsiella* und *Enterobacter*, nicht aber in *E. coli* vorhanden ist (Ruiz and Levy 2013; Davin-Regli et al. 2008). Alle gehören zur Proteinfamilie der AraC/XylS-Transkriptionsfaktoren (Gallegos et al. 1997). Diese bestehen aus zwei strukturellen Domänen: der meist C-terminalen DNA-Bindedomäne und der Effektor- oder auch Multimerisierungsdomäne. Während die DNA-Bindedomäne eine konservierte Aminosäuresequenz besitzt, die für zwei Helix-Turn-Helix Motive kodiert, ist die zweite Domäne sehr variabel unter den verschiedenen Regulatoren. Ebenso die Interaktionspunkte mit der RNA-Polymerase (RNAP)

I. Einleitung

(Gallegos et al. 1997; Robert G Martin and Rosner 2001). Funktionell können die Regulatoren in drei Gruppen eingeteilt werden: **1.** Regulatoren des Katabolismus von Kohlenstoffquellen (z. B. AraC aus *E. coli*), von Aminosäuren (z. B. MmsR aus *Pseudomonas aeruginosa*), Nitroverbindungen (OruR aus *Pseudomonas aeruginosa*) und Benzen-Derivaten (z. B. XylS aus *Pseudomonas putida*), **2.** Regulatoren der zellulären Stressantwort (z. B. MarA und SoxS aus *E. coli*) und **3.** Regulatoren der Expression spezifischer Virulenzgene (z. B. PerA aus enteropathogenen *E. coli* Stämmen) (Ibarra et al. 2008). Die Regulatoren der AcrAB-TolC Effluxpumpe MarA, SoxS, Rob und RamA sind Transkriptionsaktivatoren der zweiten Gruppe. Sie binden alle jeweils als Monomere an dieselbe 20 bp lange DNA-Bindungssequenz in den Promotorbereichen von *acrAB* und *tolC*, der sogenannten marbox (Duval and Lister 2013). Die Spezifität der Bindungssequenz kommt durch eine Konservierung der DNA-Bindedomänen in MarA, SoxS und Rob zustande, was durch entsprechende Strukturanalysen gezeigt werden konnte (R. G. Martin et al. 1999; Kevin L Griffith and Wolf 2002; Kwon et al. 2000). Bei der DNA-Interaktion binden die Monomere immer einseitig an der DNA-Helix und zwar auf derselben Seite, auf der auch die -10 Region des jeweiligen Zielpromotors lokalisiert ist (R. G. Martin et al. 1999).

Die Regulation der Transkriptionsfaktoren unterliegt mit MarR für MarA, SoxR für SoxS und RamR für RamA wiederum lokalen Repressoren, die jeweils in einem Operon mit ihrem Zielgen (*marA*, *soxS* bzw. *ramA*) organisiert sind. MarA, SoxS und RamA werden also nicht konstitutiv sondern *de novo* bei einer entsprechenden Freigabe durch ihre lokalen Repressoren gebildet. Diese steht in direktem Zusammenhang mit der Wechselwirkung verschiedener Substrate aus der Umgebung der Zelle. Damit die Wirkung der Transkriptionsfaktoren nicht dauerhaft erhalten bleibt, werden diese proteolytisch wieder degradiert. Nachweislich werden alle MarA, SoxS und RamA durch LonA, eine ATP abhängige Protease, abgebaut, wobei jeweils die N-terminale Domäne der Proteine eine bedeutende Rolle bei der Erkennung spielt (Ricci, Blair, and Piddock 2013; Kevin L. Griffith, Shah, and Wolf 2004; Shah and Wolf 2006). Dieses macht die zeitlich begrenzte Anpassung gegenüber wechselnden äußeren Einflüssen möglich.

SdiA (*Suppressor of Division Inhibition*) ist ein weiterer Regulator, der mit einer Überexpression der AcrAB-TolC Effluxpumpe assoziiert ist. Dieser ist maßgeblich an der Regulation der Zellteilung beteiligt über eine direkte Interaktion mit dem Promotor des *ftsQAZ* Genclusters. Diese Gene sind essentiell für die Zellteilung. Das Gen *sdiA* stimuliert die Expression der *ftsQAZ* Gene, was mit einer erhöhten Zellteilungsrate einhergeht (Wang, de Boer, and Rothfield 1991). Die Regulation tritt dabei in Wechselwirkung mit der Zelldichte über ein *quorum sensing* Mechanismus (Sitnikov, Schineller, and Baldwin 1996). Eine Abhängigkeit der *acrAB*-Expression von SdiA spricht dafür, dass die Pumpe AcrAB-TolC auch im Transport von Signalmolekülen eine bedeutende Rolle spielt (Rahmati et al. 2002). Eine Beteiligung einer Überexpression von *sdiA* bei der Ausprägung einer

Multiresistenz wurde für *E. coli* bereits beschrieben (Tavío et al. 2010).

Da insbesondere die Regulationssysteme *marRAB*, *soxRS*, *rob* und *ramRA* mit der Entstehung von multiplen Antibiotikaresistenzen assoziiert sind, werden sie in den folgenden Kapiteln detailliert vorgestellt. In **Abbildung I-7** ist das Regulationsnetzwerk der globalen und lokalen Transkriptionsfaktoren der AcrAB-TolC Effluxpumpe schematisch dargestellt.

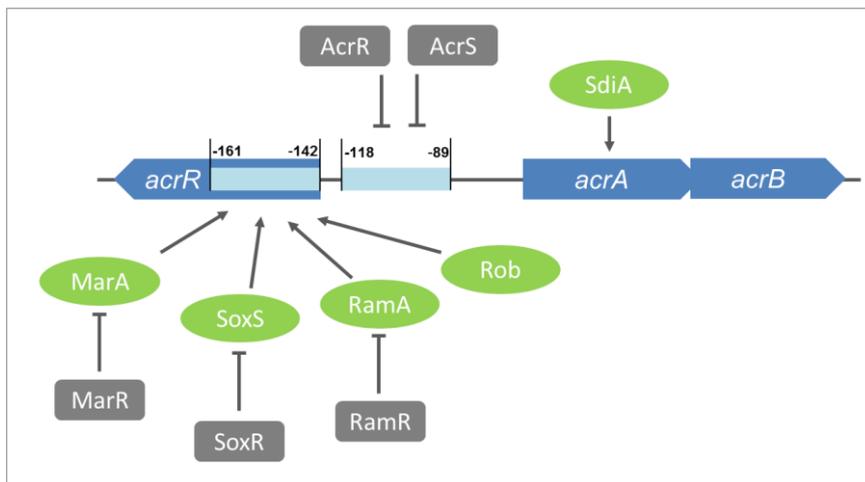


Abbildung I-7: Schematische Darstellung der Regulation der AcrAB-TolC Effluxpumpe unter Einfluss globaler (grün) und lokaler (grau) Transkriptionsfaktoren. Die Pfeile zeigen die jeweilige Interaktion der entsprechenden Regulatoren mit der DNA-Sequenz an (→: positive, ←: negative Stimulation der *acrAB*-Expression). Die Zahlen geben die Position auf der DNA im Bezug auf das Start-Codon von *acrA* an. Nach Nishino, Nikaido, and Yamaguchi (2009).

Ein Efflux vermittelter MDR-Phänotyp kann folglich durch drei Arten von Mutationen im Regulationsnetzwerk zur Überexpression der AcrAB-TolC Pumpe führen: **1.** Mutationen, die zum Funktionsverlust eines lokalen Repressors führen (in AcrR oder AcrS), **2.** Mutationen, die zum Funktionsverlust eines Repressors eines globalen Transkriptionsaktivators führen (z. B. in MarR oder RamR) und **3.** Mutationen in den Bindestellen der Repressoren, die zu einem Verlust der Negativregulation der Pumpe oder eines ihrer Transkriptionsaktivatoren führt (z. B. AcrR-Bindestelle im *pacrAB* oder MarR-Bindestelle im *pmarRAB*) (Piddock 2006a).

I.4.2.1 Regulation durch MarA

Der Transkriptionsfaktor MarA ist ein Aktivator der Gene *acrAB* und *tolC* und bindet in deren Promotorbereich als Monomer (127 Aminosäuren) an eine spezifische DNA-Erkennungssequenz, die marbox. Die Bindung wird durch zwei Helix-Turn-Helix Motive bewerkstelligt, die in die zwei benachbarten großen Furchen der DNA-Helix hineinragen, welche die 20 bp umfassende degenerierte marbox enthält (siehe I.4.2.5). Bei dieser Bindung wird die DNA-Helix um ca. 35°

gebogen (Rhee et al. 1998). Das Protein umfasst weiter eine Domäne zur Interaktion mit der C-terminalen Domäne der α -Untereinheit (α -CTD) der RNA-Polymerase (RNAP). Es wird vermutet, dass sich MarA-RNAP-Komplexe bilden, die dann durch die sequenzspezifische Bindung an die marbox zu den jeweiligen Zielpromotoren auf der DNA geführt werden und so die Transkriptionsrate der Zielgene gesteigert wird (Ishihama 1992; Bindi Dangi et al. 2004; Robert G. Martin et al. 2002).

Dabei korreliert die transkriptionsaktivierende Wirkung durch MarA direkt mit der Expressionsrate seines Genes *marA*, dessen Überexpression mit der Ausbildung eines MDR-Phänotypes in *E. coli* und anderen Enterobakterien assoziiert ist (*mar*: *multiple-antibiotic-resistance*) (Hachler, Cohen, and Levy 1991; Cohen, Yan, and Levy 1993). Die Expression von *marA* wird durch den Repressor MarR negativ reguliert, dessen Gen *marR* mit *marA* und *marB*, einem Gen bislang unbekannter Funktion, im *marRAB* Operon lokalisiert (siehe **Abbildung I-8**) (Grkovic, Brown, and Skurray 2002). Die Bedeutung von *marC*, einem weiteren Gen welches entgegengesetzt der Gene *marRAB* orientiert ist, ist ebenfalls noch unbekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass es keinen direkten Einfluss auf den MDR-Phänotyp hat (McDermott et al. 2008). Die Gene *marR* und *marA* unterliegen beide der negativen, bzw. positiven Selbstregulation durch MarR bzw. MarA. Beide binden im Promotorbereich des *marRAB* Operons, dem *mar*-Operator (*marO*) sequenzspezifisch. MarR bindet als Homodimer stromabwärts der -10 Region des *pmarRAB*-Promotors an zwei MarR-Bindemotive, wodurch die Transkription blockiert wird (R G Martin and Rosner 1995). MarA bindet an eine weiter *upstream* gelegene marbox. Eine verstärkte Bildung von MarA führt somit auch immer zu einer verstärkten Bildung von MarR, wodurch eine Überexpression beider Gene reversibel ist (M N Alekshun and Levy 1997). Die Promotorkontrolle durch MarR wird durch die Interaktion mit Substraten spezifisch aufgehoben. Dieses wurde für Natriumsalicylat (Cohen et al. 1993), Plumbagin und 2,4-Dinitrophenol (Michael N. Alekshun and Levy 1999), Menadion (Seoane and Levy 1995), 2,3-Dihydroxybenzoat (Chubiz and Rao 2010) sowie kürzlich auch für eine Interaktion mit Kupfer nachgewiesen (Hao et al. 2014). Der Bericht über eine Protein-Protein-Interaktion zwischen MarR und GyrA sowie der Transketolase A stellte sich als falsch bzw. nicht gesichert heraus und wurde zurückgezogen (Domain and Levy 2011).

Die Tatsache, dass MarA im Gegensatz zu anderen Transkriptionsfaktoren der AraC/XylS Familie lediglich eine DNA-Bindedomäne, jedoch keine Effektor-Interaktionsdomäne besitzt, unterstreicht die Bedeutung von MarR als Steuerelement der *mar*-abhängigen AcrAB-TolC Regulation.

Mutationen in MarR, die zu einem Verlust der Repressoreigenschaften und somit zu einer dauerhaft erhöhten *marA* Expression führen, wurden in klinischen Isolaten mit MDR-Phänotyp mannigfaltig beschrieben (M N Alekshun and Levy 1997; Oethinger et al. 1998). Auch bei der

Entstehung hochgradiger Fluorchinolonresistenzen können *mar*-Mutationen einen entscheidenden Anteil haben (Kern et al. 2000). So wurde *in vitro* Untersuchungen beobachtet, dass bei der Selektion resistenter Bakterienstämme Zielstrukturmutationen in *gyrA* und *parC* (siehe I.2.1) mit Mutationen im *mar*-Lokus stufenweise einhergehen (Grkovic, Brown, and Skurray 2002; Piddock 2006a).

Das gesamte Regulon von MarA umfasst ca. 60 Gene, wobei *mar*-boxen in über 30 Promotoren nachgewiesen wurden. Neben den Genen *acrAB* und *tolC* ist auch *micF* für die Ausbildung eines MDR-Phänotyps von Bedeutung. Dieses Gen kodiert für eine *small RNA* (sRNA), die als antisense RNA komplementär zur mRNA von *ompF* ist, dem Gen des *outer-membrane-porins* F (OmpF). Durch eine Hybridisierung beider RNAs wird die Expression von OmpF gehemmt, was zu einer verringerten Anzahl an Porinen in der äußeren Membran führt. Der daraus resultierende verminderte Influx trägt zusätzlich zu einer verringerten Antibiotikaempfindlichkeit bei (Guillier, Gottesman, and Storz 2006).

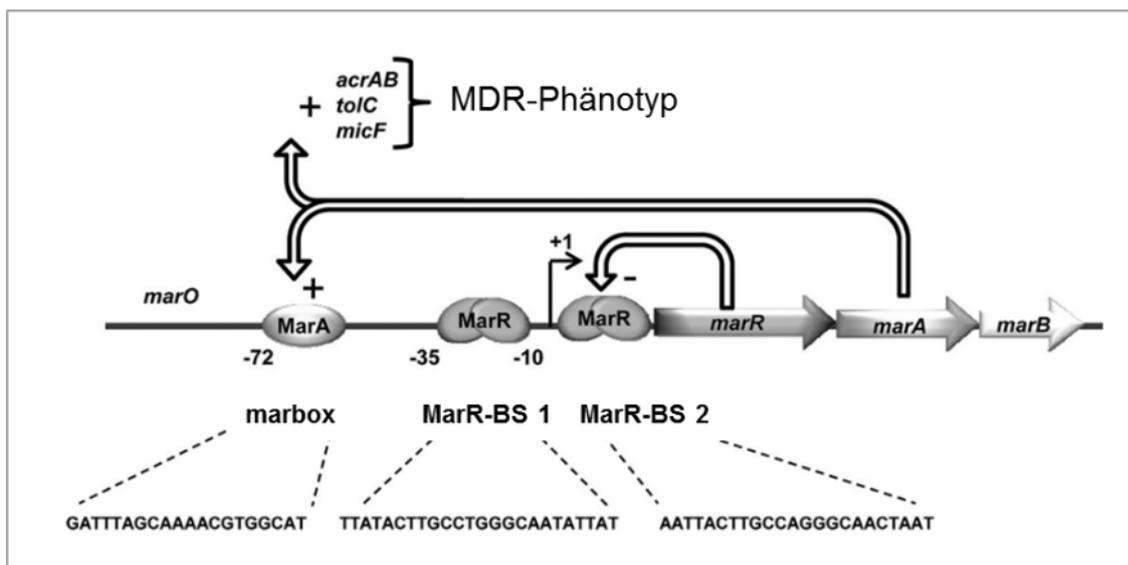


Abbildung I-8: Regulation im *marRAB* Operon, nach Duval et al. (2013). MarR-BS: MarR-Bindestelle. Die Pfeile zeigen die jeweilige Interaktion der entsprechenden Genprodukte mit der DNA-Sequenz an (+: positive, -: negative Stimulation der *marRAB*-Expression). Die Zahlen geben die Entfernung in bp zum Transkriptionsstart an.

I.4.2.2 Regulation durch SoxS

SoxS ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor der AraC/XylS-Proteinfamilie und weist in seiner Aminosäuresequenz deutliche Homologien zu MarA auf (107 Aminosäuren, 41 % Identität und 67 % Ähnlichkeit) (Duval and Lister 2013). So besitzt er eine ähnliche DNA-Bindedomäne mit zwei Helix-Turn-Helix Motiven. Wie MarA unterscheidet er sich von anderen Vertretern der

I. Einleitung

Proteinfamilie durch das Fehlen einer Dimerisierungsdomäne (Gallegos et al. 1997). Die DNA-Interaktion erfolgt durch die Bindung eines SoxS-Monomers an der soxbox, einem 20 bp langen, degenerierten Bindemotiv. Dieses stimmt mit der marbox etlicher Promotoren überein, wodurch sich die Regulons von MarA und SoxS deutlich überlappen (Pomposiello, Bennik, and Demple 2001; R. G. Martin et al. 1999).

Die Expression von SoxS wird von dem lokalen Regulator SoxR gesteuert, dessen Gen in entgegengesetzter Orientierung im *soxRS*-Operon vorliegt. SoxR ist ein Sensor für oxidativen Stress (*sox*: *superoxide response*) und besitzt eine DNA-Bindedomäne sowie eine Dimerisierungsdomäne. C-terminal besitzt der Regulator außerdem einen Eisen-Schwefel-Komplex [2Fe-2S], der an Cystein-Resten gebunden ist. In der reduzierten Form [Fe²⁺] bindet SoxR als Homodimer an den Promotor *psoxS* und unterbindet so die Transkription. Im oxidierten Zustand [Fe³⁺] wird SoxR zum Aktivator der *soxS* Expression. Eine schematische Darstellung der Regulation durch SoxR befindet sich in der **Abbildung I-9**.

Zu einer Oxidation und somit zur Aktivierung der SoxS-Expression führen die redox-aktiven Substanzen Paraquat, Stickstoffmonoxid, Naphthochinone und diverse Xenobiotika. Diese führen zur Bildung von Superoxid-Anionen in der Zelle und setzen diese somit einem oxidativen Stress aus (Duval and Lister 2013). Die Oxidation der Eisen-Schwefel-Komplexe wird dabei wahrscheinlich nicht durch die gebildeten Superoxide verursacht, sondern durch die direkte Reduktion der Substanzen am Fe²⁺ (Gu and Imlay 2011).

Der Wechsel in SoxR vom Repressor zum Transkriptionsaktivator kommt durch eine Konformationsänderung zustande, die im SoxR-DNA-Komplex zu einer Verkürzung des Abstandes zwischen -10 und -35 Region des Promotors führt. Hierdurch wird die Bindung der RNA-Polymerase (RNAP) begünstigt und so die Transkription positiv reguliert (Pomposiello and Demple 2001).

Zum gemeinsamen Regulon von SoxS und MarA gehören neben Genen der zellulären Antwort gegenüber oxidativem Stress, wie z. B. *sodA* (Superoxid-Dismutase A), sowie des Energiestoffwechsels, wie *acnA*, *fumC* (Aconitase A bzw. Fumarase C des Citratzyklus) und *zwf* (Glucose-6-Phosphatdehydrogenase des Pentose-Phosphat-Weges) auch die Gene *acrAB* und *tolC* der AcrAB-TolC Effluxpumpe sowie *micF* (Pomposiello and Demple 2001).

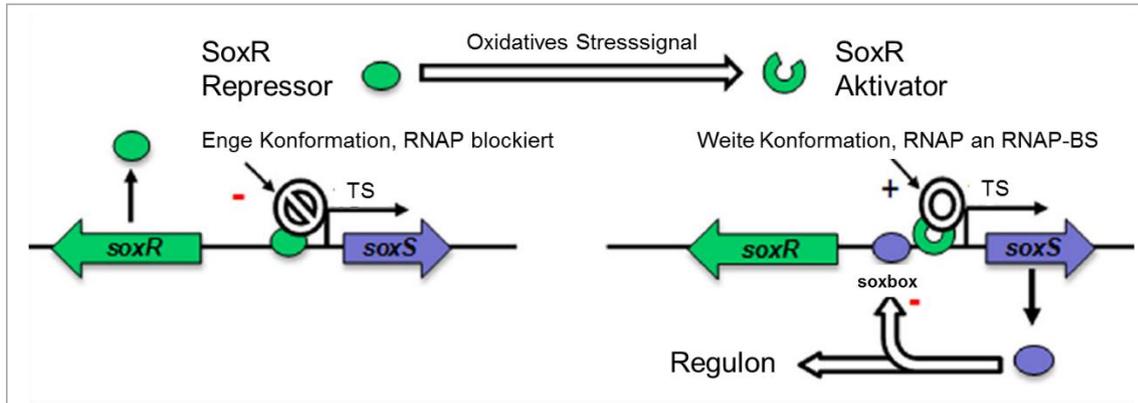


Abbildung I-9: Regulation im *soxRS* Operon, nach (Duval and Lister 2013). RNAP: RNA-Polymerase, BS: Bindestelle, TS: Transkriptionsstart. Die Pfeile zeigen die jeweilige Interaktion der entsprechenden Genprodukte mit der DNA-Sequenz bzw. die Umwandlung von SoxR vom Repressor in einen Aktivator oder die Bildung des Genproduktes an (+: positive, -: negative Stimulation der Expression).

I.4.2.3 Regulation durch Rob

Der Transkriptionsfaktor Rob ist ebenfalls ein Mitglied der AraC/XylS Familie, der erstmals über seine Bindung an den Replikationsursprung des Chromosoms *oriC* beschrieben wurde (Rob: *right origin binding*) (Skarstad et al. 1993, 199). Bis heute gibt es jedoch keine Hinweise darauf, dass Rob an der Replikation beteiligt ist (Duval and Lister 2013).

Rob unterscheidet sich deutlich von MarA und SoxS durch seine Größe (289 Aminosäuren). Neben der N-terminalen DNA-Bindedomäne besitzt Rob eine C-terminale Domäne zur Protein-Protein-Interaktion (Kwon et al. 2000). Die DNA-Bindedomäne besteht wie in MarA und SoxS aus zwei Helix-Turn-Helix-Motiven mit homologer Aminosäuresequenz (51 % Sequenzidentität und 71 % Sequenzähnlichkeit des N-Terminus zu MarA). Rob bindet ebenfalls spezifisch an die *mar/sox/robbox*, wodurch sich das Regulon weitgehend mit dem von MarA und SoxS überschneidet (Jair et al. 1996). Anders als bei MarA und SoxS ragt jedoch nur ein Helix-Turn-Helix-Motiv in eine große Furche der DNA-Helix, während das zweite HTH-Motiv lediglich sequenzunspezifisch am Phosphat-Rückgrat der DNA bindet. Bei der Bindung kommt es nicht zur Krümmung der DNA-Helix wie bei MarA und SoxS (Kwon et al. 2000; Duval and Lister 2013).

Im Gegensatz zu MarA und SoxS wird Rob konstitutiv gebildet und liegt in einer inaktiven Form abgeschieden (sequestriert) in der Zelle vor. Die C-terminale Domäne ist wahrscheinlich an der Sequestration beteiligt, die unter Einwirkung der Signalstoffe Dipyrindyl und Gallensalze aufgehoben und das Protein so in die aktive Form überführt wird (siehe **Abbildung I-10**). So stimuliert Rob auch die Expression von *acrA* und führt dadurch zu einer reduzierten Antibiotikaempfindlichkeit und zur Ausbildung eines MDR-Phänotypes (Ariza et al. 1995). Die Expression von *rob* wird durch SoxS, MarA und Rob selbst negativ reguliert (Kevin L. Griffith et al.

2009; Duval and Lister 2013; Rosner et al. 2002).

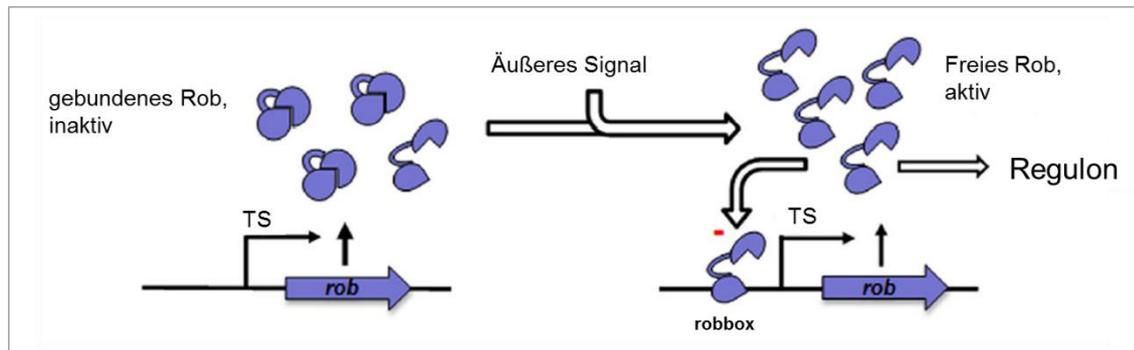


Abbildung I-10: Posttranslationale Regulation von Rob, nach (Duval and Lister 2013). TS: Transkriptionsstart. Die Pfeile zeigen die jeweilige Interaktion der entsprechenden Genprodukte mit der DNA-Sequenz an (-: negative Stimulation der *rob*-Expression).

I.4.2.4 Regulation durch RamA

Auch der Transkriptionsfaktor RamA ist ein Regulator der AcrAB-TolC Effluxpumpe, der an der Ausbildung eines MDR-Phänotyps maßgeblich beteiligt sein kann. Erstmals wurde sein Genlokus in einem *Enterobacter cloacae* Isolat entdeckt. Dessen Chromosom wurde in kleine Fragmente zerteilt, diese in Plasmide integriert und ein *E. coli* Stamm mit diesen transformiert. Einige Transformanten wiesen eine erhöhte Resistenz gegenüber Chinolonen, β -Lactamen, Chloramphenicol und Tetracyclin auf. Die Autoren führten diesen Effekt auf die reduzierte Bildung der Porine der äußeren Membran OmpA, OmpC und insbesondere OmpF zurück, weshalb das Gen *romA* genannt wurde (engl.: *reduction of outer membrane protein*) (Komatsu et al. 1990; Komatsu et al. 1991). Spätere analoge Untersuchungen identifizierten *romA* ebenfalls in einem multiresistenten *Klebsiella pneumoniae* Isolat. Hierbei wurde jedoch festgestellt, dass für die Ausbildung eines MDR-Phänotyps ein dem *romA* benachbartes Gen notwendig ist. In Anlehnung an *marA* wurde dieses *ramA* genannt (engl.: *resistance antibiotic multiple*). Die Untersuchungen ergaben ebenfalls, dass auch in den zuvor beschriebenen Plasmiden des *Enterobacter cloacae* Isolates das *ramA* Gen neben *romA* vorlag und für die Induktion des MDR-Phänotyps verantwortlich war (George, Hall, and Stokes 1995). Tatsächlich ist die Bedeutung von *romA* bislang völlig unklar. Ebenso ist unbekannt, ob es zur Translation und Bildung eines RomA Proteins kommt.

Später wurden *ramA* homologe Gene auch in *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B und *S. enterica* serovar Typhimurium beschrieben (Chollet et al. 2004; Yassien et al. 2002; van der Straaten et al. 2004). In *S. enterica* wurde das Gen zunächst *rma* genannt und später in Anlehnung an die homologen Gene in anderen *Enterobacteriaceae* in *ramA* unbenannt. In allen Untersuchungen wurde beschrieben, dass ein MDR-Phänotyp durch die Expression von *ramA* auf

I. Einleitung

einem *multicopy* Plasmid in den Ausgangsstämmen aber auch in *E. coli* induzierbar ist. Dieses war auffällig, da *E. coli* das *ramA* Gen selbst nicht auf seinem Genom besitzt. Der MDR-Phänotyp wurde hier durch eine heterologe Expression auf einem Plasmid induziert.

Außerdem wurde festgestellt, dass abweichend von *Klebsiella* und *Enterobacter* das Gen *romA* in *Salmonella* nicht vorhanden ist. Ebenso wurde *ramA* in *Citrobacter freundii* nachgewiesen und seine Rolle für einen MDR-Phänotyp in klinischen Isolaten untersucht (Pott 2011).

Schon früh wurde die hohe Homologie von RamA zu MarA und SoxS festgestellt und eine Überlappung der Regulons vermutet, was durch die direkte Bindung von RamA aus *S. enterica* serovar Typhimurium an der marbox des *marO*-Operators aus *E. coli* bestätigt wurde (George, Hall, and Stokes 1995; Yassien et al. 2002). Später wurde eine direkte DNA-Interaktion auch an den marboxen der Promotoren für *tolC* und *acrAB* in einem *Salmonella enterica* Stamm mittels *electro mobility shift assay* (EMSA) gezeigt (H. Nikaido and Pagès 2012). Beide Gene sowie auch die Gene *acrEF* der Effluxpumpe AcrEF-TolC werden bei einer *ramA*-Überexpression verstärkt transkribiert. Dagegen wird *ompF* vermindert exprimiert. Eine Bindung am *pmicF* Promotor ist bislang jedoch nicht belegt.

Eine Autoregulation von RamA wurde als möglich beschrieben. In DNA-Interaktionsexperimenten mittels EMSA konnte eine Bindung von RamA im Promotorbereich von *ramA* festgestellt werden, auch wenn eine definierte Bindestelle bislang nicht identifiziert werden konnte (Rosenblum et al. 2011). In Zellen mit konstitutiver Überexpression von *ramA* wurde ebenfalls eine verringerte Expression von *ramR*, dem Gen des lokalen Repressors von RamR, beobachtet (Bailey et al. 2010). Ob dieses durch einen direkten Einfluss von RamA auf die Transkriptionsrate von *ramR* zustande kommt, ist nicht bekannt.

RamR wurde erstmals in *Salmonella enterica* als RamR beschrieben und ist in allen bislang untersuchten *ramA*-tragenden Spezies konserviert (Abouzeed, Baucheron, and Cloeckert 2008). Das Gen *ramR* ist in einem Operon mit den Genen *romA* und *ramA* organisiert, wobei nicht alle Spezies mit *ramRA*-Operon auch das Gen *romA* enthalten. Der offene Leserahmen von *ramR* liegt in entgegengesetzter Richtung zu denen vom *romA* und *ramA* vor (siehe **Abbildung I-11**). RamR ist ein Repressor der TetR-Proteinfamilie. Bei der Regulation binden zwei Homodimere an eine definierte RamR-Bindestelle im Promotorbereich von *ramA* in *Salmonella* bzw. von *romA-ramA* in *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* und *Citrobacter freundii*. Da diese mit der -10 Region des *pramA*-Promotors überlappt, wird vermutet, dass durch die Bindung das Andocken der RNAP und somit auch die Transkription von *ramA* blockiert wird (Baucheron et al. 2012). Ebenso wird die Transkription von *ramR* gehemmt, da der Promotor *pramR* mit dem Bindungsbereich von RamR überlappt und es so zu einer Selbstregulation kommt (siehe **Abbildung I-11**) (Baucheron et al. 2014).

I. Einleitung

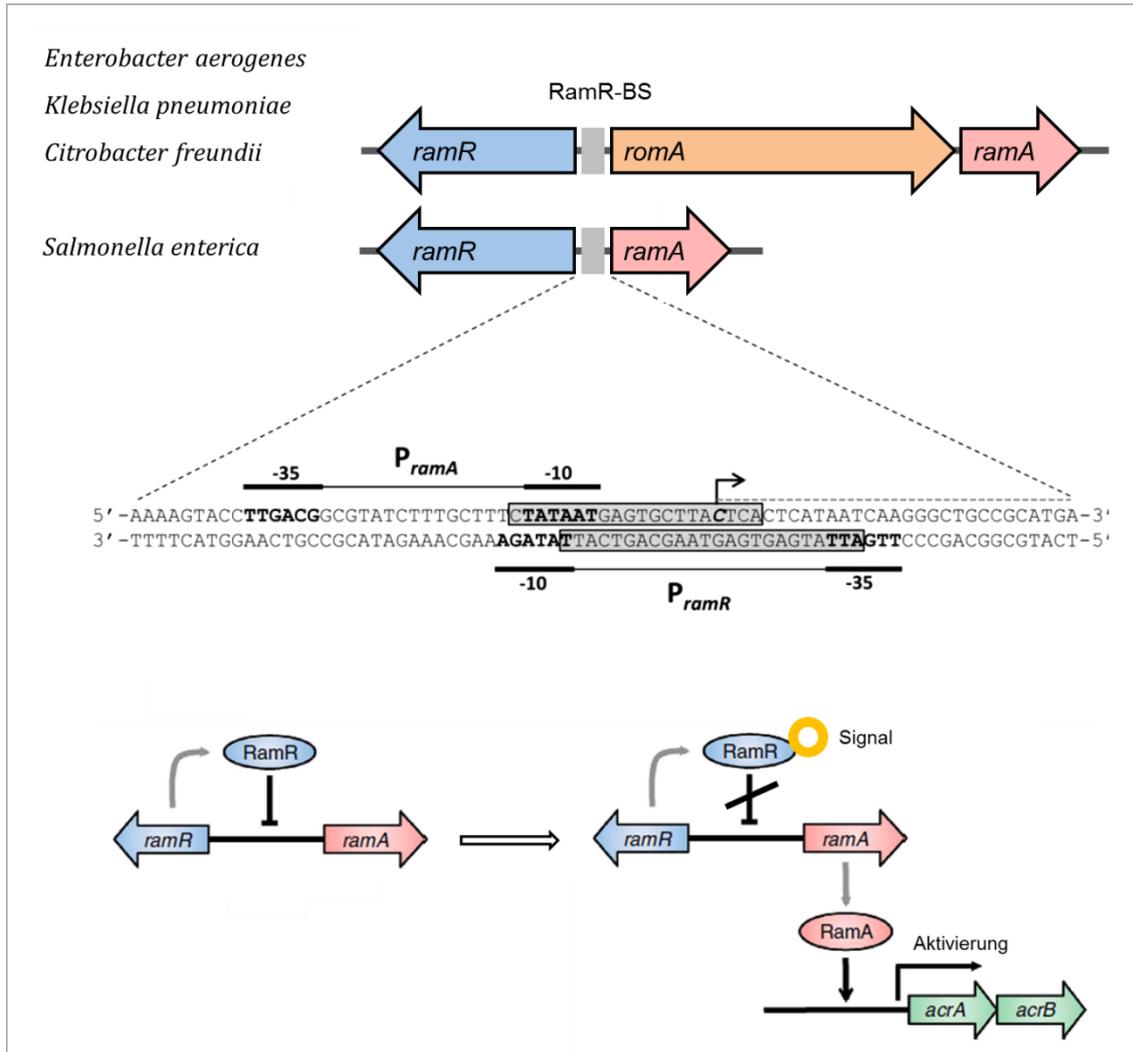


Abbildung I-11: Topologie des *ramRA*-Operons in verschiedenen Spezies und signalstoffabhängige Regulation. Die RamR-Bindestelle (BS) ist in allen Spezies hoch konserviert und überlappt mit den Promotoren *pramR* und *pramA*. Graue Pfeile zeigen die Bildung des Genproduktes an. Schwarze Pfeile zeigen die jeweilige Interaktion der entsprechenden Regulatoren mit der DNA-Sequenz an (→: positive, ←: negative Stimulation der Expression). Die Zahlen geben die Position auf der DNA im Bezug auf den Transkriptionsstart des jeweiligen Promotors an. Nach Baucheron et al. (2014) und Yamasaki et al. (2013).

Wie SoxR, MarR und AcrR ist auch RamR ein Sensor für chemische Signale. Durch die Bindung von Signalmolekülen wird die Repressoreigenschaft aufgehoben und so eine gesteigerte Transkription am *pramA*-Promotor ermöglicht. Eine *ramA* abhängige Induktion eines MDR-Phänotypes wurde für die Substanzen Indol und Gallensalze wie Cholat und Desoxycholat beschrieben (E. Nikaido, Yamaguchi, and Nishino 2008). Beides sind Substanzen, die natürlicher Weise im Magendarmtrakt vorkommen und zum Substratspektrum der AcrAB-TolC Effluxpumpe gehören. Diese wird in *Salmonella enterica* durch Indol in Abhängigkeit von RamA, nicht aber SoxS, MarA, SdiA, AcrR oder Rob induziert. Wahrscheinlich kommt es in Folge einer Bindung an RamR zu einer Derepression der Transkription am *pramA*-Promotor (E. Nikaido et al. 2012). Der genaue

I. Einleitung

Mechanismus einer Interaktion mit Gallensalzen ist bislang ungeklärt. Untersuchungen von Baucheron et al. (2014) haben gezeigt, dass es zu einer verminderten Bindung von RamR an den *pramA*-Promotor unter der Einwirkungen von Gallensalzen kommt, jedoch auch, dass eine verstärkte Expression von *ramA* auch RamR-unabhängig induziert werden kann. Ebenso wurde eine direkte Interaktion von Gallensalzen mit RamA diskutiert, die zu einer postrationalen Aktivierung des Transkriptionsfaktors führen könnte (E. Nikaido, Yamaguchi, and Nishino 2008). Im Unterschied zu *E. coli*, wo Gallensalze vor allem über Rob zu einer Induktion der AcrAB-TolC Effluxpumpe führen, scheint dieses in Salmonella maßgeblich von RamA abhängig zu sein (E. Nikaido, Yamaguchi, and Nishino 2008; Baucheron et al. 2014; Rosenberg et al. 2003).

In einem strukturanalytischen Ansatz gelang die kristallografische Darstellung des RamR-Dimers sowohl allein, als auch in Kombination mit den Substanzen Ethidiumbromid, Rhodamin 6G, Berberin, Kristalviolett und Dequalinum. Die Zugabe dieser Substanzen hatte eine Überexpression von *ramA* zur Folge (Yamasaki et al. 2013).

Ein RamR Monomer hat eine molekulare Masse von 21 kDa und besteht aus neun α -Helices (siehe **Abbildung I-12**). Die N-terminale DNA-Bindedomäne umfasst die Helices α 1-3 und weist deutliche Homologien zu anderen Vertretern der TetR Transkriptionsfaktorenfamilie auf. Die Dimerisierung geschieht maßgeblich durch H-Brückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den C-terminalen Helices α 8 und α 9 zweier Monomere. Bei der Untersuchung der Substratinteraktion wurde weiter beobachtet, dass die Interaktionspunkte weit über die Helices α 3-9 verteilt sind, sich zwischen den Liganden unterscheiden und offensichtlich keine spezifische Substratbindetasche existiert. Dennoch führten alle Substrate zu einer Konformationsänderung von RamR, die eine Vergrößerung des Abstandes der Helix-Turn-Helix Motive in der N-terminalen DNA-Bindedomäne zur Folge hat. Der größere Abstand resultierte dann wiederum in einer verminderten DNA-Affinität (Yamasaki et al. 2013). Eine weitere nachgewiesene Interaktion besteht zwischen dem Phenazin Chlorpromazin, welches zu einer Induktion der *ramA* Expression führt. Gleichzeitig unterdrückt die Substanz jedoch auch die Expression von *acrB* und somit der gesamten AcrAB-TolC Effluxpumpe, für die Chlorpromazin einen Inhibitor darstellt (Bailey, Paulsen, and Piddock 2008). Die physiologische Bedeutung der gezeigten Interaktionen ist bis auf Indol und die Gallensalze fraglich, die strukturelle Vielfalt unterstreicht jedoch die Bedeutung in der zellulären Antwort gegenüber chemischen Stresszuständen unterschiedlichster Art.

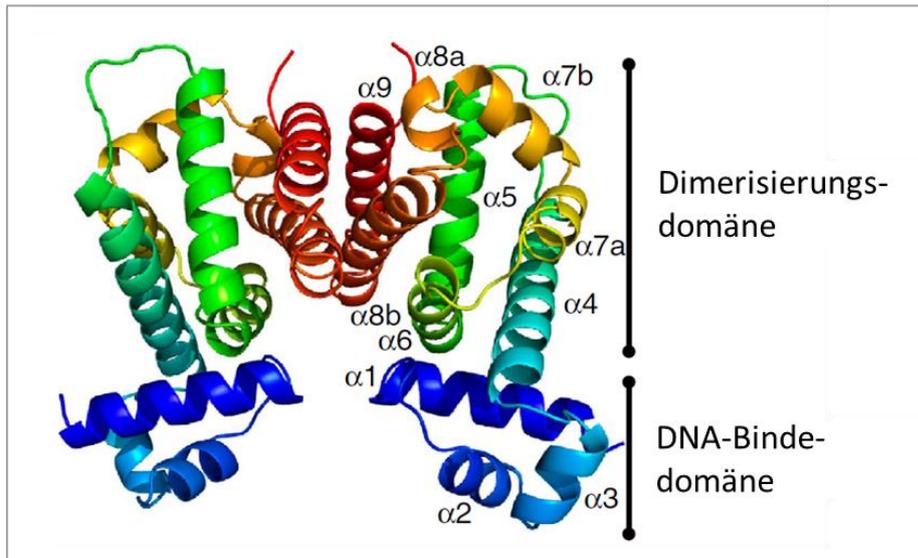


Abbildung I-12: Kristallstruktur des RamR-Dimers (Yamasaki et al. 2013)

Eine RamR-Interaktion, bzw. *ramA* stimulierende Wirkung für Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Tetracyclin, Erythromycin, Rifampicin, Trimethoprim und weiteren Antibiotika verschiedener Klassen konnte je nach Untersuchung nicht oder nur sehr schwach festgestellt werden (Yamasaki et al. 2013; Lawler et al. 2013). Demnach bietet das RamRA-Regulationssystem keine direkte Anpassungsmöglichkeit gegenüber Antibiotika. Dennoch spielt es bei der Akkumulation von Resistenzmutationen offensichtlich eine entscheidende Rolle. So wurden Mutationen in *ramR* und der RamR-Bindestelle, die zu einem Funktionsverlust von RamR, bzw. zu einer ineffizienten Repression der *ramA*-Transkription führen, in einer Vielzahl klinischer multiresistenter *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae* und *Enterobacter cloacae* Stämme beschrieben (Baucheron et al. 2012; Zheng, Cui, and Meng 2009; Abouzeed, Baucheron, and Cloeckert 2008; Hentschke et al. 2010; Rosenblum et al. 2011; Pérez et al. 2012).

Im Vergleich mit den Regulatoren MarR, SoxS und Rob wird RamA in Spezies, die das *ramRA*-Operon enthalten, eine übergeordnete Rolle im Zusammenhang mit einer verringerten Antibiotikaempfindlichkeit zugeschrieben und als Hauptregulator der *acrAB* Expression diskutiert. So fand man in klinischen Isolaten und bei *in vitro* selektierten Mutanten mit MDR-Phänotyp bei *Salmonella* und *Klebsiella* eine Überexpression der AcrAB-TolC Effluxpumpe. Dieses war im Gegensatz zu *E. coli* am häufigsten durch eine Beteiligung von RamR/RamA und in vereinzelt Fällen von SoxR/SoxS begründet und nicht von MarR/MarA (Abouzeed, Baucheron, and Cloeckert 2008; Usui et al. 2013; E. Nikaido, Yamaguchi, and Nishino 2008; Zheng, Cui, and Meng 2009; T. Schneiders, Amyes, and Levy 2003).

Durch die Überlappung der Regulons der Transkriptionsfaktoren MarR/MarA, SoxR/SoxS, Rob

und RamR/RamA ist eine Wechselwirkung im Regulationsnetzwerk anzunehmen. Für *E. coli* wurde dieses, entsprechend ohne RamA, beschrieben, wonach MarA die Expression von *soxS* und *rob* hemmt, Rob wiederum die Expression von *marA* stimuliert und die von *soxS* hemmt und SoxS die Expression von *marA* stimuliert und gleichzeitig die Expression von *rob* hemmt (Chubiz, Glekas, and Rao 2012). Entsprechende experimentelle Daten für *Salmonella enterica* weisen darauf hin, dass RamA ebenso die Expression von *rob* und *soxS* hemmt (O'Regan et al. 2009; E. Nikaido, Yamaguchi, and Nishino 2008). In *Enterobacter aerogenes* konnte eine Bindung von RamA an die marbox des *marRAB* Operons und in Folge dessen eine Überexpression der *mar*-Gene von *E. coli* nachgewiesen werden (Chollet et al. 2004). Auch existieren Hinweise dafür, dass eine Inaktivierung von *acrB* oder *tolC* zu einer Überexpression von *ramA* führt (Webber et al. 2009). Nach wie vor ist die Interaktion jedoch nicht ausreichend geklärt. Ebenso ist unbekannt, ob es zu einer Regulationskaskade zwischen den Transkriptionsfaktoren der AraC/XylS Familie, beispielsweise bei der Stressantwort auf Gallensalze, kommt.

I.4.2.5 Die Interaktion an der marbox

Die Regulons der Transkriptionsfaktoren MarA, SoxS und Rob weisen deutliche Überlappungen auf. So regulieren diese in *E. coli* denselben Satz von über 40 Genen (Robert G. Martin and Rosner 2011). Auch das Regulon von RamA in *Salmonella enterica* weist teilweise Überlappungen auf, wozu insbesondere Gene *acrAB*, *tolC*, *ompC*, *ompF* und *ompX* zählen (Bailey et al. 2010; Zheng et al. 2011). Alle vier Regulatoren binden im Promotorbereich der Gene *acrAB* und *tolC* am selben DNA-Bindemotiv, der marbox, einem degenerierten asymmetrischen Bindemotiv von 20 bp Länge. Dennoch weisen die Regulons auch offensichtliche Abweichungen auf. Ebenso ist die Tragweite ihres Einflusses an den marboxen unterschiedlicher Gene verschieden. So kommt es zu einer differenzierten Regulation derselben Gene durch die jeweiligen Regulatoren. Dieses kommt durch die spezifische Protein-DNA Interaktion abhängig von den Aminosäuren in den jeweiligen DNA-Bindemotiven sowie der DNA-Sequenz der jeweiligen marbox zustande (E. Nikaido, Yamaguchi, and Nishino 2008; Zhang et al. 2008; R. G. Martin et al. 1999; Nishino, Nikaido, and Yamaguchi 2009; Robert G. Martin and Rosner 2011). Auch wenn die verschiedenen Transkriptionsfaktoren unterschiedliche Bindungsaffinitäten an derselben marbox aufweisen, korreliert diese jedoch nicht mit der Stärke der Transkriptionsaktivierung oder -reprimierung (R. G. Martin et al. 1999; R. G. Martin, Gillette, and Rosner 2000).

Entscheidend für die Regulation sind ebenfalls die Orientierung der marbox sowie deren Abstand zu den -35 und -10 Regionen der Promotoren. Hiervon ist abhängig, ob es zu einer verstärkten oder verminderten Expression des Zielgenes kommt. So können die marboxen in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden, die für MarA beschrieben wurden (Thamarai Schneiders and Levy

2006; Duval et al. 2013). Klasse I marboxen liegen *upstream* der -35 Region in der B-Orientierung vor (engl.: *backward*), also entgegengesetzt der Leserichtung des Zielgens. MarA bindet dabei mit dem N-terminalen Ende der Leserichtung des Gens zugewandt (siehe **Abbildung I-13**) und aktiviert dessen Transkription. Ebenso aktivierend wirken marboxen der Klasse II, die in umgekehrter Orientierung, der F-Orientierung (engl.: *forward*), vorliegen und mit der -35 Region überlappen. Die marboxen Typ I und Typ II, die zu einer Reprimierung der Transkription führen, liegen in der B-Orientierung überlappend mit der -35 oder mit -35 und der -10 Region vor. Der Promotor *pacrA* gehört zur Klasse I und wird von MarA, SoxS, Rob und RamA aktiviert (R. G. Martin, Gillette, and Rosner 2000; E. Nikaido, Yamaguchi, and Nishino 2008).

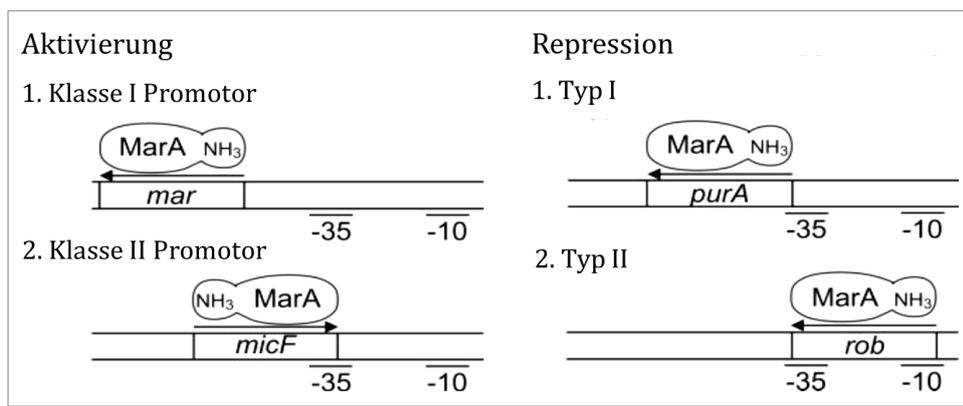


Abbildung I-13: Klassifizierung von Promotoren nach Lage und Orientierung der marbox. Diese ist durch Pfeile angegeben. Die Ausrichtung von gebundenem MarA ist durch die Lage des N-Terminus angegeben. Die Pfeile geben die Orientierung von MarA relativ zur Leserichtung des jeweiligen Gens und dessen Promotors an. Nach Thamarai Schneiders and Levy (2006).

I.5 Bakterien der Gattung *Citrobacter*

I.5.1 Allgemeine Klassifizierung von *Citrobacter* Spezies

Die Gattung *Citrobacter* umfasst insgesamt 11 Spezies. Ihre Vertreter sind gramnegative, stäbchenförmige, fakultativ anaerobe, peritrich begeißelte Bakterien, die nicht in der Lage sind Sporen zu bilden. Sie können aus Wasser-, Boden- oder auch Nahrungsmittelproben isoliert werden und gelten als ubiquitär verbreitet. Als Kommensale der menschlichen Darmflora und aufgrund des negativen Oxidase-Tests bei der biochemischen Charakterisierung werden sie den Enterobakterien zugeordnet. Phylogenetisch gehören sie zur Gruppe der γ -Proteobakterien (Dworkin and Falkow 2006).

Der Name der Gattung ist auf die Fähigkeit einzelner Vertreter zurückzuführen, Citrat als einzige Kohlenstoffquelle verwerten zu können und wurde durch Werkman und Gillen (1932) eingeführt.

Dabei wurden insgesamt sieben Spezies vorgeschlagen, von denen heute nur noch die Spezies *Citrobacter freundii* besteht. Die aktuelle Einteilung in 11 Spezies basiert auf einer Abgrenzung durch DNA-Hybridisierung (Genomospezies) und umfasst neben *C. freundii* die Arten *C. koseri*, *C. amalonaticus*, *C. farmeri*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *C. sedlakii* (Brenner et al. 1993), *C. rodentium* (Schauer et al. 1995) und *C. gillenii* sowie *C. murlinae* (Brenner et al. 1999).

Bei der Beschreibung der Spezies wurde gezeigt, dass sich die untersuchten Stämme auch nach ihren Reaktionsprofilen in ausgewählten klassischen biochemischen Tests in die vorgeschlagenen Arten einteilen lassen. Bis heute ist die biochemische Charakterisierung neben der DNA-Hybridisierung die einzige valide Methode zur sicheren Speziesidentifizierung in der Gattung *Citrobacter*, da bislang für keine andere Methode eine umfangreiche Studie mit einem vergleichbar großem Kollektiv von Referenzstämmen existiert, deren Spezieszugehörigkeit eindeutig geklärt ist.

I.5.2 Klinische Bedeutung

Vertreter der Gattung *Citrobacter* tauchen vereinzelt als Erreger vor allem nosokomialer Infektionen bei immungeschwächten Personen auf. Neben selteneren Wund-, Atemtrakt- oder Knocheninfektionen sowie Bakteriämien sind sie häufiger bei Infektionen des Harntraktes zu finden. Unter allen nosokomialen Infektionserregern sind *Citrobacter* Isolate mit einem Anteil von ca. 2 % vertreten (Lipsky et al. 1980; Lavigne et al. 2007; Samonis et al. 2009). In einer Studie in einem Universitätskrankenhaus mit 700 Betten in Heraklion, Griechenland wurden in einem Zeitraum von 12 Jahren insgesamt 78 Patienten mit *Citrobacter* Infektionen behandelt. Von diesen hatten 52,5 % Harnwegsinfektionen, 14,1 % intraabdominale Infektionen und jeweils weniger als 8 % Wund-, Atemtrakts-, Haut- und Schleimhautentzündungen sowie 5,1 % eine Bakteriämie. Die am häufigsten vertretene Spezies war *C. freundii* (71,8 %), gefolgt von *C. koseri* (23,1 %) und *C. braakii* (3,8 %) (Samonis et al. 2009).

Des Weiteren spielen insbesondere *C. koseri* Stämme immer wieder als Erreger besonders schwerer Formen von Meningitis bei Neugeborenen eine Rolle, bei denen es im Vergleich zu anderen Meningitiserregern mit einer stark erhöhten Wahrscheinlichkeit zu Abszessen im Hirngewebe kommt (Doran 1999; Townsend et al. 2003). Die Verbreitung geschieht dabei meist während nosokomialer Ausbrüche. Eine Studie an Hirnabszessen in Ratten hat gezeigt, dass vor allem Makrophagen von *C. koseri* infiziert werden, in denen sich die Bakterien replizieren können. Dabei entgehen sie auch in menschlichen Makrophagen der Lyse in den Phago lysosomen, was die Wahrscheinlichkeit einer chronischen Infektion des zentralen Nervensystems erhöht (Townsend et al. 2003).

Bakterien der Art *C. rodentium* besitzen Virulenzgene, die homolog zu denen des *locus of*

enterocyte effacement (LEE) in *E. coli* sind. Die Expression dieser als *pathogenic island* organisierten und transferierbaren Gene führt in enteropathogenen und enterohemorrhagischen *E. coli* Stämmen (EPEC bzw. EHEC) zur Anhaftung und Zerstörung von Enterozyten des Intestinaltraktes beim Menschen. *C. rodentium* ist ein natürlicher Mauspathogen, der bei einer Infektion im Intestinaltrakt zu Diarrhoe und Colonhyperplasie führt. Da hierbei die Gene des LEE beteiligt sind, ist *C. rodentium* ein etablierter Modellorganismus zur Untersuchung der Virulenz von EPEC und EHEC (Dong, Coombes, and Schellhorn 2009).

I.5.3 Antibiotikatherapie und Resistenzlage

Infektionen mit Stämmen von *Citrobacter*-Spezies werden mit Aminoglykosiden, Cephalosporinen, Fluorchinolonen oder Trimethoprim/Sulfamethoxazol überwiegend erfolgreich therapiert. *C. koseri* Isolate zeigten sich bislang häufig empfindlicher als *C. freundii* Isolate und wurden bei Infektionen des zentralen Nervensystems auch mit Chloramphenicol behandelt (Doran 1999). *C. freundii* Isolate weisen häufig Resistenzen gegenüber Cephalosporinen aller Generation auf. In der oben genannten Krankenhausstudie (Samonis et al. 2009) waren jeweils ca. zwei Drittel der untersuchten *C. freundii* Isolate resistent gegenüber Ceftriaxon (3. Generation), Ceftazidim (3. Generation) und Cefepim (4. Generation) aber auch Trimethoprim/Sulfamethoxazol. Dagegen waren sämtliche *C. koseri* Isolate empfindlich gegenüber den genannten Antibiotika. Weiter waren alle *Citrobacter* Stämme empfindlich gegenüber Colistin und Fosfomycin und Imipenem. Wegen der Verbreitung von induzierbaren β -Lactamasen in allen *Citrobacter* Spezies stellt Amoxicillin keine Therapieoption dar, in vielen Fällen auch in Kombination mit Clavulansäure nicht (Samonis et al. 2009; Doran 1999).

Spezies der Gattung *Citrobacter* besitzen wie erwähnt chromosomal kodierte β -Lactamasen, die Ihnen eine natürliche Resistenz gegenüber Aminopenicillinen wie Ampicillin und Amoxicillin verleiht. So tragen die Spezies *C. freundii*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *C. youngae* und *C. murlinae* die chromosomal kodierte, induzierbare Klasse C Serin β -Lactamase AmpC, welche schlecht durch Clavulansäure inhibiert werden kann und auch Cephalosporine der ersten und zweiten Generation hydrolysiert (Naas et al. 2002). Die Spezies *C. sedlakii*, *C. amalonaticus*, *C. farmeri* und *C. rodentium* tragen mit SED1 eine induzierbare Klasse A Serin β -Lactamase, die eine natürliche Resistenz gegenüber Amoxicillin sowie Cephalosporinen der ersten und zweiten Generation vermittelt (Petrella et al. 2001). Die Spezies *C. koseri* enthält dagegen mit CKO eine im Genus einzigartige Klasse A Serin β -Lactamase mit nur 41 % Identität zu SED-1 und besitzt ein ähnliches Wirkspektrum (Petrella et al. 2006).

Weiter spielen *Citrobacter* Stämme eine Rolle als Quelle übertragbarer plasmidvermittelter Chinolonresistenzen (PMQR) durch *qnr*-Gene. Diese kodieren für ein Protein mit repetetiver

I. Einleitung

Pentapeptidstruktur, die eine Schutzfunktion für die bakterielle Gyrase übernimmt, welche die Zielstruktur der Chinolone ist. Als Träger von Plasmiden mit *qnrB* Allelen tragen sie allgemein zur Verbreitung dieser Gene innerhalb der Enterobakterien bei (Jacoby, Griffin, and Hooper 2011). Multiresistente *Citrobacter* Stämme mit Plasmiden auf denen *qnrB4*-Allele im Verbund mit β -Lactamasen der Klassen A, C und D sowie mit einer Aminoglycosidacetyltransferase (*aac(6')-1b-cr*) (siehe I.2.1) vorkommen, wurden bereits aus Abwässern isoliert (Yim et al. 2013). Hierdurch wird die Gefahr der Akkumulation von Resistenzgenen deutlich und auch, dass diese ebenfalls in weniger virulenten Bakterienstämmen, wie z. B. solche der Gattung *Citrobacter*, stattfindet, wenn sie mit virulenten Keimen kokolonisieren.

Citrobacter Isolate mit plasmidkodierten Carbapenemasen des KPC-Typus (*Klebsiella pneumoniae*-Carbapenemasen), die Resistenzen gegenüber Imipenem und Meropenem vermitteln, beides sind Reserveantibiotika der Gruppe der Carbapeneme für die Behandlung komplizierter nosokomialer Infektionen, wurden auch in Deutschland zunehmend beobachtet (Kaase and Hauri 2014). Auch hierin wird deutlich, dass *Citrobacter* Stämme als MRGN-Keime (*multiple resistant gram negative*) auftauchen und ein Reservoir für übertragbare Resistenzmechanismen darstellen können.

I.6 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss des Transkriptionsfaktors RamA bei der Ausprägung einer multiplen Antibiotikaresistenz bei Bakterienstämmen der Gattung *Citrobacter* zu untersuchen. Dazu sollten die DNA-Sequenzen der *ramR-romA-ramA* Gene analysiert und beschrieben werden und molekulare Grundlagen der Protein-DNA Interaktion zwischen RamA und seiner Ziel-DNA eingehender untersucht werden. Die Erkenntnisse sollten so zu einem besseren Verständnis dafür beitragen, wie durch genetische Veränderungen im *ramRA*-Operon Antibiotikaresistenzen entstehen können.

Ausgangspunkt der Arbeit war, dass eine Präsenz der *ramRA*-Gene bislang nur in sehr wenigen Spezies bekannt und beschrieben war. Diese waren *Klebsiella pneumoniae* (George, Hall, and Stokes 1995), *Enterobacter aerogenes* (Chollet et al. 2004) und *Salmonella enterica* (Yassien et al. 2002). In ihrer Dissertation hatte Frau Dr. Kühn (geb. Pott) die DNA-Sequenz der *ramRA*-Gene erstmals in Stämmen der Spezies *Citrobacter freundii* beschrieben und nachgewiesen, dass Mutationen in *ramR* bei klinischen Isolaten zur Resistenz gegen Fluorchinolone und Chloramphenicol beitragen (Pott 2011; Pott, Heisig, and Heisig 2011). Weiter fand sie Hinweise für die Existenz von *ramRA*-Genen in Stämmen anderer *Citrobacter* Spezies, wie *C. farmeri*, *C. braakii*, *C. amalonaticus* und *C. werkmanii*. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die DNA-Sequenzen in diesen Stämmen bestimmt und die Operonstrukturen analysiert werden.

Außerdem sollte der Einfluss des Gens *ramA* auf die Antibiotikaresistenz in den untersuchten *Citrobacter* Spezies untersucht werden. Aus Daten von George, Hall, and Stokes (1995), Chollet et al. (2004) und Yassien et al. (2002) war bekannt, dass eine veränderte Regulation der *ramA*-Expression, die zu einer vermehrten Bildung des Transkriptionsfaktors RamA führt, einen Einfluss auf die Resistenz gegenüber Antibiotika hat. Um dieses auch für Stämme verschiedener Spezies der Gattung *Citrobacter* zu überprüfen, sollte der Einfluss einer *ramA*-Überexpression in ausgewählten Stämmen untersucht werden. Anschließend sollte die Auswirkung auf die Antibiotikaresistenz der Bakterien analysiert werden. Im Falle der Beobachtung eines MDR-Phänotypes galt es zu prüfen, ob die MDR-Effluxpumpe AcrAB-TolC bei der Ausprägung beteiligt ist.

In einem weiteren Ansatz sollte geprüft werden, ob sich durch die bekannte Homologie zwischen den Aminosäuresequenzen von RamA und dem Transkriptionsfaktor MarA, für dessen Struktur und Bindungseigenschaften an der DNA bereits umfangreiche experimentelle Daten veröffentlicht wurden, Rückschlüsse auf die Funktionsweise und den DNA-Bindungsmodus von RamA *in silico* ziehen ließen. Hinweise auf relevante Interaktionspunkte zwischen RamA und der DNA sollten dann experimentell untersucht werden.

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Oligonukleotide

Die verwendeten Enzyme sind in **Tabelle II-1** aufgeführt.

Tabelle II-1: Auflistung verwendeter Oligonukleotide (Lettercode für variable Basenpositionen: Y: C/T, H: A/C/T; R: A/G, B: C/G/T, S: G/C, K: G/T, M: A/C, W: A/T).

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Anwendung	Referenz
[A1] ramA_uniEnt+3-for	ATGAC <u>B</u> ATTTTCY <u>G</u> GCTCAGG	ramRA-Seq.	Pott 2011
[A2] ramA_uniEnt+272-rev	CGSGTAAAGGT <u>Y</u> T <u>G</u> YTG	ramRA-Seq.	Pott 2011
[A3] ramA_uniEnt_+61_rev	GATTCAAATTATCATCAATCC	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[A7] ramA_uniEnt+320-rev	TCTTTGCGATAAGCGCCCGCGCG	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[A8 2519] ramA_5'_+76	ACGAGATCGCACGCCATGCGG	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[A8 2552] ramA_5'_+153	GGACGCTACATCCGCGAGCG	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[A8 708] ramA_5'_+171	CGTAAACTGCTGCTGGCGGCG	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[downA1] ramA_3'_+372-3'downstream	CGGCGCTGGTTCTCGCTGGC	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[downA2] ramA_3'_+537-3'downstream	CTCTCCTGCCTGCTGCTGCC	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[downA3] ramA_3'_+483-3'downstream	AAGAAGCAAACCACTCCACGCC	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[downR1] ramR_5'_+639-3'downstream	CGAACGGCCAGCAGTGTTTC	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[R1] ramR_uniEnt+560-for	GCGYKCCACATBGM ^Y TC	ramRA-Seq.	Pott 2011
[R2] ramR_uniEnt+1-rev	GTGGCWCGTCCRAAGAGTG	ramRA-Seq.	Pott 2011
[R4] ramR_uniEnt_+127_rev	CRTTGTTTCGCTATTTTCGCG	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[R5] ramR_uniEnt_+146_for	CGCGAAATAGCGAAACAAY <u>G</u>	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[ro1 1189+2519] romA_3'_+225_C.amal+farm	GACCAGAAACTCCACCATG	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[ro1 2552] romA_3'_+133_C.braakii	TGACGGACTGTTCAAAC ^T TGG	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[ro1 708] romA_3'_+184_C.werk	CGGTATAGCCCGGTGTTGG	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[ro2 2519] romA_5'_+61_C.farm	CGTTTGTCTCAATGCGGG	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[ro2 2552] romA_5'_+61_C.braakii	CGTTTGTCTCAATGCTGGC	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[ro2 708] romA_5'_+42_C.werk	GCCGCTGCTACAAGTTTACC	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[ro3 1189+2519] romA_3'_+889_C.amal+farm	GTCTCTCCGGCATCATGTG	ramRA-Seq.	Diese Arbeit
[ro3 2552] romA_3'_+893_C.braakii	GTTTCTCCGGCATCATGTG	ramRA-Seq.	Diese Arbeit

II. Material und Methoden

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Anwendung	Referenz
[ro3 708] romA_3'+893_C.werk	GTCTCTTCCGGCATCATGTG	<i>ramRA</i> -Seq.	Diese Arbeit
[ro4 2519] romA_5'+798_C.farm	ATTGGCGAACAGTTTGGCGG	<i>ramRA</i> -Seq.	Diese Arbeit
[ro4 2552] romA_5'+797_C.braakii	GATTGGCGAACAGTTTGGCGG	<i>ramRA</i> -Seq.	Diese Arbeit
[ro4 708] romA_5'+797_C.werk	CATTGGCGAGCAGTTTGGCT	<i>ramRA</i> -Seq.	Diese Arbeit
[ro6 c] romA_5'- 181_Citrobacter	GACGAGCCACTACTTTTACC	<i>ramRA</i> -Seq.	Diese Arbeit
[ro7 c] romA_3'+956_Citrobacter	CCCAGCTATGCTTTGCCAGC	<i>ramRA</i> -Seq.	Diese Arbeit
5'gyrA MPC +209	TGGTGACGTAATCGGTAAATAC	<i>gyrA</i> -Seq.	Laborbestand
acrA_3'+68_Enterо	CTGTTTGTGCTCACATCCTG	<i>pacrA</i> -Seq.	Diese Arbeit
acrA_5_-367_Enterо	GGGAATTTTGCCTGATACTC	<i>pacrA</i> -Seq.	Diese Arbeit
cat_AatII_pACYC184_5'-190	TACTCGGACGTCGCCGAATAAATACCTGT GACG	Klonierung	Diese Arbeit
cat_BsaI_pACYC184_3'+670	ATTATACCGCGAGACCTAAGGGCACCAAT AACTGCC	Klonierung	Diese Arbeit
gyrA 3-1	GGAATTTTGGTTGGCATGACGTCCGGA	<i>gyrA</i> -Seq.	Laborbestand
gyrA 5-1	CCGAATTCGGGATACAGTAGAGGGATAG C	<i>gyrA</i> -Seq.	Laborbestand
gyrA-GA2	AACCGTTCACCAGCAGGTTAGG	<i>gyrA</i> -Seq.	Laborbestand
gyrB_Citrobacter_3'+1032	CAGCAGGTATTCGCTCAGC	<i>gyrB</i> -Seq.	Diese Arbeit
gyrB_Citrobacter_5'+132	AGATAACGCTATCGACGAAGC	<i>gyrB</i> -Seq.	Diese Arbeit
pUC19_cat_ramA_del- lacZ_3'+1	ATGACGATTTCTGCTCAGGTAATTGATA CGATTGTTGAATGG	SSM-PCR	Diese Arbeit
pUC19_cat_ramA_del- lacZ_5'+20	ACCTGAGCAGAAAATCGTCATAGCTGTTTC CTGTGTGAAATTG	SSM-PCR	Diese Arbeit
ramA_3'+61	ATATCCCGCATGGCGTGAATATCATCAA TGCGCAATGGTTG	SSM-PCR	Diese Arbeit
ramA_5'-83	GAGTTAGCTCACTCATTAGGC	<i>ramA</i> -Seq.	Diese Arbeit
ramA_Cfreu_3_313	TCGGCTATGATTTTCTTTGCG	ARMS-PCR/ <i>ramA</i> -Seq.	Diese Arbeit
ramA_Cfreu_5_+104_R41- ARMS	CAAAATGGCACCTGCAGCGT	ARMS-PCR	Diese Arbeit
ramA_Cfreu_5_104_R41A- ARMS	CAAAATGGCACCTGCAGGCA	ARMS-PCR	Diese Arbeit
ramA_Cfreu_5_91_W37A- ARMS	CATGCGGGATATTCAAAAGCA	ARMS-PCR	Diese Arbeit
ramA_Cfreu_5_91_W37- ARMS	CATGCGGGATATTCAAAATGG	ARMS-PCR	Diese Arbeit
ramA_HindIII_C_freu_5'-10	AGTGAAGCTTATGACGATTTCTGCTCAG G	Klonierung	Diese Arbeit
ramA_NdeI_C_freu 3'+328	TCAACATATGAGCTGTTAATGCGTTTCGGC	Klonierung	Diese Arbeit
ramA_pUC19_3'+459	GTCACAGCTTGTCTGTAAGC	<i>ramA</i> -Seq./ SSM-PCR	Diese Arbeit

II. Material und Methoden

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Anwendung	Referenz
ramA_pUC19_5'_-83	GAGTTAGCTCACTCATTAGGC	ramA-Seq./ SSM-PCR	Diese Arbeit
ramA-R41A_5'_{+81}	TATTGCACGCCATGCGGGATATTCAAAA TGGCACCTGCAGGCACCTTTTATGCAG	SSM-PCR	Diese Arbeit
ramA-W37A_5'_{+81}	TATTGCACGCCATGCGGGATATTCAAAA GCACACCTGCAGCGTCTTTTATGCAG	SSM-PCR	Diese Arbeit
ramA-W37A+R41A_5'_{+81}	TATTGCACGCCATGCGGGATATTCAAAA GCACACCTGCAGGCACCTTTTATGCAG	SSM-PCR	Diese Arbeit

II.1.2 Plasmide

Plasmide, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden sind in **Tabelle II-2** aufgeführt.

Tabelle II-2: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Größe [bp]	Kurzbeschreibung	Herkunft
pACYC177	3941	AmpR (Ampicillin-Resistenz), KanR (Kanamycin-Resistenz), p15A ori	(Chang and Cohen 1978)
pACYC184	4245	CmR (Chloramphenicol-Resistenz), TetR (Tetrazyclin-Resistenz), p15A ori	(Chang and Cohen 1978)
pHPAR177-01.1	5980	<i>pacrA-luc</i> KanR	diese Arbeit
pHPAR19-01.1	2769	pUC19 <i>bla::cat</i>	diese Arbeit
pHPAR19-01.2	2858	pUC19 <i>bla::cat plac-ramA</i>	diese Arbeit
pHPAR19-01.3	2835	pUC19 <i>bla::cat plac-ramA ΔlacZ</i>	diese Arbeit
pHPAR19-01.4	2835	pUC19 <i>bla::cat plac-ramA ΔlacZ</i> W37A	diese Arbeit
pHPAR19-01.5	2835	pUC19 <i>bla::cat plac-ramA ΔlacZ</i> R41A	diese Arbeit
pHPAR19-01.6	2835	pUC19 <i>bla::cat plac-ramA ΔlacZ</i> W37A+R41A	diese Arbeit
pPHB331	6400	pBR322:: <i>pacrAB-luc</i>	(Matthiessen 2007)
pUC19	2686	AmpR (Ampicillin-Resistenz), lacZα, ColE1 ori	Invitrogen

II.1.3 Bakterienstämme

Bakterienstämme, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind in der folgenden **Tabelle II-3** aufgelistet.

II. Material und Methoden

Tabelle II-3: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeter Bakterienstämme. GK: laborinterne fortlaufende Stammbezeichnung (Glycerinkultur). * Stamm der Sammlung des Universitätsklinikums Eppendorf.

GK	Spezies	Stamm	Charakteristika	Referenz
-*	<i>Escherichia coli</i>	ATCC35218	-	American Type Culture Collection
4085	<i>Escherichia coli</i>	R7	$\Delta toIC$	Dissertation Katja Carstens
94	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	II-4-60	-	Laboreigener Stamm
100	<i>Citrobacter freundii</i>	III-1-3	-	Laboreigener Stamm
489	<i>Enterobacter cloacae</i>	NCTC10005	-	National Collection of Type Cultures
501	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	ATCC14028	-	American Type Culture Collection
571	<i>Escherichia coli</i>	WT	Stuhlisolat eines gesunden Probanden, der nie FQ eingenommen hatte (Wildtyp)	(P. Heisig and Tschorny 1994)
617	<i>Escherichia coli</i>	C600	F'; tonA21; thi-1; thr-1; leuB6; lacY1; glnV44; rfbC1; fhuA1 λ -	(Appleyard 1954)
623	<i>Escherichia coli</i>	JM109	endA1; recA1; gyrA96; thi; hsdR17 des ; relA1; supE44; #(lac-proAB); [F' traD36, proAB, laqIqZ#M15]	Promega
708	<i>Citrobacter werkmanii</i>	2943564-2	-	Laboreigener Stamm
1189	<i>Citrobacter koseri</i>	54752/96	-	Laboreigener Stamm
1253	<i>Citrobacter rodentium</i>	1253	-	Laboreigener Stamm
1263	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1263	-	Laboreigener Stamm
2519	<i>Citrobacter farmeri</i>	16-01-02	-	Laboreigener Stamm
2552	<i>Citrobacter sedlakii</i>	16-01-01	-	Laboreigener Stamm
3839	<i>Citrobacter freundii</i>	100 ramR::CAT	$\Delta ramR$	(Pott 2011)
4039	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	DSM4593	-	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
4052	<i>Escherichia coli</i>	BW25113	WT-Keio-Collection	(Baba et al. 2006)
4064	<i>Escherichia coli</i>	JW5249-1	$\Delta marA$	(Baba et al. 2006)
4065	<i>Escherichia coli</i>	JW4359-1	Δrob	(Baba et al. 2006)
4066	<i>Escherichia coli</i>	JW4023-5	$\Delta soxS$	(Baba et al. 2006)
4089	<i>Citrobacter werkmanii</i>	DSM17579	-	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

II. Material und Methoden

II.1.4 DNA-Größenstandards

In der vorliegenden Arbeit wurden zum Größenabgleich von DNA-Fragmenten in der Agarosegelelektrophorese die Größenstandards 1kb DNA Ladder Quick-Load (Fa. NEB), O'Gene Ruler 100 bp plus (Fa. Fermentas), O'Gene Ruler 1kb DNA-Ladder (Fa. Fermentas, Thermofisher Scientific), Gene Ruler 1kb Plus (Fa. Fermentas Thermofisher Scientific) und GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fa. Thermofisher Schientific) verwendet.

II.1.5 Verwendete Kits

Fertige Enzym/Puffer-Kits, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind in der folgenden **Tabelle II-4** aufgelistet.

Tabelle II-4: Verwendete Kits.

Kit	Verwendung	Hersteller
GenomeLab DTCS Quick Start Kits	DNA-Sequenzierung	Beckmann Coulter
Hi Yield PCR-Clean-Up & Gel-Extraction Kit	DNA-Aufreinigung nach PCR oder aus Agarose	SLG
Luciferase Assay System Kit	Lumineszenzmessung	Promega

II.1.6 Enzyme

Die verwendeten Enzyme sind in **Tabelle II-5** aufgeführt.

Tabelle II-5: Auflistung aller verwendeter Enzyme unter Angabe des jeweiligen Puffersystems und des Herstellers (*: ohne speziellen Puffer eingesetzt, **: Zusammensetzung durch Hersteller nicht veröffentlicht).

Enzym	Puffer	Hersteller
<i>Pst</i> I	10x Puffer O 1x Puffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5 at 37°C), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA.	Thermo Scientific
<i>Dpn</i> I	10x NEB Puffer I 1x Puffer: 10mM Bis-Tris-Propan-HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7.0 bei 25°C	New England Biolabs
<i>Hinc</i> II	10x Puffer Tango 1X Puffer: 33 mM Trisacetat (pH 7.9 bei 37°C), 10 mM Magnesiumacetate, 66 mM Kalium acetat, 0,1 mg/ml BSA.	Thermo Scientific
<i>Aat</i> II	10x Puffer Tango	Thermo Scientific

II. Material und Methoden

Enzym	Puffer	Hersteller
	Zusammensetzung siehe oben	
<i>Eco311</i>	10x Puffer G 1x Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5 bei 37°C), 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl, 0.1 mg/ml BSA.	Thermo Scientific
FastDigest® <i>EcoRI</i>	10x FastDigest® Puffer**	Thermo Scientific
<i>NdeI</i>	10x Puffer O Zusammensetzung siehe oben	Thermo Scientific
FastDigest® <i>HindIII</i>	10x FastDigest® Puffer**	Thermo Scientific
DreamTaq® DNA-Polymerase	10x DreamTaq® Puffer**	Thermo Scientific
Exonuklease I	.*	Thermo Scientific
Fast AP Alkalische Phosphatase	.*	Thermo Scientific
Antarctic Phosphatase	10x Antarctic Phosphatase Puffer 1x Puffer: 50 mM Bis-Tris-Propan-HCl, 1 mM MgCl ₂ , 0,1 mM ZnCl ₂ , pH 6,0 bei 25°C	New England Biolabs
Phusion® HF DNA-Polymerase	5x GC-Puffer**	Finnzymes
T4 DNA-Ligase	10x T4 Ligase Puffer	Thermo Scientific
Lysozym	.*	Carl Roth
RNase A	.*	Qiagen

II.1.7 Nährmedien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nährmedien sind in **Tabelle II-8** aufgelistet.

Tabelle II-6: Verwendete Nährmedien.

Medium	Herstellung	Hersteller
LB-Agar	Trypton 1%, Hefeextrakt 0,5%, NaCl 1%, Agar-Agar 1,5%, pH-Wert 7,0 ±0,2	Carl Roth
LB-Medium	Trypton 1%, Hefeextrakt 0,5%, NaCl 1%, pH-Wert 7,0 ±0,2	Carl Roth
Müller-Hinton-Medium	Rinder-Infus 0,2%, Pepton aus Casein (saures Hydrolysat) 1,75%, Maisstärke 0,15%, pH-Wert 7,4 ±0,2	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

II. Material und Methoden

II.1.8 Puffer und Lösungen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind in **Tabelle II-7** aufgelistet.

Tabelle II-7: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
GTE-Puffer	50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 200 µg/mL RNase A; pH 8,0
TE-Puffer	150 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA; pH 8,0
Lysispuffer	200 mM NaOH, 1 % SDS
Neutralisationspuffer	3 M Kaliumacetat; pH 4,8
3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2)	3 M Natriumacetat; pH 5,2
TAE-Puffer 50x	2 M Trisacetat, 50 mM EDTA; pH 8,0 mit HCl
Bromphenolblau-Ladepuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 15 % Polysucrose
Fällungslösung	2 µL 3 M Natriumacetat pH 5,2, 2 µL 100 mM EDTA pH 8,0, 1 µL Glykogen 20 mg/mL
EDTA-Lösung	100 mM EDTA, pH 8,0
RNase-Lösung	10 mg/mL RNase
TFB1 Puffer	0,5 g Kaliumacetat, 1g MgCl ₂ , 0,75 g KCl, 1,6 mL 1M CaCl ₂ , 17 mL Glycerin (87 %), H ₂ O 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 ₂ O ad 50 mL
Lumineszenz-Probenpuffer	1 M K ₂ HPO ₄ , 20 mM EDTA, pH 7,8
Lumineszenz-Lysis-Mix	0,15 mL 25 mg/mL Lysozym, 600 µL CCLR (5x) (aus Kit Luciferase Assay System, Fa. Promega), 0,75 mL 10 mg/mL BSA, 1,5 mL H ₂ O

II.1.9 Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien sind in **Tabelle II-8** aufgelistet.

Tabelle II-8: Verwendete Chemikalien.

Stoffbezeichnung	Hersteller
Bromphenolblau	Bio-Rad
BSA (Bovine Serum Albumin)	Carl Roth
Ampicillin-Natrium	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Ciprofloxacin-HCl	Bayer
Desoxynukleosidtriphosphate	Thermo Fisher Scientific
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roche

II. Material und Methoden

Stoffbezeichnung	Hersteller
Ethanol 70 %	Merck
Ethanol 99,8 %	Merck
Ethidiumbromid 1 % in H ₂ O	Merck
Ethylendiamin-Tetra-Acetat (EDTA)	Carl Roth
Glucose Monohydrat	Merck
Glycerin	Carl Roth
Glykogen	Thermo Fisher Scientific
Hefeextrakt	Carl Roth
IPTG (Isopropyl-1-Thio- β -D-Galactopyranosid)	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck
MOPS	Sigma-Aldrich
Nalidixinsäure-Natrium	Sigma-Aldrich
Natriumacetat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydroxid	Grüssing
Natriumsalicylat	Carl Roth
PA β N (Phenyl-Arginyl- β -Naphthylamin)	Sigma-Aldrich
PeqGold Universal Agarose	Peqlab
Polysucrose	Sigma-Aldrich
Puromycin Dihydrochlorid	Carl Roth
Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth
Salzsäure 37 %	Merck
Tetracyclin-HCl	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris-Base)	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth
Xylencyanol	Merck

II. Material und Methoden

II.1.10 Geräte

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte sind in **Tabelle II-9** aufgelistet.

Tabelle II-9: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Autoklav Systec 3870 ELV	Systec
Autoklav Systec Media prep®	Systec
Brutschrank Heraeus function line B12, B20	Heraeus
Elektrophorese Spannungsgeber	Biometra
Elektroporator GenePulser®	BioRad
Feinwaage Sartorius LA120S	Sartorius AG
GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System	Beckmann Coulter
Hitzesterilisator	Heraeus
Luminometer	Anthos Lucy2
Magnetrührer MR3001	Heidolph
Magnetrührer RCT basic IKAMAG® safety control	IKA-Werke
Milli-Q RiOs™ 5	Millipore
Milli-Q Synthesis	Millipore
Multistep-Pipette Labopette elektronik 50-1000 µL	Hirschmann
pH-Meter inolab	WTW
Photometer Cary 50 Bio	Varian
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
Pulse Controller II	Biorad
Thermocycler T personal, T gradient, T3 Thermocycler	Biometra
UV-Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000	ThermoFisher Scientific
Videodokumentationsanlagen BioDoc Analyze Ti5	Biometra
Videodokumentationsanlagen Biovision 1500/3M	Vilber
Vortexer	Scientific Industries
Zentrifugen Biofuge fresco, strato, pico	Heraeus

II. Material und Methoden

II.1.11 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in **Tabelle II-10** aufgeführt.

Tabelle II-10: Verwendetes Verbrauchsmaterial.

Material	Hersteller
Microamp Fast 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems
Gasperlen	Bastelbedarf
Elektrophoresekammer Mini-PROTEAN!3Cell	BioRad
Elektrophoresekammer Comphor Mini/ Midi	Biozym
Mikrotiterplatten für Luminometer	Dynatec
Elektroporationsküvetten 2mm	Eurogentec
Glasstäbe	Glasbläserei Uni HH
Einmal-Spritzen Omnifix, 10 mL 5 mL	Merck
Parafilm M	Peske
Einmalküvetten 10 mm	Sarstedt
Kryoröhrchen Cryo Pure	Sarstedt
Petrischalen	Sarstedt
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
Impföse	VWR
Mikrotiterplatten 96 well	VWR

II.1.12 Software

Die in dieser Arbeit verwendete Software ist in **Tabelle II-11** aufgeführt.

Tabelle II-11: Auflistung verwendeter Software.

Software	Hersteller	Quelle	Referenz
LucySoft 1.6	Anthos	Hersteller	
Nanodrop® ND-1000 V3.5.2	Thermo Scientific	Hersteller	
Varian Cary Win UV series	Varian	Hersteller	
Vector NTI Advance™ 11	Invitrogen	Hersteller	
Phylogeny.fr	Laboratoire d'Informatique, de Robotique et de Microelectronique de Montpellier	www.phylogeny.fr	(Dereeper et al. 2008)
SyntTax		www.archaea.u-psud.fr/synttax/	(Oberto 2013)
Genome Synteny Analyzer	Institut deGénétique et Microbiologie, Université Paris-Sud	www-archbac.u-psud.fr/genomics/syntenizer.html	
AMBER Version 11		www.ambermd.org	(D. A. Case et al. 2014)
MODELLER Version 9.10	University of California, San Francisco, USA	www.salilab.org/modeller/	(Fiser and Sali 2003)
VMD Version 1.9.1	University of Illinois at Urbana-Champaign, USA	www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/	(Humphrey, Dalke, and Schulten 1996)

II.2 Methoden

II.2.1 Mikrobiologische Methoden

II.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Zellanzucht der verschiedenen Bakterienstämme in Flüssigkulturen wurde volumenabhängig in Reagenzgläsern (für 3 mL) oder in Erlenmeyerkolben (10 mL und mehr) mit vier- bis fünffachem Fassungsvermögen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C schüttelnd mit 130-180 rpm. Kulturen, die in der stationären Phase weiterverarbeitet wurden, wurden über Nacht inkubiert. Das jeweilige Medium, zumeist LB, wurde dazu mit Zellmaterial von frischen Festkulturen mit einem sterilen Glasstab beimpft, bzw. bei größeren Kulturvolumen mit einem 1 %igen (V/V) Inokulum einer frischen über Nacht inkubierten Flüssigkultur.

Festkulturen wurden auf agarhaltigem LB-Medium in Petrischalen angelegt. Beimpft wurden diese durch einen Dreiösenausstrich mit sterilen Glasstäben oder Impfösen mit Zellmaterial von

II. Material und Methoden

Festkulturen. Inokula aus Flüssigkulturen wurden in Volumina zwischen 20 und 400 μL gleichmäßig mit sterilen Drigalskispateln oder Glasstäben auf den Agarplatten verteilt. Die Inkubation erfolgte über Nacht oder länger bei 37°C mit dem Deckel der Petrischale nach unten. Die Anzucht von plasmidtragenden Bakterienstämmen wurde in Flüssig- oder Festmedien unter Selektionsdruck mit entsprechenden Antibiotikazusätzen durchgeführt.

II.2.1.2 Lagerung von Bakterienkulturen

Die Lagerung von Kulturen über maximal vier Wochen erfolgte bei 4°C auf Festmedien in Petrischalen, die mit Parafilm versiegelt wurden. Für die Langzeitlagerung wurden Dauerkulturen in 2 mL-Kryokulturgefäßen angelegt. Diese wurden mit einem Dauermedium, bestehend aus Standard-I-Flüssigmedium und 87 %igem Glycerol im Verhältnis 1:2 befüllt, sowie mit ca. 20 Glasperlen. Die Beimpfung erfolgte mit Zellmaterial von 3-5 Kolonien frischer Festkulturen mit sterilen Glasstäben. Nach einer 30 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde der Flüssigkeitsüberstand abgenommen und das Kulturröhrchen bei -80°C eingefroren. Die Reaktivierung der Dauerkultur erfolgte aus einer angetauten Kultur durch die Entnahme einer Glasperle, mit der dann eine Festkultur beimpft wurde.

II.2.1.3 Überwachung des Kulturwachstums mittels optischer Dichte

Bakterienkulturen für die Herstellung von kompetenten Zellen oder in der Lumineszenzmessung wurden zu einer definierten Zelldichte angezogen. Die indirekte Bestimmung der Zelldichte wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) durchgeführt. Die Zellsuspension wurde in Einwegküvetten überführt und in einem Photometer die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen einen Nullwert mit jeweiligem Ausgangsmedium bestimmt. Bei Extinktionswerten von über 0,8 wurde die Suspension mit Medium verdünnt.

II.2.1.4 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, die unter definierten Bedingungen ein sichtbares Bakterienwachstum verhindert. Die Durchführung entspricht den Vorgaben des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) für das Mikrodilutionsverfahren (Bouillondilutions-verfahren).

Für die Bestimmung wurden 96-well Platten verwendet, in denen serielle Verdünnungsstufen in 1:2 Schritten der eingesetzten Antibiotika vorgelegt wurden. Die Verdünnungen wurden in Müller-Hinton-Medium in zweifacher Endkonzentration angelegt. Die Kavitäten der 96-well Platte wurden mit jeweils 50 μL der entsprechenden Antibiotikallösung befüllt und bei der Beimpfung mit 50 μL Bakteriensuspension 1:2 auf die Endkonzentration verdünnt. Die Platten

II. Material und Methoden

wurden nach der Herstellung sofort verwendet oder am nächsten Tag und bis dahin abgedeckt mit einer sterilen leeren Mikrotiterplatte bei 4°C gelagert. Für die Impfsuspension wurden Zellen einer frischen über Nacht inkubierten Flüssig- oder Festkultur verwendet. Zunächst wurde eine Zellsuspension in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und auf einen McFarland Standard von 0,5 eingestellt. Diese Suspension wurde dann 1:100 in Müller-Hinton Medium verdünnt und die Kavitäten der Mikrotiterplatte mit 50 µL dieser Suspension befüllt.

In Versuchen mit dem Effluxpumpeninhibitor (EPI) PAßN (Phenyl-Arginyl-β-Naphthylamin) wurde dieser in einer Endkonzentration der 1/8 MHK des jeweiligen Stammes entsprechend eingesetzt. Dazu wurde zunächst die MHK für PAßN nach der oben beschriebenen Methodik bestimmt. Der EPI wurde zu der entsprechenden doppelten Endkonzentration der Animpfsuspension in Müller-Hinton-Medium zugegeben und bei der Auftragung auf die Mikrotiterplatte auf die Endkonzentration verdünnt.

Die beimpften Platten wurden dann für 18-24 h bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch eine visuelle Begutachtung des Wachstums. Konzentrationsstufen, für die keine sichtbare Trübung in der entsprechenden Kavität zu verzeichnen war, wurden als hemmend eingestuft.

II.2.1.5 Stammtypisierung mittels biochemischer Reaktionsprofile

Die biochemische Charakterisierung von Bakterienstämmen wurde mit dem Multitestsystem Micronaut E (Fa. Merlin – Gesellschaft für Mikrobiologischen Diagnostika mbH) zur Identifikation von Enterobakterien und anderen Gram negativen durchgeführt. Die Teste wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

II.2.1.6 Stammtypisierung mittels massenspektrometrischer Profile

Die Stammtypisierung wurde mittels Massenanalyse im „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight (MALDI-TOF) Verfahren am Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg durchgeführt. Die Messung wurde in einem MALDI Biotyper LT der Firma Bruker daltonics nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Proben wurden im Direktauftrag vermessen und in einer Matrix bestehend aus 50 % (V/V) α-Cyano-4-Hydroxymizinsäure in Acetonitril und 2,5 % (V/V) Trichloressigsäure eingebettet. Die Auswertung wurde mit der Software Biotyper 3.0 der Firma Bruker durchgeführt.

II.2.2 Molekularbiologie Methoden

II.2.2.1 Isolierung der Gesamt-DNA aus Bakterien

Von einer frischen Übernachtskultur auf einer Agarplatte wurden ca. 3-5 Kolonien mit einem sterilem Glasstab aufgenommen und die Zellen anschließend in 100 µL dH₂O suspendiert.

II. Material und Methoden

Anschließend wurde die Suspension für 15 min auf 100°C erhitzt und die Zelltrümmer dann mit 13.000 rpm für 5 min bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Diese DNA-Lösung wurde dann in der Polymerasekettenreaktion eingesetzt.

II.2.2.2 Plasmidisolierung und -aufreinigung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden Bakterienzellen in einer flüssigen Übernachtskultur in LB-Medium unter Verwendung geeigneter Antibiotika bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase kultiviert. Je nach angestrebter DNA-Menge bzw. Kopiezahl der Plasmide in der Zelle wurde ein mini-prep bzw. ein midi-prep Ansatz durchgeführt.

II.2.2.2.1 Mini-Prep Ansatz

Drei mL einer Übernachtskultur wurden geerntet und das Pellet in 100 µL kaltem GTE-Puffer mit einem Zusatz von 200 mg/mL RNase A in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß suspendiert. Für den Zellaufschluss wurden dann 200 µL Lysispuffer zugegeben und das Reaktionsgefäß mehrfach invertiert. Nach drei min auf Eis wurden 150 µL kalter Neutralisationspuffer hinzugegeben, sofort mehrfach invertiert und erneut drei min auf Eis inkubiert. Die Abtrennung der in der Lösung enthaltenen Plasmid-DNA von der ausgefallenen chromosomalen DNA sowie von den übrigen Zellbestandteilen wurde das Gemisch bei RT für 5 min mit 15.000 rpm zentrifugiert und der klare Überstand anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für eine Anwendung der isolierten DNA in nachfolgenden Klonierungsprozessen wurde die DNA-Lösung an dieser Stelle durch eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Fällung zusätzlich von Polysacchariden und Proteinen bereinigt. Dazu wurde die Lösung mit gleichem Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Mischung versetzt und mehrfach invertiert. Nach der Zentrifugation für 2 min mit 13.000 rpm bei RT wurde die klare obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ohne dabei Präzipitat an der Phasengrenze zu verschleppen. Diese Extraktion wurde anschließend solange wiederholt, bis kein weißes Präzipitat an der Grenzschicht mehr vorhanden war. Danach wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe des doppelten Volumens an 100 %igen Ethanol ausgefällt und durch die Zentrifugation mit 13.000 rpm bei RT für 10-20 min abgeschieden. Der Überstand wurde dann vorsichtig entnommen. Zur Waschung des Präzipitates wurde 1 mL 70 %iger Ethanol zugegeben und erneut für 1 min mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dann erneut vorsichtig entnommen und der Waschschrift einmal wiederholt. Der Überstand wurde dann durch vorsichtiges Pipettieren nahezu vollständig entfernt und das Präzipitat bei 37°C im offenen Reaktionsgefäß getrocknet. Anschließend wurde es in 10 bis 50 µL 1:10 verdünnten TE-Puffer aufgenommen. Die Lösung des

II. Material und Methoden

Präzipitates wurde durch das Erwärmen auf 60°C beschleunigt. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

Bei Isolierungen von Plasmiden aus *E. coli* (nicht bei anderen Stämmen), die nicht in Klonierungsschritten verwendet werden sollten, wurde auf den Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Reinigungsschritt verzichtet und die DNA nach der Neutralisation direkt durch die Zugabe von Ethanol gefällt.

II.2.2.2 Midi-Prep-Ansatz

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu erhalten, wurden größere Volumina von Kulturflüssigkeit verarbeitet. Für die Isolierung aus 100 mL bewachsenen LB-Medium wurde dieses in zwei Schritten in einem 50 mL Reaktionsgefäß mit 4.000 rpm bei RT für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde dann in 5 mL kaltem GTE-Puffer mit einem Zusatz von 25 mg/mL Lysozym suspendiert durch gleichmäßiges Auf- und Abpipettieren. Anschließend wurden 10 mL Lysispuffer zugegeben und das Gemisch mehrmals invertiert, bis die Puffer gleichmäßig durchmischt waren. Der Ansatz wurde dann bei RT für maximal 5 min inkubiert, bis die Flüssigkeit etwas klarer geworden ist. Dann wurden 7,5 mL Neutralisationspuffer hinzugefügt, sowie 1 mL eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Gemisches, durch welches die Abscheidung von SDS durch die Ausfällung mit Kalium begünstigt wurde. Das Gemisch wurde erneut durch Invertieren gründlich homogenisiert und dann bei RT mit 4.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues 50 mL Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch die Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol ausgefällt. Das Präzipitat wurde dann über 15 min bei 4.000 rpm bei RT abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das erhaltene Pellet direkt in 2 mL 1:10 verdünnten TE-Puffer gelöst. Die Lösung wurde dann in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 100 µL RNase-Lösung (10 mg/mL) versetzt und für mindestens 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit gleichem Volumen einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) Lösung versetzt und mehrfach invertiert. Nach der Zentrifugation für 5 min mit 4.000 rpm bei RT wurde die klare obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ohne dabei Präzipitat an der Phasengrenze zu verschleppen. Diese Extraktion wurde anschließend solange wiederholt, bis kein weißes Präzipitat an der Grenzschicht mehr vorhanden war. Danach wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,1 Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und dem doppelten Volumen 100 %igen Ethanol gefällt und anschließend für 15 min bei RT mit 4.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das erhaltene Pellet mit 1 mL einer wässrigen 70 %igen Ethanol-Lösung versetzt und erneut für 2 min mit 4.000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dann erneut vorsichtig entnommen und der Waschschrift einmal wiederholt. Im Anschluss daran

wurde der Überstand durch vorsichtiges Absaugen nahezu vollständig entfernt und das Präzipitat bei 37°C im offenen Reaktionsgefäß getrocknet. Abschließend wurde es in 100 µL 1:10 verdünnten TE-Puffer aufgenommen. Die Lösung des Präzipitates wurde durch das Erwärmen auf 60°C beschleunigt. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.

II.2.2.2.3 Mini-Prep-Ansatz mit kommerziellem Kit

Plasmid-DNA wurde z.T. auch mit Hilfe des Hi-Yield® Plasmid-Mini-Kits der Firma Südlabor präpariert. Die DNA-Isolierung und –Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde am Ende in 1:10 verdünnten Elutionspuffer des Kits eluiert und bei -20°C gelagert.

II.2.2.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer Lösung

II.2.2.3.1 Photometrische Bestimmung im NanoDrop

Für die photometrische Bestimmung der Konzentration gereinigter Plasmid-DNA-Lösungen wurde das UV-Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000 der Firma Thermo Fisher Scientific für Mikrovolumina verwendet. Die Bestimmung wurde mit 1-2 µL der DNA-Lösung durchgeführt, wobei das Absorptionsspektrum kontinuierlich für den Wellenlängenbereich von 220-750 nm gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Firmensoftware, welche die Nukleinsäurekonzentration berechnete. Die Reinheit wurde über den Quotienten der Absorptionswerte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm berechnet. Als ausreichend gereinigte DNA wurde ein Quotient von 1,8-1,9 anerkannt. Geringere Werte deuteten auf Protein- und höhere auf RNA-Verunreinigungen hin.

II.2.2.3.2 Konzentrationsabschätzung auf dem Agarosegel

Die Konzentration von PCR-Produkten konnte nicht photometrisch bestimmt werden, da hierbei immer die Gesamtnukleinsäuremenge bestimmt wird. Bei PCR-Produkten ist jedoch nur der Anteil polymerisierter Nukleinsäuren der Lösung von Interesse. Deshalb wurde die Konzentration von PCR-Produkten in der Agarosegelelektrophorese (siehe II.2.2.4) durch den Vergleich der Bandenintensität mit einem Größenstandard bekannter Konzentration verglichen und die Konzentration abgeschätzt. Diese Methode wurde bei Plasmid-DNA nur mit zuvor linearisierten Plasmiden durchgeführt, um eine definierte Bande zu erhalten.

II.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung erzeugter PCR Produkte, isolierter Plasmide und von Restriktionsverdauen wurden diese in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem Größenstandard verglichen. Die Agarose wurde in 0,5x TAE-Puffer einer Mikrowelle bis zur Homogenität der

II. Material und Methoden

Lösung gekocht. Nach kurzem Abkühlen wurde Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,01 µg/mL zugegeben und das Gel in einen abgedichteten Gelträger gegossen. Das erstarrte Gel wurde dann mit 0,5x TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen Bromphenolblau-Ladepuffer (6x) vermischt auf das Gel aufgetragen. Ebenso wurde ein geeigneter Größenstandard aufgetragen (siehe II.1.4). Die Elektrophorese wurde bei mit einer Spannung von 3-8 V/cm Gellänge durchgeführt. Nach der Auftrennung wurden die DNA-Banden mit UV-Licht (302 nm) in einer Geldokumentationsanlage sichtbar gemacht und fotografiert.

II.2.2.5 Restriktionsverdau

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA-Molekülen erfolgte enzymatisch im Restriktionsverdau. Hierbei wurden die unter II.1.6 aufgeführten Typ-II-Restriktionsenzyme verwendet. Die Reaktionen wurden jeweils nach Herstellerangaben in den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Analytische Verdau zur Prüfung des Restriktionsschnittmusters wurden in 20 µL, Präparative Verdau für die nachfolgende Isolierung einzelner Fragmente oder zur Vorbereitung von PCR-Produkten für die Ligation wurden der jeweils eingesetzten DNA-Menge entsprechend in größere Volumina von bis zu 50 µL durchgeführt. Alle hier verwendeten Enzyme wurden nach dem Restriktionsverdau durch Hitze nach Herstellerangaben inaktiviert, bevor die Reaktionsprodukte weiterverwendet wurden.

II.2.2.6 Dephosphorylierung

Mit Restriktionsenzymen behandelte Plasmide oder PCR-Produkte mit blunt ends wurden einer Dephosphorylierung der endständigen 5'-Phosphatgruppen unterzogen, um einer Religation vorzubeugen. Dazu wurden alternativ zwei Enzyme verwendet: Antarctic Phosphatase (Fa. New England Biolabs) bzw. die FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fa. Lifetechnologies). Die Reaktion wurde jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt und ggf. mitgelieferte Puffer verwendet. Vor der Weiterverarbeitung der Lösung wurden die Enzyme nach Herstellerangaben durch Hitze inaktiviert.

II.2.2.7 Ligation

Um lineare DNA-Fragmente an ihren Enden kovalent miteinander zu verknüpfen, wurden diese enzymatisch ligiert. Hierfür wurde die T4 Ligase des Phagen T4 verwendet. Für die Ligation von linearisierter Vektor-DNA mit einem Insert-Fragment wurden diese im molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Für 100 ng Plasmid-DNA wurden 1 U der T4 Ligase verwendet. Die Reaktion fand nach Herstellerangaben im mitgelieferten Puffer statt. Ligationen von blunt ends wurden über Nacht bei 4°C durchgeführt. DNA-Fragmente mit komplementären *sticky ends* wurden über

1 h bei 22°C ligiert. Die Inaktivierung der Ligase erfolgte durch eine 10 min Inkubation bei 65°C. Der Ligationsansatz wurde anschließend direkt zur Transformation chemisch kompetenter Zellen eingesetzt. Ansätze für die Transformation durch Elektroporation wurden zusätzlich über eine Silikatsäule wie unter II.2.2.13.1 beschrieben aufgereinigt.

II.2.2.8 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Um Plasmid in Bakterienzellen einzuschleusen wurden diese mit der DNA transformiert. Hierfür wurden mit der Hitzeschocktransformation und der Elektroporation zwei verschiedene Methoden verwendet. Für beide mussten die zu transformierenden Zellen jeweils unterschiedlich aufbereitet werden, um diese entsprechend kompetent zur Aufnahme der DNA zu machen.

II.2.2.8.1 Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen

Für die Transformation mittels Hitzeschock nach Hanahan (1983) wurden die Zellen mittels Ca²⁺ und Mg²⁺ Ionen behandelt, um ihre Membranen für größere DNA Moleküle durchgängig zu machen. Dazu wurde mit einem Inokulum einer frischen über Nacht inkubierten 3 mL Flüssigkultur in LB-Medium eine größere 100 mL Kultur in SOB-Medium im Verhältnis 1:100 beimpft. Diese wurde bei 37°C mit 130 rpm schüttelnd bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert (siehe II.2.1.3). Die Kultur wurde dann vollständig in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt, für 10 min auf Eis inkubiert und die Zellen mit 4.000 rpm bei 4°C über 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 mL eiskaltem TFB 1-Puffer aufgenommen und erneut nach 10 min Inkubation auf Eis abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 2 mL eiskaltem TFB 2-Puffer aufgenommen und die Suspension zu 200 µL Aliquots in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Durch den in TFB 2 enthaltenen Glycerol-Anteil konnten die Zellen bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert werden.

II.2.2.8.2 Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Zellen

Zur Transformation chemisch kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA wurden diese auf Eis für ca. 10 min aufgetaut, 200 µL Zellsuspension mit 50-100 ng Plasmid-DNA bzw. entsprechendem Ligationsansatz (siehe II.2.2.7) versetzt, vorsichtig durchmischt und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Wasserbad für 90 sec einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach 3 min wurde die Suspension mit 1 mL SOC Medium versetzt und für 45 min bei 37°C schüttelnd mit 130 rpm inkubiert. Dann wurden die Zellen zu Aliquots von 50-200 µL auf agarhaltigem LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen zur Selektion der transformierten Plasmide ausplattiert. Die Festkulturen wurden bei 37°C über Nacht inkubiert, die erhaltenen Kolonien auf gleiche Nährböden überimpft

und erneut über Nacht inkubiert.

II.2.2.8.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen für die Elektroporation

Zellen für die Elektroporation wurden in salzfreie Suspensionen überführt, um diese unter hohe Spannung setzen zu können. Die Zellen wurden in 50 mL SOB-Medium, beimpft mit einer frischen über Nacht inkubierten 3 mL Flüssigkultur in LB-Medium im Verhältnis 1:100, bis zu einer OD_{600} von 0,5 (siehe II.2.1.3) bei 37°C mit 130 rpm schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde dann vollständig in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt, für 10 min auf Eis inkubiert und die Zellen mit 4.000 rpm bei 4°C über 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann zunächst in 5 mL eiskaltem sterilem dH_2O und nach weiteren zwei Zentrifugationsschritten in 2 mL und dann in 0,5 mL eiskaltem sterilem dH_2O aufgenommen. Diese Suspension wurde dann entweder direkt zur Elektroporation eingesetzt oder für die Lagerung mit 87 %igem Glycerol im Verhältnis 1:2 vermischt und in 50 μ L Aliquots in 1,5 mL Reaktionsgefäßen bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

II.2.2.9 Elektroporation

Ein Aliquot von 50 μ L elektrokompetenten Zellen wurde mit 20 – 200 ng Plasmid-DNA bzw. mit entsprechendem Ligationsansatz (siehe II.2.2.7) versetzt, durchmischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann in auf Eis gekühlte Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 2 mm überführt. In einem Elektroporator (GenePulser®, Fa. BioRad Laboratories) wurden die Zellen für ca. 1 sec einem elektrischem Impuls ausgesetzt, wobei eine Spannung von 2,5 kV, eine Kapazität von 25 μ F und ein Widerstand von 200 Ω vorgegeben wurden. Danach wurde die Suspension sofort mit 1 mL SOC Medium versetzt und für 45 min bei 37°C schüttelnd mit 130 rpm inkubiert. Dann wurden die Zellen zu Aliquots von 50-200 μ L auf agarhaltigem LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen zur Selektion der transformierten Plasmide ausplattiert. Die Festkulturen wurden bei 37°C über Nacht inkubiert, die erhaltenen Kolonien auf gleiche Nährböden überimpft und erneut über Nacht inkubiert.

II.2.2.10 PCR

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Methode der Polymerasekettenreaktion nach Mullis et al. (1986) angewendet. Für Standardamplifikationen wurde dazu die DreamTaq®-DNA-Polymerase (Fa. Thermo Fisher Scientific) bzw. für Amplifikate, die nachfolgend in der Plasmidkonstruktion verwendet werden sollten, die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Fa. New England Biolabs) mit niedrigerer Fehlerrate verwendet. Dabei wurden die jeweils vom Hersteller mitgelieferten Polymerase-Puffer mit voreingestellter Mg^{2+} Konzentration verwendet.

II. Material und Methoden

Weiter wurden Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) der Fa. Roche verwendet. Die Reaktionen wurden je nach verwendeter Polymerase in einem entsprechenden Standardprotokoll (siehe **Tabelle II-12** und **Tabelle II-13**) in einem Thermocycler unter den in **Tabelle II-14** aufgeführten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Reaktionstemperatur der *annealing*-Phase T_{ann} wurde dabei der Schmelztemperatur T_m der Primer angepasst. Diese wurde näherungsweise nach folgender Formel berechnet:

$$1 \quad T_m = (\Sigma A+T) \times 2^\circ\text{C} + (\Sigma G+C) \times 4^\circ\text{C}$$

Die *annealing*-Temperatur wurde wie folgt berechnet:

$$2 \quad T_{ann} = \frac{(T_{m \text{ Primer 1}} + T_{m \text{ Primer 2}})}{2} - 5^\circ\text{C}$$

Tabelle II-12: Standard-PCR Reaktionsansatz für die DreamTaq™-DNA-Polymerase (Fa. Lifetechnologies).

DreamTaq®-Puffer.(10x)	2 µL
dNTPs (2 mM)	2 µL
Primer 1 (10 µM)	0,4 µL
Primer 2 (10 µM)	0,4 µL
Polymerase (5 U/µL)	0,1 µL
Template-DNA	10 pg-10 ng
dH ₂ O.	ad 20 µL

Tabelle II-13: Standard Standard-PCR Reaktionsansatz für die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Fa. New England Biolabs).

Phusion® HF-Puffer.(5x)	10 µL
dNTPs (2 mM)	5 µL
Primer 1 (10 µM)	2,5 µL
Primer 2 (10 µM)	2,5 µL
Polymerase (2 U/µL)	0,5 µL
Template-DNA	10 pg-10 ng
dH ₂ O.	ad 50 µL

II. Material und Methoden

Tabelle II-14: Reaktionsbedingungen der Polymerasekettenreaktion für die DreamTaq™-DNA-Polymerase (Fa. Lifetechnologies) und die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Fa. New England Biolabs). Die annealing Temperatur wurde dem jeweiligen Primerpaar gemäß der Formeln 1 und 2 angepasst.

	DreamTaq™-DNA Polymerase		Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	
Initiale Denaturierung	2 min	94°C	30 sec	98°C
Denaturierung	30 sec	94°C	5 sec	98°C
30 x <i>annealing</i>	30 sec	X°C ¹	30 sec	X°C
Elongation	1 min/1 kb	72°C	30 sec/1 kb	72°C
Finale Elongation	10 min	72°C	10 min	72°C
	∞	4°C	∞	4°C

Zur Optimierung der PCR-Reaktionsbedingungen wurde die Gradienten-PCR angewendet. Hierbei wurden mehrere identische PCR-Reaktionen angesetzt (siehe **Tabelle II-12**) und parallel mit verschiedenen annealing-Temperaturen durchgeführt in einem Biometra T Gradienten Thermocycler. Die Reaktionszeiten und -Temperaturen der Reaktionsschritte wurden nach dem in **Tabelle II-14** beschriebenen Protokoll verwendet.

II.2.2.11 Site-Specific-Mutagenesis (SSM) PCR

Um gezielte Substitutions- und Deletionsmutationen an spezifischen Bereichen der DNA-Sequenz von Plasmiden einzuführen, wurde eine spezielle Variante der PCR Reaktion nach Jones and Howard (1991) eingesetzt. Bei dieser *site specific mutagenesis* (SSM) PCR wurden die Plasmide in voller Länge mit Primern amplifiziert, die exakt an dem zu verändernden DNA-Sequenzbereich banden. Die Primer beinhalteten die zu veränderte Sequenz, bzw. bei Deletionsmutationen deckten sie den zu deletierenden Sequenzbereich nicht ab, wohl aber die flankierenden Bereiche. Weiter waren die Primer in einer Länge von ca. 20 bp an ihren 5'-Enden komplementär zu einander. Die PCR-Reaktion wurde wie unter II.2.2.10 beschrieben in 50 µL Ansätzen mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Fa. New England Biolabs) durchgeführt. Als Template-DNA wurde 1 µL einer 1:1000 verdünnten Plasmid-Lösung eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Kit aufgereinigt (siehe II.2.2.13.1) und einem Restriktionsverdau mit dem Enzym *DpnI* (Fa. New England Biolabs) unterzogen wie unter II.2.2.5 beschrieben. Hierbei wurden spezifisch die aus den Bakterienzellen stammende methylierte Template-DNA abgebaut, die nicht die gewünschten Mutationen enthielt. Die linearen PCR-Produkte wurden dann in der Transformation von chemisch kompetenten Zellen eingesetzt (siehe II.2.2.8). Die Rezirkularisierung der Plasmid-DNA erfolgte enzymatisch durch zelleigene Mechanismen.

II.2.2.12 ARMS-PCR

Um Mutationen in der DNA-Sequenz spezifisch nachweisen zu können wurde die ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System) nach Newton et al. 1989 eingesetzt. Bei der Amplifikation wurde ein Primer so gewählt, dass er mit den drei letzten Basen des 3'-Endes komplementär zu den mutierten Basen war. Zur Kontrolle wurde ebenfalls eine Primervariante entworfen, die dem nicht mutierten Template entsprach. Die PCR wurde dann wie unter II.2.2.10 beschrieben mit der DreamTaq®-DNA-Polymerase (Fa. Thermo Fisher Scientific) mit beiden Primervarianten in getrennten Ansätzen durchgeführt. Als Template-DNA wurde die Gesamt-DNA der jeweiligen Zellen eingesetzt (siehe II.2.2.1). Ein entstandenes PCR-Produkt zeugte von der Anwesenheit der jeweils durch die eingesetzte Primervariante geprüften Template-Variante.

II.2.2.13 Aufreinigung von PCR- und Restriktionsverdauprodukten

II.2.2.13.1 Aufreinigung mittels kommerziellem Kit

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR- oder Restriktionsreaktionen wurde das Hi Yield® PCR-Clean-Up & Gel-Extraction Kit (Fa. SLG) verwendet. Dabei wurde nach mitgeliefertem Protokoll vorgegangen und alle im Kit enthaltenen Lösungen, Silikatsäulen und Gefäße verwendet.

II.2.2.13.2 DNA-Aufreinigung nach Isolierung aus Agarosegelen

Insbesondere um einzelne DNA-Fragmente nach vorangegangenem Restriktionsverdau aus einem Fragmentgemisch zu isolieren, wurden diese zunächst im Agarosegel wie unter II.2.2.4 beschrieben elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt. Das gewünschte Produkt wurde unter Fluoreszenzanregung unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel isoliert. Für die Aufreinigung der DNA aus dem Gelstück wurde das Hi Yield® PCR-Clean-Up & Gel-Extraction Kit (Fa. SLG) verwendet, wobei nach Herstellerangaben vorgegangen wurde.

II.2.2.13.3 Aufreinigung von PCR-Produkten für die Sequenzierung

Die Aufreinigung von PCR-Produkten zur Sequenzierung erfolgte enzymatisch. Hierbei wurden die nach der PCR im Reaktionsansatz verbliebenen Oligonukleotide mit der Exonuclease *ExoI* (Fa. Thermo Fisher Scientific) und einzelne Nukleotide mit der alkalischen Phosphatase FastAP (Fa. Thermo Fisher Scientific) abgebaut (nach Werle et al. 1994). Jeweils 5 µL PCR-Produkt wurden mit 10 U *ExoI* und 1 U FastAP versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Enzyme wurden dann bei 85°C über 15 min hitzeinaktiviert. Die so aufgereinigte DNA-Lösung wurde direkt für die DNA-Sequenzierung eingesetzt.

II.2.2.14 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden nach einer Weiterentwicklung der Methode der Kettenabbruchreaktion nach Sanger (Sanger, Nicklen, and Coulson 1977) durchgeführt (Beckman Coulter Inc 2012). Hierbei werden in einer Cycle Sequencing Reaktion fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge erzeugt, die dann in einer Kapillarelektrophorese der Länge nach aufgetrennt werden. Die Auftrennung und Detektion der markierten Fragmente erfolgte in dem Gerät GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System (Fa. Beckmann Coulter).

Als Template für die Reaktion wurden PCR-Produkte verwendet, die wie unter II.2.2.13.3 beschrieben aufgereinigt wurden. Für die Sequenzierung von Produkten einer Größe von bis zu 400 bp wurden 5 - 40 ng DNA, von Produkten einer Größe von bis zu 1000 bp 30 - 100 ng DNA in der Cycle Sequencing Reaktion eingesetzt. Weiter wurden 1 µL des Primers (10 pmol/µL) sowie 1 µL DMSO hinzugefügt. Weiter wurde der Quick Start Mix, bestehend aus DNA-Polymerase, dNTPs und fluoreszenzmarkierten dNTPs sowie der Reaktionspuffer des GenomeLab™ DTCS Quick Start Kits (Fa. Beckmann Coulter) nach Herstellerangaben verwendet, wobei die Größe des Templates berücksichtigt wurde. Das Reaktionsvolumen wurde mit dH₂O auf 20 µL aufgefüllt. Die anschließende Cycle Sequencing Reaktion wurde in einem Thermocycler nach in **Tabelle II-15** aufgeführtem Reaktionsprotokoll durchgeführt.

Die Reaktionsprodukte wurden dann in einer Ethanol-Fällung aufgereinigt. Hierzu wurden zu jedem 20 µL Ansatz 5 µL Fälllösung, bestehend aus 2 µL einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2), 2 µL einer 100 mM EDTA-Lösung (pH 8) und 1 µL Glykogen, hinzugefügt sowie 60 µL absoluten Ethanols. Das Gemisch wurde dann für 15 min bei RT mit 13.000 rpm zentrifugiert und das Pellet in zwei Waschrissen mit 200 µL 70% igem Ethanol und anschließender Zentrifugation (1 min, 13.000 rpm, RT) von restlichen Salzen bereinigt. Das Pellet wurde abschließend in 30 µL Sample Loading Solution des GenomeLab™ DTCS Quick Start Kits aufgenommen und in der Sequenzierung eingesetzt. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mit dem Softwarepaket Vector NTI Advance™ Version 11.5.

Tabelle II-15: Reaktionsbedingungen der Cycle Sequencing Reaktion.¹Die *annealing* Temperatur wurde dem jeweiligen Primerpaar gemäß der Formeln 1 und 2 angepasst.

	Denaturierung	20 sec	96°C
30 x	<i>annealing</i>	20 sec	X°C ¹
	Elongation	4 min	60°C

II.2.3 Lumineszenzmessung

Die Bestimmung der Lumineszenz wurde unter Verwendung des Kits Luciferase Assay System (Fa. Promega) und den darin enthaltenen Reagenzien durchgeführt. Das Probenmaterial wurde zuvor wie folgt aufbereitet: Zunächst wurden Übernachtskulturen der zu untersuchenden Stämme in LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum angelegt. Aus diesen wurden dann 50 mL Kulturen in 250 mL Erlenmeyerkolben in LB-Medium ohne Antibiotikum angeimpft, jeweils mit einem 100 μ L Inokulum. Die Kulturen wurden dann bei 37°C und 220 rpm permissiver Rotation inkubiert bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 (siehe II.2.1.3). Anschließend wurden 45 μ L der Bakterienzellsuspension entnommen und mit 5 μ L Lumineszenzprobenpuffer vermischt, gevortext und dann bei -80°C für mindestens 30 min eingefroren. Daraufhin wurde die Suspension rasch unter Wärmeeinwirkung aufgetaut und mit 150 μ L Lumineszenz-Lysismix vermischt, gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Dann wurden je Probe jeweils dreimal 2,5 μ L des Gemisches mit 22,5 μ L LAR (Luciferase Assay Reagent, im Kit enthalten) in einer Mikrotiterplatte vermischt, wobei das LAR vorgelegt wurde. Eine Minute nach der letzten LAR-Zugabe wurde die Lumineszenz mit Hilfe des Luminometers Lucy2 (Fa. Anthos) unter Verwendung der Messsoftware Lucisoft, Version 1.6 (Fa. Anthos) bestimmt. Aus den drei Biolumineszenz-Einzelwerten einer Probe wurde ein Mittelwert gebildet. Die spezifische Aktivität wurde durch Division des Mittelwertes durch den OD₆₀₀-Wert der Kultur zum Zeitpunkt der Probenentnahme errechnet.

II.2.4 Bioinformatische Methoden

II.2.4.1 Sequenzdatenverarbeitung und Stammbaumberechnung

Die Verarbeitung von DNA- oder Aminosäuresequenzdaten wurde primär mit dem Softwarepaket Vector NTI Version 11.5 (Fa. Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Dazu zählten die Analyse von Elektropherogrammen der DNA-Sequenzierungen, die Translation von DNA- in Aminosäuresequenzen, das Alignment mehrerer DNA- bzw. Aminosäuresequenzen, die Konstruktionsplanung von Plasmiden sowie der Entwurf von Oligonukleotiden.

Der Abgleich von DNA-Sequenzen mit Datenbanken publizierter Sequenzen wurden mittels des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) durchgeführt (Altschul et al. 1990) auf der Internetpräsenz des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Für die Analyse von Syntenien mittels BLAST-Algorithmen wurden die online verfügbaren Programme SyntTax (Oberto 2013) und Genome Synteny Analyzer verwendet (siehe II.1.12) unter der Verwendung der Standardparameter.

Die Berechnung von Stammbäumen auf Basis von Sequenzalignments wurde mit dem

Softwarepaket Vector NTI 11.5 nach der Neighbor Joining Methode (Saitou and Nei 1987) berechnet, bzw. mit der online Software Phylogeny.fr (Dereeper et al. 2008) (siehe II.1.12), wobei die Alignments mit MUSCLE und die Bäume mit PhyML erstellt wurden. In beiden Fällen wurden die Stammbäume unter Verwendung der Standardparameter berechnet.

II.2.4.2 3D-Strukturmodellierung und Modellbewertung

Mit Hilfe des Homology Modelling ist es möglich *in silico* dreidimensionale Strukturmodelle für Proteine und Nukleinsäuren zu erstellen, für die keine experimentellen Strukturdaten zur Verfügung stehen. Die Modellierung erfolgt dabei auf Basis von Template-Strukturen, die mittels Kristallografie oder NMR-Spektroskopie beschrieben sind und eine möglichst hohe Sequenzhomologie bzw. -identität zu dem darzustellenden Protein oder Nukleinsäure aufweisen (Fiser and Sali 2003).

Das Homology Modelling wurde mit dem Programm MODELLER in der Version 9.10 nach dem Standardprozess durchgeführt (Sali and Blundell 1993). Die Qualitätsbewertung der erstellten Modelle hinsichtlich einer möglichst realistischen Abbildung von Bindungslängen und -winkel, sowie aller elektrostatischen Wechselwirkungen erfolgte anschließend automatisiert über die Berechnung eines consensus scores beschrieben durch (Kruggel and Lemcke 2009).

II.2.4.3 Dynamiksimulation in 3D-Strukturmodellen

Für die *in silico* Simulation von Moleküldynamiken ausgehend von Strukturmodellen wurde das Softwarepaket AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) in der Version 11 verwendet (Case et al. 2014). Die Simulation erfolgte im AMBER ff99SB Kraftfeld, welches der Berechnung auf experimentellen Daten basierende Werte für die Parameter Bindungslänge und -winkel, Torsionswinkel und elektrostatische sowie Van der Waals-Wechselwirkungen zu Grunde legt (Lindorff-Larsen et al. 2010). Der virtuelle periodische Reaktionsraum wurde durch oktaedrische oder quaderförmige Boxen definiert, in denen sich die jeweiligen 3D-Modelle in einem Abstand von mindestens 8 Å zum Rand befanden. Die Hohlräume in den Boxen wurden durch TIP3P-Wasser aufgefüllt. Dieses ist ein Wassermode, welches die sterischen und elektrostatischen Eigenschaften des Wassers bei minimaler Rechenkapazität ausreichend darstellt. Die Gesamtladung des Systems wurde mittels einfach geladenen Ionen mit der Bezeichnung ClO, die in ihren Parametern dem Na⁺-Ion entsprechen auf 0 eingestellt. Anschließend wurde das gesamte System mit dem Programm SANDER des AMBER-Softwarepakets energetisch minimiert, um den stabilsten Ausgangszustand herzustellen (Energetische Konvergenz). Daraufhin wurde die Dichte im System auf einen Wert von 1 g/cm³ angepasst. Im nächsten Schritt wurde die potentielle Energie ausgehend von einem 10 K

II. Material und Methoden

entsprechenden Wert auf 300 K erhöht, welches die Standardtemperatur für die Dynamiksimulation darstellt. Dann wurde die Boxgröße verändert, um wieder der vorgegebenen Dichte zu entsprechen und das System equilibriert. Von diesem Punkt an wurde bei der Berechnung das NPT-Ensemble eingehalten, bei dem die Stoffmenge, der Druck sowie die potentielle Energie in Form der Temperatur konstant ist. Die nachfolgende klassische Dynamiksimulation erfolgte mit dem Programm PMEMD des AMBER-Softwarepakets über einen Zeitraum von 14 ns. Die visuelle Darstellung der Simulation erfolgte mit dem Programm VMD (Visual Molecular Dynamics) Version 1.9.1 (Humphrey, Dalke, and Schulten 1996).

III. Ergebnisse

III.1 Analyse der DNA-Sequenz des *ramRA*-Operons in *Citrobacter*

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Gene *ramR*, *romA* und *ramA* in der Gattung *Citrobacter* lediglich in der Spezies *C. freundii* eingehend beschrieben worden (Pott 2011). Für einige andere Species der Gattung *Citrobacter* lagen PCR-Nachweise vor. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher die entsprechenden DNA-Sequenzen bestimmt und mit der bekannten Sequenz von *C. freundii* verglichen werden. Hierzu wurden vier *Citrobacter* Referenz-Stämme ausgewählt, welche die laborinternen Bezeichnungen GK1189, GK2519, GK2552 und GK708 trugen. Dafür wurde zunächst die angegebene Speziesidentität überprüft.

III.1.1 Speziesidentifizierung der verwendeten *Citrobacter*-Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *Citrobacter*-Stämme waren aufgrund einer frühen Spezieszuordnung ausgewählt worden. Für die nachfolgenden Analysen sollte diese Zuordnung mit verschiedenen, auch molekularen Verfahren überprüft werden. Die Stämme sind in **Tabelle III-1** aufgelistet. Die Überprüfung erfolgte zunächst anhand biochemischer Reaktionsprofile. Da bekannt war, dass nicht alle Stämme der gleichen Art zwangsläufig dasselbe Reaktionsprofil aufweisen müssen, war eine Überprüfung der Ergebnisse mittels anderer Messmethoden erforderlich. Dazu wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt und die erzeugten Spektren jeweils mit Referenzspektren verschiedener *Citrobacter*-Arten abgeglichen. In einem dritten Testansatz wurde die Identität partieller DNA-Sequenzen der Gene *gyrA* und *gyrB* der Stämme mit entsprechenden Referenzsequenzen verschiedener *Citrobacter*-Arten zum Vergleich herangezogen.

III. Ergebnisse

Tabelle III-1: Ursprüngliche Spezieszuweisung der verwendeten *Citrobacter*-Stämme zu Beginn der Arbeit sowie Referenzstämme mit bekannter Speziesidentifikation. GK-Nr.: Glycerinkulturnummer, [RS]: Referenzstamm der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen ("DSMZ" 2015) mit eindeutiger Spezieszuweisung

GK-Nr.	Spezies
100	<i>Citrobacter freundii</i>
708	<i>Citrobacter werkmanii</i>
1189	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
1253	<i>Citrobacter rodentium</i>
2519	<i>Citrobacter farmeri</i>
2552	<i>Citrobacter braakii</i>
4039	[RS] <i>Citrobacter amalonaticus</i> DSM4593
4089	[RS] <i>Citrobacter werkmanii</i> DSM17579

III.1.1.1 Biochemische Stammcharakterisierung

Zur Bestimmung der Spezies wurde für jeden Stamm eine Reihe von Standardtests durchgeführt, die auf verschiedenen enzymatisch katalysierten Redoxreaktionen oder Fermentationsstests beruhen. Dafür wurde das kommerzielle Messsystem Micronaut-E® der Firma Merlin wie unter II.2.1.5 beschrieben angewendet und anschließend per Sichtkontrolle nach Vorgabe des Benutzerhandbuches manuell ausgewertet. Die Stämme wurden jeweils in einer Doppelbestimmung charakterisiert. Zur weiteren Stützung der Identifizierung wurden mit *Citrobacter amalonaticus* DSM4593 (GK4039) und *Citrobacter werkmanii* DSM17579 (GK4089) zwei Stämme definierter Speziesidentität hinzugezogen. Beides sind Typstämme, also diejenigen, an denen die jeweilige Art erstmalig beschrieben worden ist. Die Ergebnisse sind in **Tabelle III-2** dargestellt.

Die Testergebnisse der jeweiligen Stämme wurden dann mit den durch Brenner et al. (1999) beschriebenen Reaktionsprofilen sämtlicher Spezies der Gattung *Citrobacter* abgeglichen. Diese sind in **Tabelle III-3** abgebildet. Hier ist jeweils der prozentuale Anteil des je Art untersuchten Stammkollektives angegeben, der im entsprechenden Test positiv reagiert hat. Für die Speziesidentifizierung wurden Übereinstimmungen im Reaktionsverhalten nur dann berücksichtigt, wenn der jeweilige Test in mindestens 66 % der Stämme des Referenzkollektivs einheitlich ausfiel. Für eine positive Reaktion entspricht das einer Angabe von größer oder gleich 66 %, für eine negative einer von kleiner oder gleich 33 %.

Die Ergebnisse des Profilabgleichs sind in **Tabelle III-4** dargestellt, in der für jeden Teststamm die Anzahl der Abweichungen vom jeweiligen Referenzprofil der Stammkollektive bzw. der hier vermessenen Typstämme aufgelistet sind. Als Schwellenwert einer Speziesübereinstimmung wurde hier eine Abweichung in einem Test toleriert. Der Abgleich zeigt, dass bis auf GK2519 die Stämme jeweils zu mehreren Spezies dieses Kriterium erfüllen und sich demnach nicht eindeutig

III. Ergebnisse

bestimmen lassen.

Wie die prozentualen Referenzwerte in Tabelle III-3 zeigen, sind Abweichungen im Reaktionsverhalten zwischen Stämmen derselben Spezies möglich, weshalb über die biochemische Charakterisierung allein keine eindeutige Spezieszuweisung möglich ist. Auffällig war, dass sich der vorab als *Citrobacter amalonaticus* identifizierte Stamm GK1189 deutlich vom Typstamm GK4039 dieser Art unterschied, insbesondere durch das Vermögen Malonat (MAL) als einzige Kohlenstoffquelle verwerten zu können. Dieses ist ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal für diese beiden Spezies. Eine weitere deutliche Abweichung in der Spezieszuweisung ergab sich für den Stamm GK2552, der zuvor als *C. braakii* identifiziert war, hier jedoch zwei Abweichungen zu dem entsprechenden Reaktionsprofil aufwies. Dagegen konnte die Identifizierung von Stamm GK708 als *Citrobacter werkmanii* untermauert werden. Zwar wies das Reaktionsprofil des Stammes zwei Unterschiede vom Referenzkollektiv auf, doch teilte er diese Eigenschaft mit dem Typstamm *C. werkmanii* DSM17579 (GK4089), mit dem er zu 100 % übereinstimmte (siehe auch **Tabelle III-2**).

III. Ergebnisse

Tabelle III-2: Biochemische Profile der untersuchten *Citrobacter*-Stämme. Angegeben sind die GK-Nummern der Untersuchungsstämme. Die Bestimmung erfolgte unter Verwendung des kommerziellen Messsystems Micronaut E® der Firma Merlin. Die Auswertung erfolgte per Sichtkontrolle. Die Stammbezeichnung der Teststämme entspricht jeweils der GK-Nummer.

+/-: positive/negative Reaktion, TDA: Tryptophan-Deaminase, H₂S: Schwefelwasserstoffproduktion, ESC: Esculin-Hydrolyse, IND: Indol-Produktion, URE: Urease, LDC: Lysin-Decarboxylase, ODC: Ornithin-Decarboxylase, ADH: Arginin-Hydrolyse, GLUF: Glucose-Abbau, CIT: Citrat-Abbau, MAL: Malonat-Abbau, VP: Voges-Proskauer-Test zum Nachweis der Bildung von Acetoin, RHAF: Rhamnose-Abbau, SUCF: Saccharose-Abbau, ADOF: Adonit-Abbau, INOF: Inosit-Abbau, XYLF: Xylose-Abbau, SORF: Sorbit-Abbau, ONPG: o-Nitrophenyl-β-Galaktopyranosid-Test zum Nachweis der β-Galactosidase, ONPX: o-Nitrophenyl-β-Xylosid-Test zum Nachweis der β-Xylosidase, PGUR: p-Nitrophenyl-β-Glucuronid-Test zum Nachweis der β-Glucuronidase

Test	Teststämme						Referenzstamm	
	100	708	1189	1253	2519	2552	4039	4089
TDA	-	-	+	-	+	+	+	-
H ₂ S	+	+	-	-	-	-	-	+
ESC	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	+	-	+	+	+	-
URE	+	-	-	-	-	-	+	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	+	+	+	+	+	-
ADH	-	-	+	-	-	+	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+	-	+	+	+
MAL	-	+	+	+	-	+	-	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-
RHAF	+	+	-	+	+	+	+	+
SUCF	-	-	-	-	+	-	-	-
ADOF	-	-	+	-	-	-	-	-
INOF	-	-	-	-	-	+	-	-
XYLF	+	+	+	+	+	+	+	+
SORF	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPX	-	-	+	-	-	+	-	-
PGUR	-	-	-	-	-	-	-	-

III. Ergebnisse

Tabelle III-3: Referenzwerte biochemischer Reaktionsprofile sämtlicher Spezies der Gattung *Citrobacter* nach Brenner et al. (1999). Angegeben sind die prozentualen Anteile des jeweils vermessenen Stammkollektivs einer Art, für die der entsprechende Test positiv ausgefallen ist. Die Anzahl der Stämme, die das jeweilige Stammkollektiv umfasst, ist in Klammern angegeben. Abkürzungen der Tests: siehe Tabelle III-2. Testergebnisse, in denen weniger als 66 % des entsprechenden Stammkollektivs einheitlich positiv oder negativ im jeweiligen Test reagiert haben, wurden für die Speziesidentifizierung nicht berücksichtigt und sind in Klammern abgebildet.

Test	Referenzspezies										
	<i>C. freundii</i> [49]	<i>C. koseri</i> [17]	<i>C. amalonaticus</i> [17]	<i>C. youngae</i> [39]	<i>C. braakii</i> [24]	<i>C. werkmanii</i> [13]	<i>C. seelaktii</i> [6]	<i>C. farmeri</i> [14]	<i>C. rodentium</i> [6]	<i>C. gillenii</i> [6]	<i>C. murimiae</i> [8]
H ₂ S	(59)	0	12	74	(41)	92	0	0	0	83	75
ESC	0	0	0	3	0	0	17	0	0	17	0
IND	12	94	94	10	21	0	100	100	0	0	100
URE	(57)	(59)	88	69	(38)	92	100	(43)	83	0	(63)
ODC	12	100	94	3	88	0	100	100	100	0	0
ADH	(51)	94	76	(54)	(54)	77	100	100	0	17	(50)
GLUF	86	100	82	85	88	92	100	100	100	100	100
CIT	80	100	100	74	75	92	83	0	0	(50)	88
MAL	8	94	0	3	0	92	100	0	100	100	0
SUCF	73	(47)	6	21	13	0	0	100	0	17	25
ADOF	0	94	0	0	0-6	0	0	0	6	0	0
ONPG	88	100	94	95	83	100	100	100	100	83	100

III. Ergebnisse

Tabelle III-4: Abgleich der biochemischer Reaktionsprofile zwischen Test- und Referenzstämmen. Angegeben ist jeweils die Anzahl der Abweichungen im Reaktionsverhalten, wobei Werte von 0 bis 1 blau hinterlegt sind. Die Stammbezeichnung der Teststämmen entspricht jeweils der Glycerinkulturnummer.

Referenzspezies	Teststämmen					
	100	708	1253	1189	2519	2552
<i>C. freundii</i>	1	2	3	5	3	4
<i>C. koseri</i>	5	5	3	0	4	1
<i>C. amalonaticus</i>	3	6	4	3	4	2
<i>C. youngae</i>	0	2	4	6	6	5
<i>C. braakii</i>	1	2	1	3	3	2
<i>C. werkmanii</i>	1	2	4	5	8	4
<i>C. sedlakii</i>	4	5	3	1	5	1
<i>C. farmeri</i>	5	7	5	4	1	3
<i>C. rodentium</i>	4	3	1	5	3	4
<i>C. gillenii</i>	2	0	2	5	5	4
<i>C. murlinae</i>	1	2	4	4	4	3
<i>C. amalonaticus</i> DSM4593 GK4039	4	6	4	6	3	4
<i>C. werkmanii</i> DSM17579 GK4089	2	0	2	8	7	6

III.1.1.2 Massenspektrometrische Stammcharakterisierung

Zur Speziesidentifizierung durch eine alternative Methode wurde eine massenspektroskopische Analyse durchgeführt. Dabei wurden ganze Zellen untersucht und entsprechend Spektren erzeugt. Diese Methode hat sich in den letzten Jahren als Standardmethode zur schnellen Speziesdifferenzierung auch bei Enterobakterien in der Diagnostik etabliert (van Veen, Claas, and Kuijper 2010). Hierfür wurde das kommerzielle Messsystem der Firma Bruker Daltronics verwendet, welches auf der MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight) Messmethode basiert.

Die Spezieszuweisung erfolgte unter Abgleich mit Referenzstämmen, die in einer zugehörigen Datenbank enthaltenen waren. Die Spezies *Citrobacter werkmanii* war jedoch nicht vertreten. Als Maß für die Übereinstimmung lieferte das System einen *scoring*-Wert. Identifizierungen auf Speziesebene setzten einen *scoring*-Wert von 2 voraus (Erfahrungswert, Dr. Martin Christner, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg). Als Kontrollen dienten die Stämme *Escherichia coli* ATCC35218 und *Citrobacter amalonaticus* DSM4593 (GK4039), deren Speziesidentität zweifelsfrei geklärt war. Die Messung wurde für jeden Stamm dreimal wie unter II.2.1.6 beschrieben durchgeführt und die jeweiligen *scoring*-Werte gemittelt. Die Ergebnisse sind in

III. Ergebnisse

Tabelle III-5 dargestellt.

Tabelle III-5: Ergebnisse der Speziesidentifizierung durch massenspektroskopische Analyse nach der MALDI-TOF-Methode. Angegeben sind die zu Beginn der Arbeit postulierten Spezieszuweisungen und die jeweils besten Treffer in der Datenbank (DB) nach Dreifachbestimmung. Die *scoring*-Werte aus den einzelnen Messungen wurden gemittelt. Die Stammmnummer der Teststämme entspricht jeweils der Glycerinkulturnummer.

Stamm	Postulierte Identität	Bester Treffer in DB	Score
100	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	2,443
708	<i>Citrobacter werkmanii</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	2,275
1189	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Citrobacter koseri</i>	2,397
1253	<i>Citrobacter rodentium</i>	<i>Citrobacter rodentium</i>	2,142
2519	<i>Citrobacter farmeri</i>	<i>Citrobacter farmeri</i>	2,045
2552	<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Citrobacter sedlakii</i>	2,199
4039	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2,082

Eine Falschzuweisung des Stammes GK708 durch diese Methode ist nicht auszuschließen, da die für diesen Stamm postulierte Spezies *Citrobacter werkmanii* nicht mit einem Referenzspektrum vertreten war. Wie bei der biochemischen Charakterisierung, weist der Stamm GK1189 die größte Übereinstimmung mit der Spezies *Citrobacter koseri* auf, abweichend von seiner vorangegangenen Identifizierung als *Citrobacter amalonaticus*. Die korrekte Bestimmung aller Stämme auf Gattungsebene wurde bestätigt. Die Zuweisung der Stämme GK1253 und GK2519 zu den Spezies *C. rodentium* bzw. *C. farmeri* wurde weiter untermauert. GK2552 weicht übereinstimmend mit der biochemischen Identifizierungsmethode von der Ausgangsspezieszuweisung *C. braakii* ab.

III.1.1.3 Molekulargenetische Stammcharakterisierung

In einem molekulargenetischen Ansatz zur Speziesdifferenzierung wurden die DNA-Sequenzen der Gene *gyrA* und *gyrB* in den untersuchten Stämmen mit entsprechenden publizierten Referenzsequenzen verglichen. Die Speziesidentifizierung sollte nach einer hohen prozentualen Sequenzübereinstimmung erfolgen, wobei keine klaren Grenzwerte für diese Gene vorlagen, da für die Spezies der Gattung *Citrobacter* bislang keine umfassenden phylogenetischen Untersuchungen auf Basis von DNA-Sequenzen verfügbar waren. Diese Analyse wurde deshalb lediglich zur Stützung der zuvor durchgeführten Analysen durchgeführt.

Die Gene *gyrA* und *gyrB* wurden ausgewählt, da sie als housekeeping Gene, kodierend für die Gyrase-Untereinheiten A und B, streng konserviert sind und publizierte Referenzsequenzen für zumindest einige *Citrobacter*-Spezies vorlagen. Desweiteren wurde *gyrB* für phylogenetische Studien in Enterobakterien bereits verwendet, wobei unterschiedliche Bereiche des Genes analysiert wurden (Fukushima, Kakinuma, and Kawaguchi 2002 (139 bp Fragment); Delmas et al.

III. Ergebnisse

2006 (506 bp Fragment)). Ein Vergleich der DNA-Sequenzen des 16S rRNA-Gens wurde hier als ungeeignet eingestuft, da die publizierten Referenzsequenzen der verschiedenen *Citrobacter*-Spezies teilweise Übereinstimmungen von 100 % aufwiesen und somit für die Speziesdifferenzierung eine zu geringe Variabilität boten (wurde im Alignment der Sequenzen geprüft, siehe **Tabelle IV-1**). Eine 100 %ige Übereinstimmung der DNA-Basenpositionen im 16S rRNA-Gen wurde zwischen den Stämmen *Citrobacter amalonaticus* CECT 863 (NCBI Acc.nr.: NR_104823.1) und *Citrobacter farmeri* strain CDC 2991-81 (NCBI Acc.nr.: NR_024861.1) beobachtet sowie zwischen den Spezies *Citrobacter murliniae* strain CDC 2970-59 (NCBI Acc.nr.: NR_028688.1) und *Citrobacter werkmanii* strain CDC 0876-58 (NCBI Acc.nr.: NR_024862) und weiter auch zwischen *Citrobacter braakii* 167 (NCBI Acc.nr.: NR_028687.1) und *Citrobacter freundii* ATCC 8090 (NCBI Acc.nr.: NR_028894.1). Auch in publizierten Untersuchungen wurde die 16S rRNA zur Speziesdifferenzierung in *Citrobacter* als ungeeignet eingestuft (Delmas et al. 2006, Kolínská et al. 2015).

Teilbereiche der Gene *gyrA* und *gyrB* wurden sequenziert. Zur Amplifizierung von *gyrA* wurde dazu das Primerpaar *gyrA*-5-1 und *gyrA*-3-1 (letzterer als Sequenzierprimer) für die Stämme GK100, GK1189, GK2552 und GK708 verwendet, welches den 5'-Bereich sowie den upstream-Bereich des Gens in einer Länge von 526 bp abdeckte (siehe **Abbildung III-1**). Für die Stämme GK4039 und GK2519 war eine Sequenzierung mit diesen Primern nicht möglich, weshalb hier das Primerpaar 5'*gyrA*_MPC_+209 und *gyrA*-GA2 (letzterer als Sequenzierprimer) verwendet wurde, dessen PCR-Produkt ebenfalls den 5'-Bereich des Genes 301 bp abdeckte (siehe **Abbildung III-2**). Die Sequenzierung von *gyrB* wurde für alle Stämme mit den Primern *gyrB*_Citrobacter_5'+132 und *gyrB*_Citrobacter_3'+1032 durchgeführt, die einen 955 bp langen Bereich im 5'-Bereich des Gens abdeckten (siehe **Abbildung III-3**). Die Primersequenzen sind unter II.1.1 aufgeführt. PCRs wurden nach Standardprotokoll wie unter II.2.2.10 beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden zusammen mit den verfügbaren publizierten Referenzsequenzen in multiplen Sequenzalignments im Programm *Vector NTI* [Version 11.5] nach dem CLUSTAL W Algorithmus aligniert. Anschließend wurden die Sequenzlängen auf die jeweils kürzeste Sequenz im Alignment angepasst. Für *gyrA* ergab sich daraus der Sequenzbereich +234 bis +420 (187 bp) und für *gyrB* der Sequenzbereich +328 bis +833 (506 bp). Aus den erzeugten Alignments wurde die prozentuale Übereinstimmung der Sequenzen im paarweisen Vergleich berechnet. Die Alignments sind im Anhang unter VIII.1.2.1 und VIII.1.2.2 aufgeführt. Die erhaltenen Prozentwerte für *gyrA* und *gyrB* sind in **Tabelle III-6** und **Tabelle III-7** abgebildet. In **Tabelle III-8** sind die möglichen Spezieszuweisungen der Stämme basierend auf einer Basenübereinstimmung von größer oder gleich 95 % aufgeführt.

III. Ergebnisse

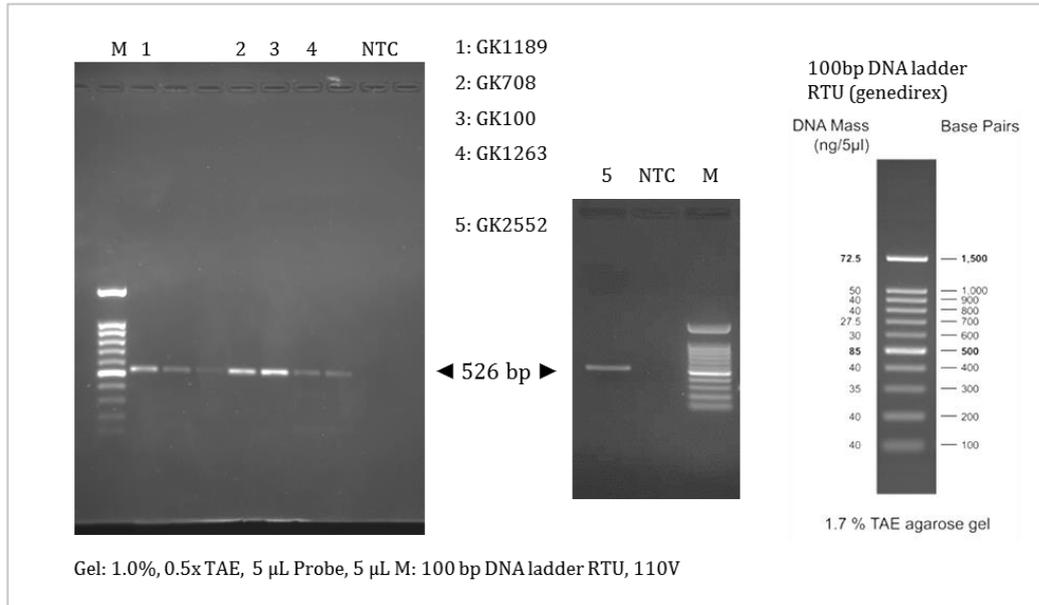


Abbildung III-1: Ergebnis der *gyrA*-PCR mit den Primern *gyrA*-5-1 und *gyrA*-3-1 nach der Gelelektrophorese. Aufgetragen wurden 5 µL PCR Produkt und 5 µL des Markers 100 bp DNA Ladder RTU (Genedirex). Die angegebene Produktgröße entspricht der berechneten Größe.

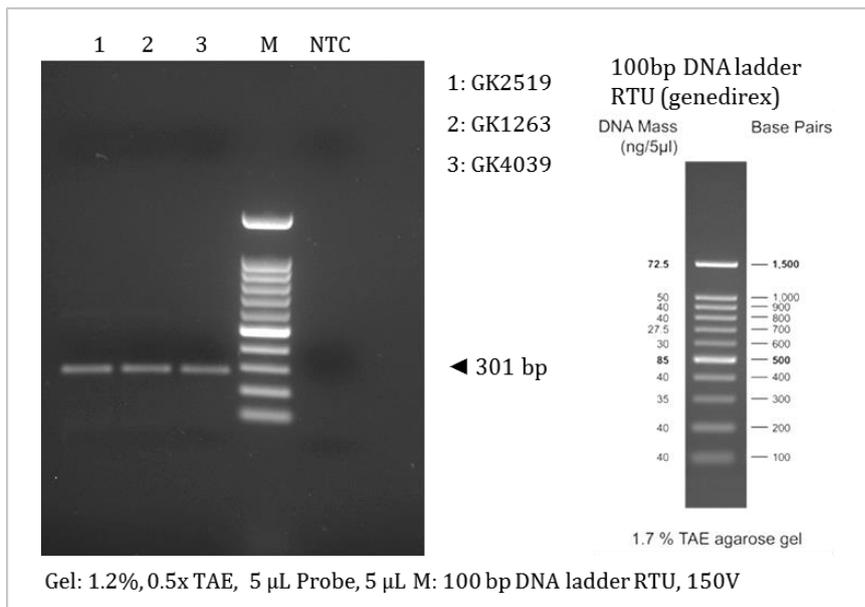


Abbildung III-2: Ergebnis der *gyrA*-PCR mit den Primern 5' *gyrA*_{MPC}+209 und *gyrA*-GA2 nach der Gelelektrophorese. Aufgetragen wurden 5 µL PCR Produkt und 5 µL des Markers 100 bp DNA Ladder RTU (Genedirex). Die angegebene Produktgröße entspricht der berechneten Größe.

III. Ergebnisse

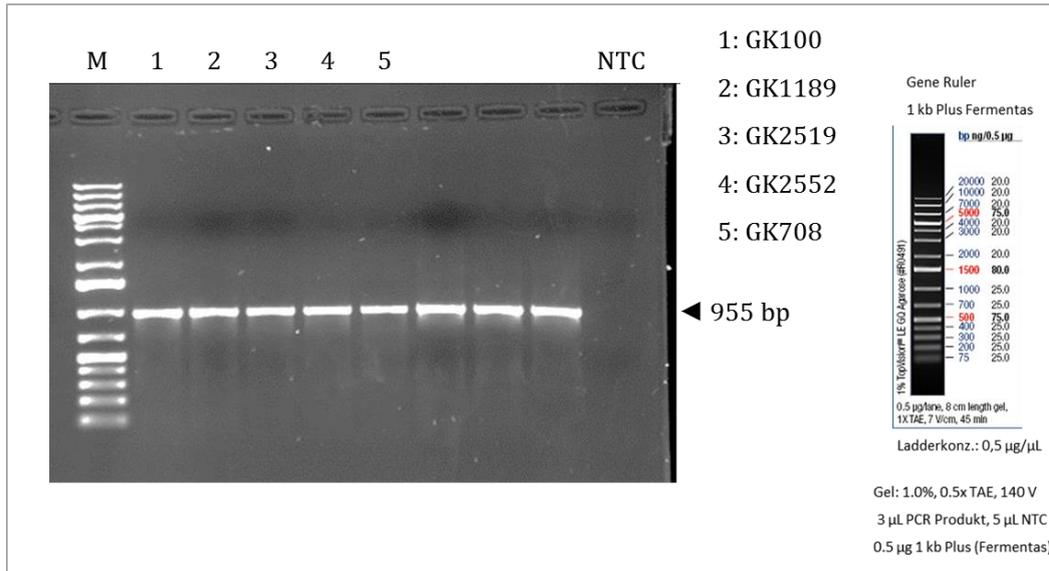


Abbildung III-3: Ergebnis der *gyrB*-PCR nach der Gelelektrophorese. Aufgetragen wurden 3 µL PCR Produkt und 1 µL des Markers Gene Ruler 1 kb Plus (Fermentas). Die angegebene Produktgröße entspricht der berechneten Größe.

Tabelle III-6: Prozentuale Übereinstimmung in der DNA-Sequenz des Gens *gyrA* in den untersuchten *Citrobacter*-Spezies. Werte größer oder gleich 95 % sind blau hinterlegt. Die Untersuchungsstämme sind mit ihrer GK-Identifikationsnummer angegeben. Referenzsequenzen sind mit dem Namen der jeweiligen Spezies angegeben. [C.a.] *Citrobacter amalonaticus* DSM4593 (Referenzstamm GK4039), [C.f.]: *Citrobacter freundii* Q15 (NCBI Acc.nr.: JN384162), [C.k.] *Citrobacter koseri* ATCC-BAA895 (NCBI Acc.no.: NC_009792), [C.r.]: *C. rodentium* ICC168 (NCBI Acc.nr.: NC_013716), [E.c.]: *Escherichia coli* K12 MG1655 (NCBI Acc.nr.: CP009685), [S.e.] *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 (NCBI Acc.nr.: AE006468).

Stamm/ Spezies	[C.f.]	GK100	GK708	[C.r.]	GK2552	GK1263	[C.a.]	GK2519	[C.k.]	GK1189	[E.c.]	[S.e.]
[C.f.] <i>C. freundii</i>	100	99	98	85	86	84	84	83	86	85	84	86
GK100		100	99	84	86	84	84	83	87	86	84	86
GK708			100	83	86	84	84	83	86	84	83	85
[C.r.] <i>C. rodentium</i>				100	97	91	90	91	90	89	89	90
GK2552					100	90	89	90	91	90	89	91
GK1263						100	100	96	87	87	86	85
[C.a.] <i>C. amalon.</i>							100	96	87	87	86	84
GK2519								100	86	86	86	88
[C.k.] <i>C. koseri</i>									100	99	92	91
GK1189										100	91	90
[E.c.] <i>E. coli</i>											100	91
[S.e.] <i>S. enterica</i>												100

III. Ergebnisse

Tabelle III-7: Prozentuale Übereinstimmung in der DNA-Sequenz des Gens *gyrB* in den untersuchten *Citrobacter*-Spezies. Werte größer oder gleich 95 % sind blau hinterlegt. Die Untersuchungsstämme sind mit ihrer GK-Identifikationsnummer angegeben. Referenzsequenzen sind mit dem Namen der jeweiligen Spezies angegeben. C.b.: *Citrobacter braakii* DSM 17596 (NCBI Acc.no.: HG798914), C.f.: *Citrobacter freundii* ATCC8090 (NCBI Acc.nr.: AJ300528), C.k.: *Citrobacter koseri* ATCC-BAA895 (NCBI Acc.no.: NC_009792), C.r.: *C. rodentium* ICC168 (NCBI Acc.nr.: NC_013716), C.y.: *Citrobacter youngae* ATCC 29220 (NCBI Acc.nr.: ABWL02000023), C.w.: *Citrobacter werkmanii* DSM17579 (Referenzstamm GK4089), E.c.: *Escherichia coli* K12 MG1655 (NCBI Acc.nr.: CP009685), S.e.: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 (NCBI Acc.no.: AE006468).

	C.k. 1189	C.r. 2552	C.a. 2519	S.e.	E.c.	C.b.	C.f. 100	C.w.	C.y. 708					
[C.k.]	100	100	93	93	92	91	89	89	86	87	87	86	88	87
GK1189		100	93	93	91	91	89	89	86	87	87	86	88	87
[C.r.]			100	92	90	91	90	89	86	86	85	85	86	85
GK2552				100	91	92	88	89	84	85	85	84	85	84
[C.a.]					100	94	90	88	84	84	86	85	87	86
GK2519						100	89	88	86	86	85	85	86	86
[S.e.]							100	89	86	86	86	85	86	85
[E.c.]								100	87	87	86	86	87	86
[C.b.]									100	96	95	92	94	93
[C.f.]										100	97	94	95	95
GK100											100	93	94	94
[C.w.]												100	96	95
[C.y.]													100	97
GK708														100

Tabelle III-8: Spezies mit Sequenzübereinstimmungen von mindestens 95 % mit den Untersuchungsstämmen in den partiellen *gyrA*- und *gyrB*-Sequenzen. Angegebene Prozentwerte entsprechen dem Anteil übereinstimmender Basen in paarweise verglichenen Sequenzen gleicher Länge der Untersuchungsstämmen mit publizierten Referenzsequenzen der angegebenen Spezies.

Untersuchungsstämme	Speziesübereinstimmung nach <i>gyrA</i>	Speziesübereinstimmung nach <i>gyrB</i>
GK100	<i>C. freundii</i> (99 %)	<i>C. freundii</i> (97 %)
GK708	<i>C. freundii</i> (98 %)	<i>C. youngae</i> (97 %) <i>C. freundii</i> (95 %) <i>C. werkmanii</i> (95 %)
GK1189	<i>C. koseri</i> (99 %)	<i>C. koseri</i> (100 %)
GK1263	<i>C. amalonaticus</i> (100 %)	-
GK2519	<i>C. amalonaticus</i> (96 %)	keine Zuweisung möglich
GK2552	<i>C. rodentium</i> (97 %)	keine Zuweisung möglich

III. Ergebnisse

Die analysierten Sequenzen wiesen in den gewählten Bereichen beider Gene ausreichend Variabilität auf (84 – 100 % Sequenzübereinstimmung) und waren somit grundsätzlich für die Speziesidentifikation geeignet. Die durchgeführten Analysen zeigen, dass sich Sequenzübereinstimmungen in *gyrA* einzelner Stämme nicht in *gyrB* wiederfinden ließen und umgekehrt, zumindest nicht in den analysierten Bereichen.

Die Spezieszuweisungen der biochemischen und massenspektrometrischen Analysen für die Stämme GK100 und GK1189 als *Citrobacter freundii* bzw. *Citrobacter koseri* konnte bestätigt werden. Die Stämme GK1253, GK2519 und GK2552 lieferten nur im *gyrA* Sequenzvergleich signifikante Werte für eine Speziesidentifizierung. Diese widersprachen jedoch denen der vorangegangenen Tests. Die Ausgangszuweisung des Stammes GK2552 als *C. braakii* konnte nicht bestätigt werden, was mit den biochemischen und massenspektrometrischen Analyseergebnissen übereinstimmt. Die aus diesen Tests postulierte Spezies *C. sedlakii* konnte jedoch nicht überprüft werden, da für beide Gene keine Referenzsequenzen dieser Spezies verfügbar waren. Gleiches gilt für den Stamm GK2519 und der Spezies *C. farmeri*. Eine mögliche Option zur Absicherung beider Spezies wäre die Sequenzierung von *gyrA* und *gyrB* in entsprechenden Referenzstämmen gewesen.

Für den Stamm GK708 zeigen sich in *gyrA* Übereinstimmungen von 98 % und 99 % mit *C. freundii* bzw. den als *C. freundii* identifizierten Stamm GK100. In *gyrB* besitzt er hingegen 95 % und höhere Sequenzübereinstimmungen mit den Referenzsequenzen der Spezies *C. freundii*, *C. werkmanii* und *C. youngae*. Die durch die biochemische Analyse postulierte Spezies *C. werkmanii* ist für diesen Stamm durch die Sequenzanalysen nicht widerlegt, eine eindeutige Zuweisung ist jedoch ebenfalls nicht möglich.

Die Analysen zeigen weiter, dass die Spezies *C. freundii*, *C. werkmanii* und für *gyrB* auch *C. youngae* eine Gruppe besonders hoher Sequenzübereinstimmungen bilden. Für diese Spezies ist eine Speziesidentifikation über den *gyrA* und *gyrB* Sequenzvergleich also nur bedingt möglich. Außerdem zeigen die Ergebnisse, dass eine Abgrenzung zwischen den Spezies der Gattungen *Citrobacter*, *Salmonella* und *Escherichia* über den *gyrA* und *gyrB* Sequenzvergleich allein nicht möglich ist, da sie nicht signifikant niedrigere Sequenzübereinstimmungen aufweisen als diverse *Citrobacter*-Referenzspezies untereinander. Die Ergebnisse dieser Methode waren somit nur in Kombination mit den zuvor durchgeführten Tests aussagekräftig. Dieses zeigt die Grenzen der Speziesbestimmung mittels Sequenzvergleich einzelner Gene auf. Eine größere Trennschärfe bietet da der Vergleich verschiedener Gene beispielsweise in einem *multi locus sequence typing* (MLST). Jedoch besteht nach bestem Wissen des Autors bis heute keine umfassende publizierte Untersuchung, die einen MLST-Ansatz zur Unterscheidung der *Citrobacter*-Spezies geprüft hat und somit hier als Referenz zur Bestimmung dienen könnte. Dazu wäre ein umfassendes

III. Ergebnisse

Stammkollektiv notwendig, welches Arten enthielt, die nach den für *Citrobacter*-Spezies herkömmlich eingesetzten Methoden eindeutig bestimmt wurden. Gleiches gilt für die Anwendung anderer Standardmethoden, wie z.B. die Pulsfeld-Gelelektrophorese und das Serotyping oder auch das Ribotyping. Weiter werden letztgenannte Methoden eher zur Stammtypisierung für epidemiologische Untersuchungen angewendet, da sie es ermöglichen Stämme unterhalb der Speziesgrenze zu differenzieren.

III.1.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Speziesidentifizierung

Von den durchgeführten Untersuchungen zur Spezieszugehörigkeit basiert lediglich die biochemische Charakterisierung auf Referenzdaten umfangreicher Stammkollektive eindeutig bestimmter Spezies (Brenner et al. 1999). Die Stämme wurden dort nach Verwandtschaftsgrad der genomischen DNA, bestimmt durch DNA-Hybridisierung, in die bestehenden 11 Spezies der Gattung *Citrobacter* eingeteilt und biochemisch charakterisiert. Eine vergleichbare Basis an Referenzdaten existiert bis heute für keine andere Methode, weder für eine massenspektroskopische Analyse noch für einen DNA-Sequenzvergleich. Demnach wurde hier für die Spezieszuweisung der Untersuchungsstämme die biochemische Charakterisierung am stärksten gewichtet. Dieses kam vor allem für den Stamm GK708 zum Tragen. In der biochemischen Charakterisierung war dieser über die hier zur Identifizierung herangezogenen Tests hinaus auch in allen anderen Reaktionen des MICRONAUT-E Messsystems zu 100 % übereinstimmend mit dem Referenzstamm GK4039 *C. werkmanii* DSM17579. Dieser ist der Typstamm der Spezies *C. werkmanii*. In allen übrigen Tests war der Stamm GK708 nicht von der Spezies *C. freundii* unterscheidbar.

Die abschließende Identifizierung der Spezies basierte auf mindestens einer Übereinstimmung der Speziesidentifikation in zwei verschiedenen Untersuchungsmethoden, welche in **Tabelle III-9** zusammengefasst wurden. Demnach wurde für die Stämme GK100, GK1253, GK2519 und GK708 die Ausgangsspeziesidentifizierung als *C. freundii*, *C. rodentium*, *C. farmeri* und *C. werkmanii* bestätigt. Neu zugewiesen wurden die Stämme GK1189 und GK2552 den Spezies *C. koseri* und *C. sedlakii*. Für die nachfolgende DNA-Sequenzanalyse des jeweiligen *ramRA*-Operons wurden in dieser Arbeit die Stämme GK2519, GK2552 und GK708 ausgewählt. Für alle übrigen hier identifizierten Spezies lagen bereits Sequenzinformationen zur Analyse vor. Dieses waren *C. koseri* (NCBI Acc.nr.: CP000822.1, Region 2395300..2400500), *C. rodentium* (NCBI Acc.nr.: FN543502.1, Region: 631700..635000) und *C. freundii* (Pott 2011).

III. Ergebnisse

Tabelle III-9: Abschließende Speziesidentifizierung der untersuchten *Citrobacter* Stämme nach Ergebnissen der biochemischen (BC), massenspektrometrischen (MS) und molekulargenetischen (MG) Charakterisierung. Die postulierte Spezies *Citrobacter werkmanii* für den Stamm GK708 war mittels MS-Analyse nicht prüfbar, weshalb das Ergebnis hier eingeklammert ist. Die abschließende Zuweisung basierte auf mindestens einer Übereinstimmung der Speziesidentifikation in zwei verschiedenen Untersuchungsmethoden.

GK	Spezies nach BC	Spezies nach MS	Spezies nach MG	Abschließende Zuweisung
100	<i>C. youngae</i> <i>C. freundii</i> <i>C. braakii</i> <i>C. werkmanii</i> <i>C. murlinae</i>	<i>C. freundii</i>	<i>C. freundii</i>	<i>C. freundii</i>
1189	<i>C. koseri</i> <i>C. sedlakii</i>	<i>C. koseri</i>	<i>C. koseri</i>	<i>C. koseri</i>
2519	<i>C. farmeri</i>	<i>C. farmeri</i>	<i>C. amalonaticus</i>	<i>C. farmeri</i>
2552	<i>C. sedlakii</i> <i>C. koseri</i>	<i>C. sedlakii</i>	<i>C. rodentium</i>	<i>C. sedlakii</i>
708	<i>C. werkmanii</i> <i>C. gillanii</i>	(<i>C. freundii</i>)	<i>C. youngae</i> <i>C. freundii</i> <i>C. werkmanii</i>	<i>C. werkmanii</i>
1253	<i>C. rodentium</i> <i>C. braakii</i>	<i>C. rodentium</i>	-	<i>C. rodentium</i>

III.1.2 Sequenzierung des *ramRA*-Operons in drei *Citrobacter* Spezies

Für die Analyse der DNA-Sequenzen des *ramRA*-Operons wurden die drei *Citrobacter*-Stämme *C. farmeri* GK2519, *C. sedlakii* GK2552 und *C. werkmanii* GK708 ausgewählt. Für diese Spezies waren zu Beginn dieser Arbeit noch keine Sequenzinformationen publiziert. Für alle drei Stämme war ein positiver Nachweis des *ramA* Genes mittels PCR in der dieser Arbeit vorangegangenen Dissertation erbracht worden (Pott 2011). Das *ramRA*-Operon wurde in diesen Stämmen stufenweise vollständig sequenziert. Die dazu verwendete Methode ist unter II.2.2.14 beschrieben. Die zu sequenzierenden Sequenzabschnitte wurden mittels PCR amplifiziert (siehe II.2.2.10). Die dafür notwendigen Primer wurden abgeleitet aus Alignments bereits bekannter DNA-Sequenzen der Stämme *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (NCBI Acc.no: CP000822, Region: 2395300..2400500), *Citrobacter rodentium* ICC168 (NCBI Acc.no.: FN543502, Region 631700..635000), *Citrobacter freundii* GK100 (NCBI Acc.nr.: JF802197.1), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Paratyphi A str. ATCC 9150 (NCBI Acc.nr.: CP000026, Region 2242800..2244800), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. CT18 (NCBI Acc.nr.: AL513382, Region: 621800..623800), *Enterobacter aerogenes* EA1509E (NCBI Acc.nr.: FO203355, Region:

III. Ergebnisse

2563200..2566500), *Cronobacter turicensis* z3032 (NCBI Acc.nr.: FN543093, Region: 3059800..3062200) und *Klebsiella pneumoniae* 342 (NCBI Acc.nr.: CP000964, Region: 4085500..4089000).

In den ersten Sequenzierungsschritten wurden degenerierte Primer verwendet. Diese setzten sich aus verschiedenen Fraktionen zusammen, bei denen einzelne Basenpositionen gezielt voneinander abwichen. Daher war es möglich eine Primerbindung auch in einer unbekanntem jedoch erwarteten Bindungssequenz zu erreichen und somit ein sequenzierfähiges PCR-Produkt zu erzeugen. Auf diese Weise wurden zunächst zentrale Bereiche in den offenen Leserahmen (open reading frames, ORFs) der Gene *ramR* und *ramA* sequenziert. Aus den erhaltenen DNA-Sequenzen wurden dann Primer für den intergenischen Bereich entworfen und aus dessen Sequenzinformation dann erneut Primer abgeleitet.

Die Sequenzierung der nichtkodierenden Randbereiche, die in den Alignments der Referenzsequenzen nur wenig bis gar nicht konserviert waren, wurden durch den Einsatz verschiedener degenerierter Primer vervollständigt. Für alle drei Stämme wurde das *ramRA*-Operon somit vollständig sequenziert, wobei jeder Bereich mindestens zweifach abgedeckt wurde. Die Sequenzen der Stämme *C. farmeri* GK2519, *C. sedlakii* GK2552 und *C. werkmanii* GK708 sind zusammen mit der Auflistung der für die jeweiligen *reads* verwendeten Primer im Anhang unter VIII.1.1 aufgeführt.

In **Abbildung III-4**, **Abbildung III-5**, und **Abbildung III-6** sind die erhaltenen *reads* aus den Sequenzierungen für die jeweiligen Stämme schematisch dargestellt. Die Bezeichnung der *reads* entspricht dabei den bei der Sequenzierung verwendeten Primern. Diese sind unter II.1.1 aufgelistet.

III. Ergebnisse

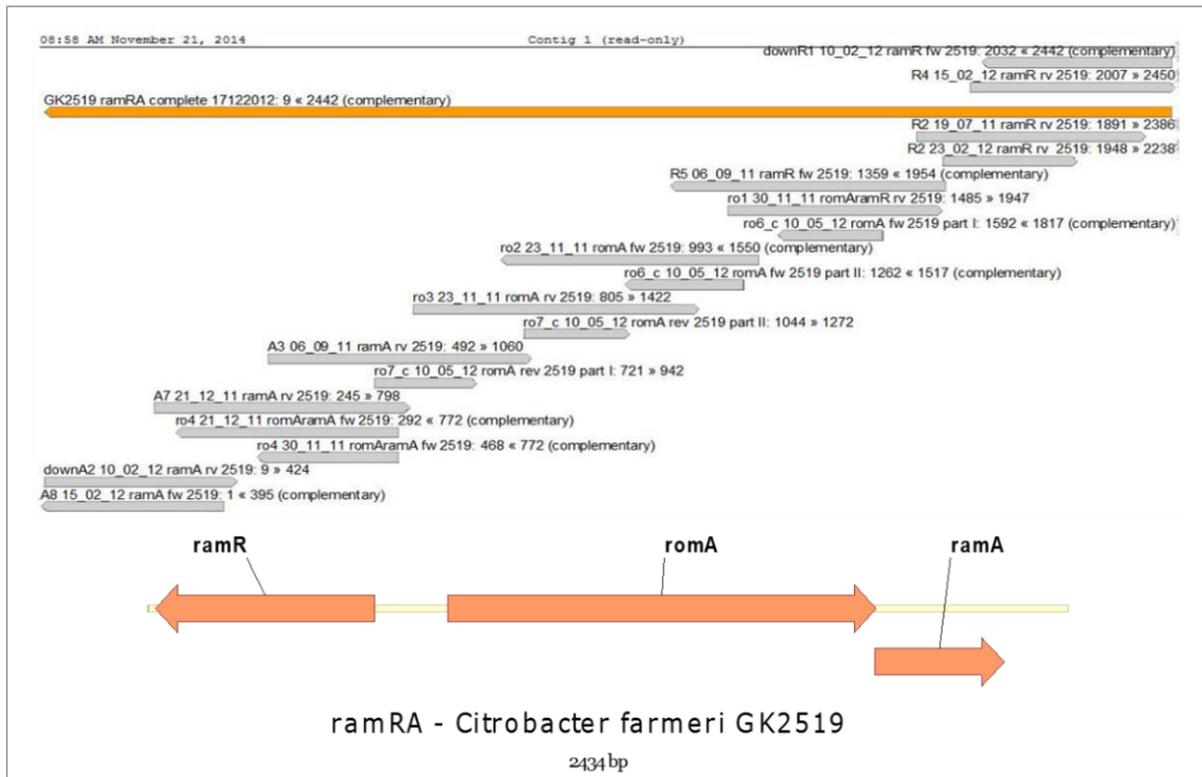


Abbildung III-4: Contig der Sequenzierung des *ramRA*-Operons in *Citrobacter farmeri* GK2519. Sämtliche *reads* sind im Anhang unter VIII.1.1.1 mit den jeweils verwendeten Primern aufgeführt. Die erzeugte Contig-Sequenz wurde an jeder Stelle durch mindestens zwei *reads* abgedeckt und ist orange eingefärbt. Die schematische Darstellung des Operons ist im Vergleich zur Anordnung der *reads* in umgekehrter Orientierung angegeben.

III. Ergebnisse

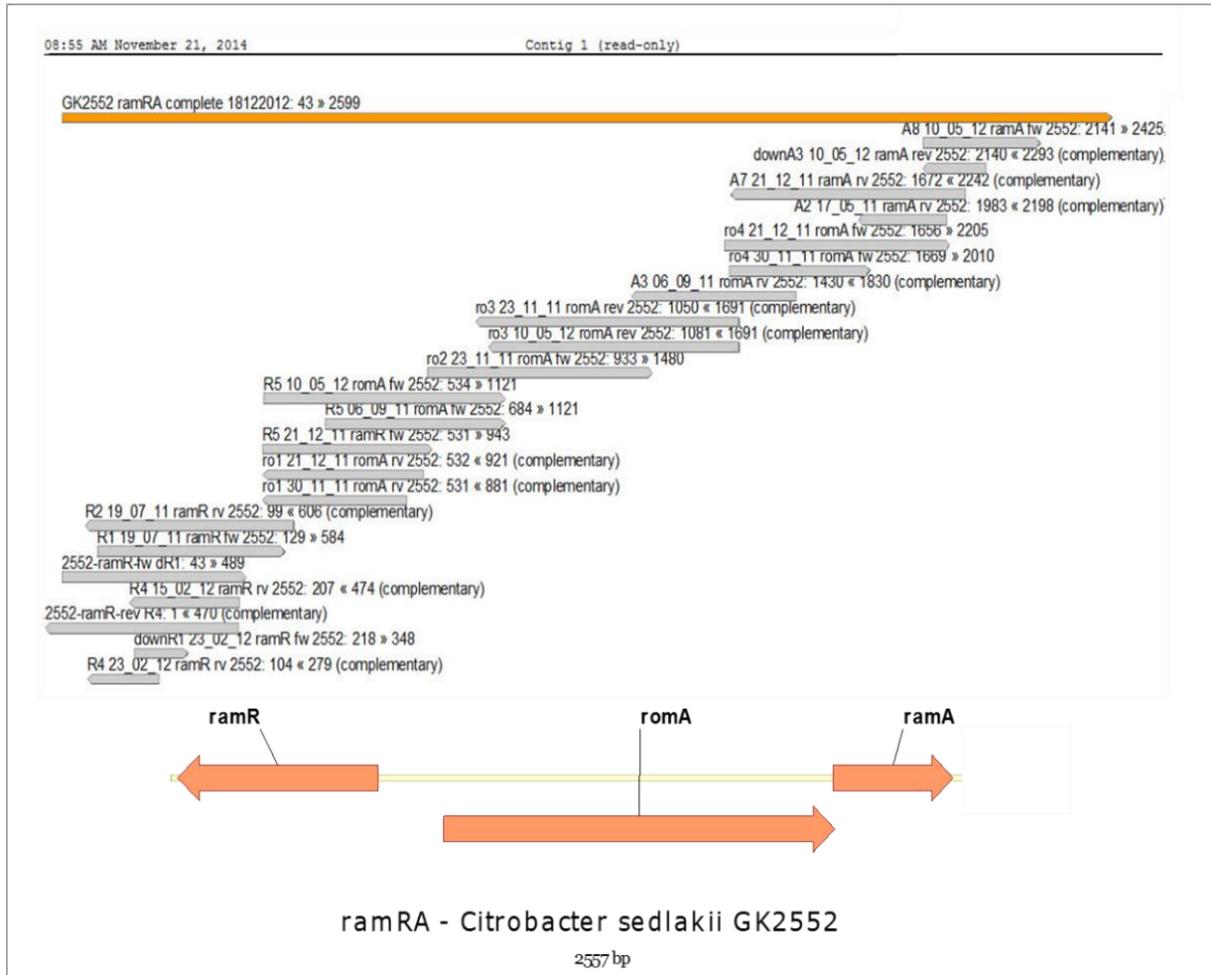


Abbildung III-5: *Contig* der Sequenzierung des *ramRA*-Operons in *Citrobacter sedlakii* GK2552. Sämtliche *reads* sind im Anhang unter VIII.1.1.2 mit den jeweils verwendeten Primern aufgeführt. Die erzeugte *Contig*-Sequenz wurde an jeder Stelle durch mindestens zwei *reads* abgedeckt und ist orange eingefärbt.

III. Ergebnisse

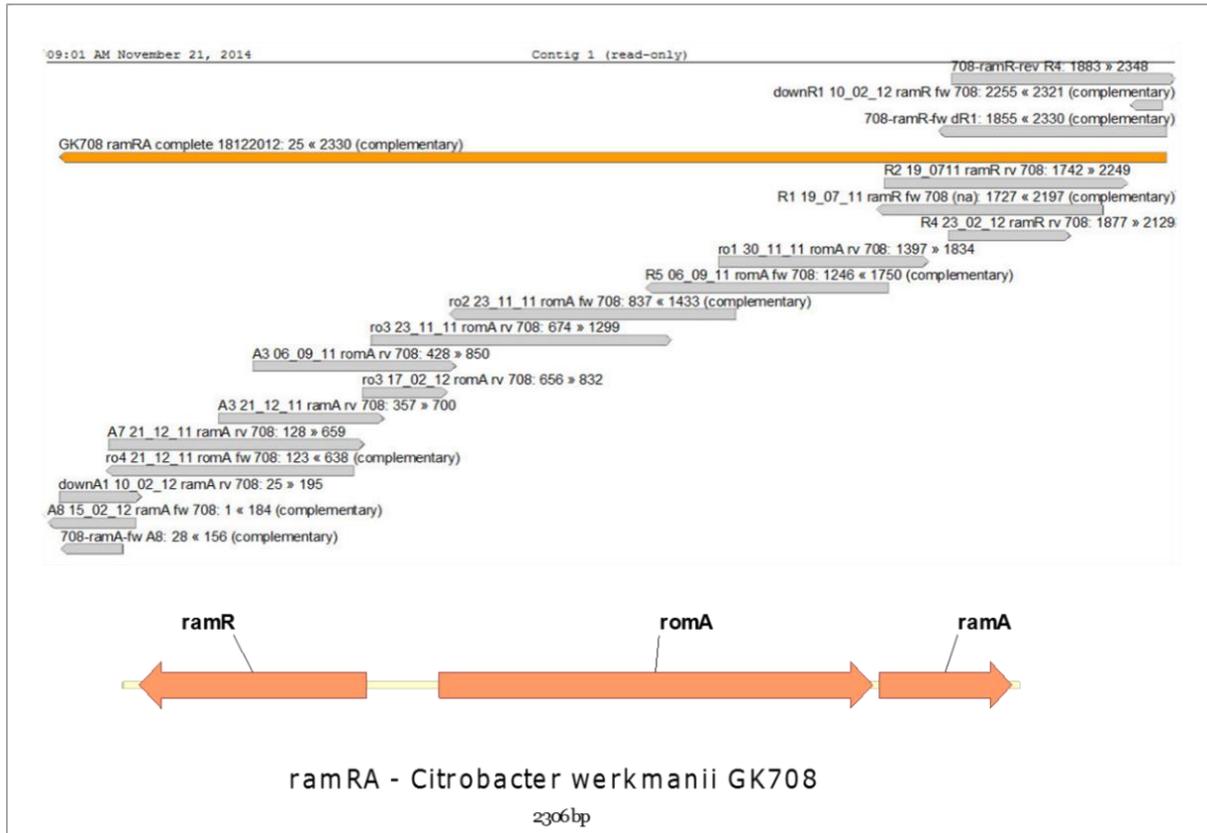


Abbildung III-6: Contig der Sequenzierung des *ramRA*-Operons in *Citrobacter werkmanii* GK708. Sämtliche *reads* sind im Anhang unter VIII.1.1.3 mit den jeweils verwendeten Primern aufgeführt. Die erzeugte Contig-Sequenz wurde an jeder Stelle durch mindestens zwei *reads* abgedeckt und ist orange eingefärbt. Die schematische Darstellung des Operons ist im Vergleich zur Anordnung der *reads* in umgekehrter Orientierung angegeben.

In den analysierten Sequenzbereichen waren jeweils drei ORFs vorhanden. Diese waren homolog zu denen der Gene *ramR*, *romA* und *ramA* in *C. freundii* GK100 (Pott 2011), was sich im Alignment aller vier Sequenzen zeigte (siehe **Abbildung III-7**). Das Alignment wurde im Programm *Vector NTI* Version 11.5 durchgeführt unter Verwendung des ClustalW Algorithmus. Ebenfalls konnte die durch Baucheron et al. (2012) in *Salmonella enterica* beschriebene RamR-Bindestelle durch einen Sequenzvergleich identifiziert werden. Diese ist in der Darstellung der Elektropherogramme in **Abbildung III-9** detailliert aufgezeigt.

III. Ergebnisse

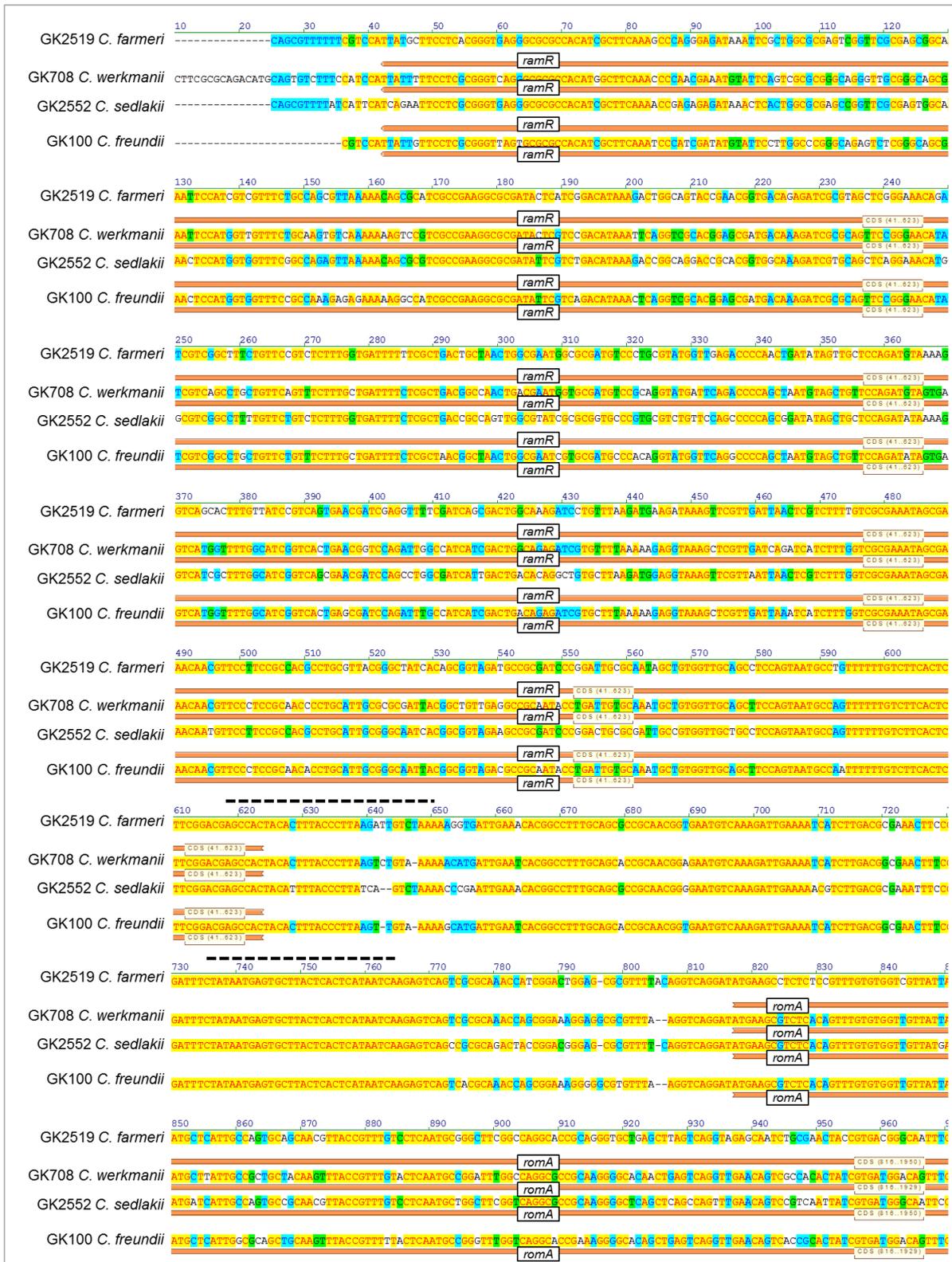


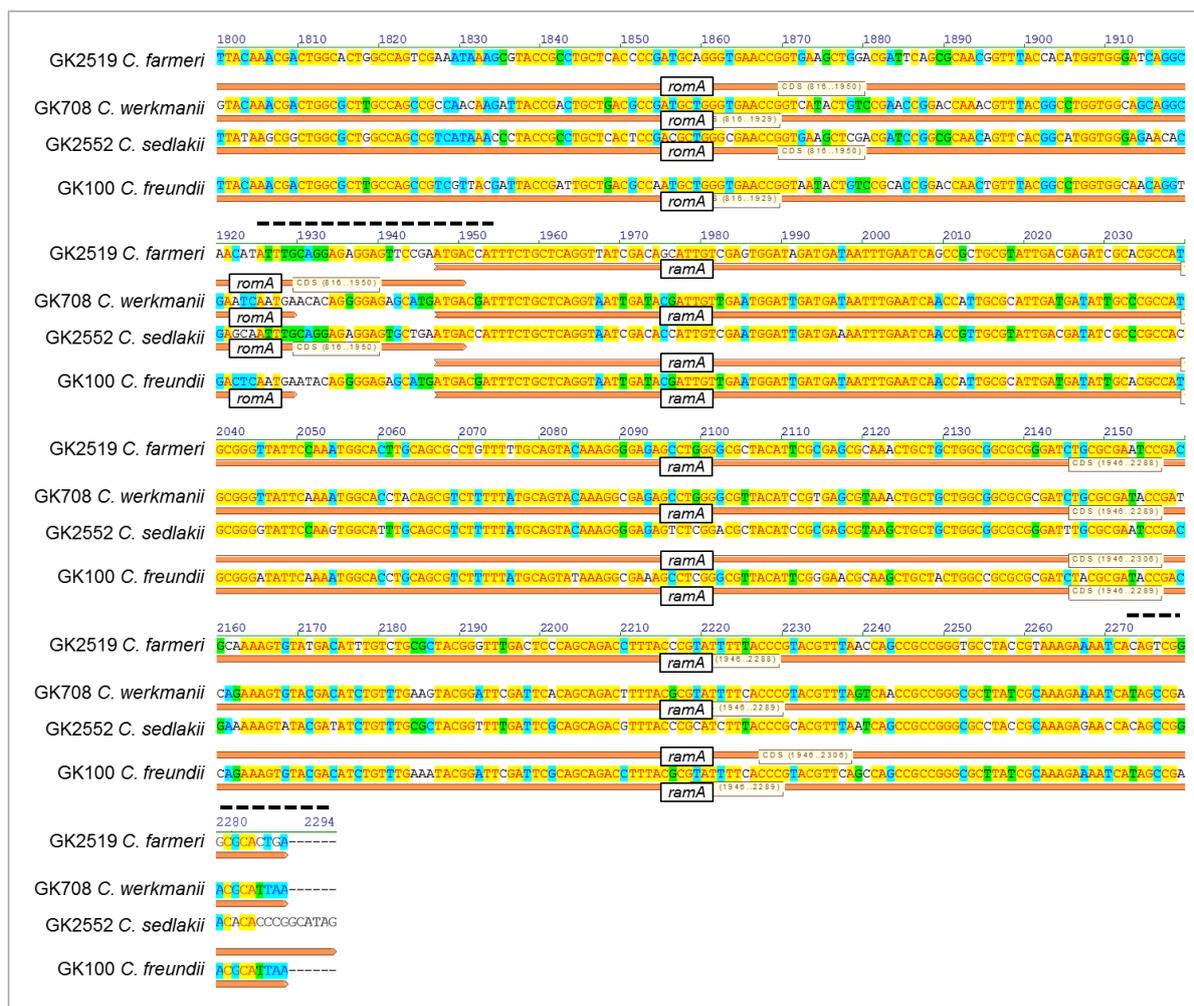
Abbildung III-7: Alignment der analysierten DNA-Sequenzen der Stämme *C. farmeri* GK2519, *C. werkmanii* GK708 und *C. sedlakii* GK2552 und der Referenzsequenz von *C. freundii* GK100 (Pott 2011). Die offenen Leserahmen für *ramR*, *romA* und *ramA* sind für jeden Stamm unterhalb der Sequenzen angegeben. Identische Basenpositionen sind gelb hinterlegt, Positionen, an denen nur eine der vier Sequenzen abweicht, sind blau hinterlegt und Positionen, die bei zwei der vier Sequenzen identisch sind, sind grün hinterlegt. Bereiche, für die jeweils die Elektropherogramme in den folgenden Abbildungen dargestellt sind, wurden durch gestrichelte Linien über den Sequenzen hervorgehoben.

III. Ergebnisse



Fortsetzung Abbildung III-7.

III. Ergebnisse



Fortsetzung Abbildung III-7.

Ein Vergleich der Längen der ORFs zeigte, dass die für *ramR* in allen untersuchten Stämmen mit 582 bp gleich lang waren und dass der für *ramA* in *C. sedlakii* GK2552 mit 348 bp um sechs bp länger war als die ORFs in den anderen Stämmen (siehe **Tabelle III-10**). Die Länge des ORF für *romA* ist mit 1134 bp bzw. 1113 bp für jeweils zwei der vier Stämme identisch. In *C. farmeri* GK2519 und *C. sedlakii* GK2552 überlappte jeweils das 3'-Ende des ORFs von *romA* mit dem 5'-Ende des ORFs von *ramA*. Das Startcodon für *ramR* war in allen Stämmen GTG statt ATG. Ein Vergleich des intergenischen Bereichs zwischen *ramR* und *romA* zeigte, dass auch dieser nichtkodierende Bereich stark konserviert war, insbesondere im Bereich der genannten RamR-Bindestelle. Dieses wurde anhand der Rohdaten der Sequenzierung (Elektropherogramme) vergleichend dargestellt: 5' *upstream* Bereich von *ramR* (siehe **Abbildung III-8**), RamR-Bindestelle (siehe **Abbildung III-9**), 5' *upstream* von *ramA* (siehe **Abbildung III-10**) und 3' *downstream* von *ramA* (siehe **Abbildung III-11**).

III. Ergebnisse

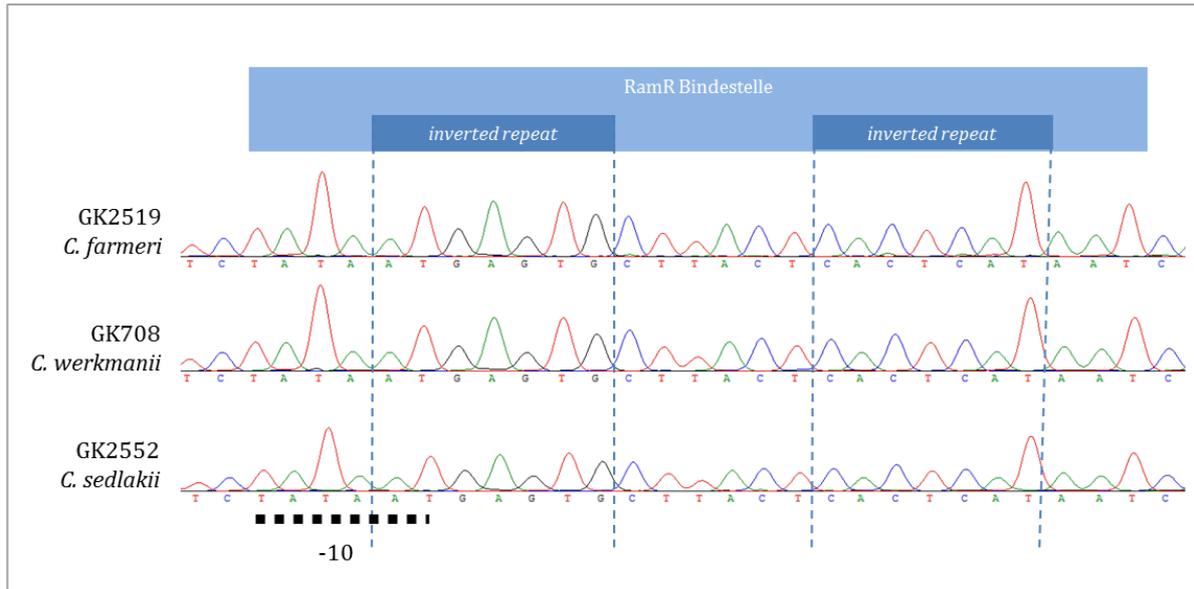


Abbildung III-9: Elektropherogramme der DNA-Sequenzierung im Bereich der RamR-Bindestelle. Das Alignment zeigt den *upstream* Bereich von RamR (-113 bis -139 bp bei *Citrobacter farmeri* GK2519). Die TATAA-Box im Promotor von *romA* (-10 upstream vom Transkriptionsstart) ist durch eine gepunktete Linie hervorgehoben. Die *inverted repeats* sind ebenfalls markiert. Alle Sequenzmotive wurden in Abgleich mit den durch Baucheron et al. (2012) publizierten Daten identifiziert. Dargestellt sind Ausschnitte der folgenden *reads*: GK2519: R5_06_09_11 ramR fw; GK708: R5_06_09_11 romA fw 708; GK2552: R5_06_09_11 romA fw 2552.

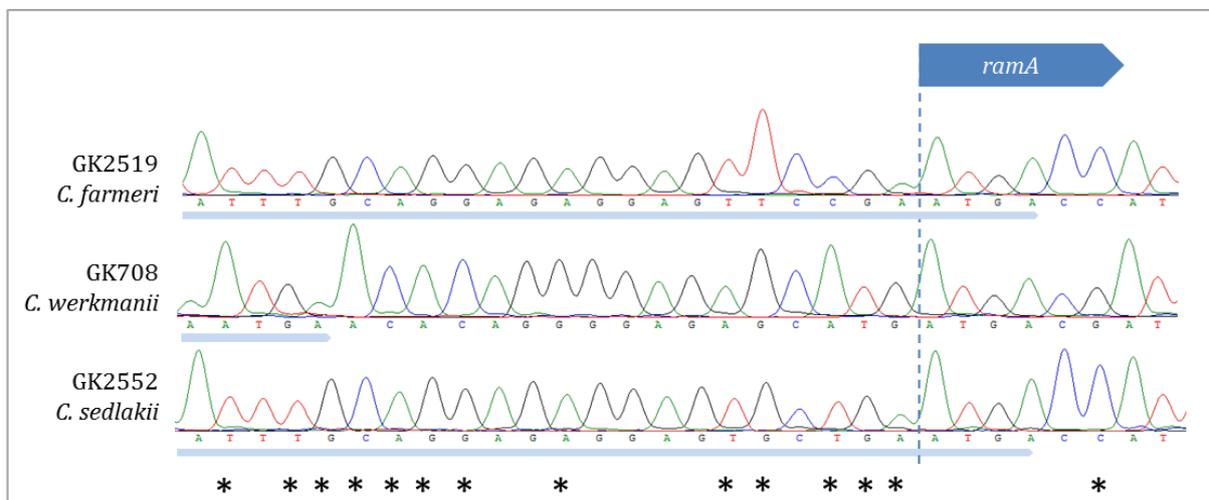


Abbildung III-10: Elektropherogramme der DNA-Sequenzierung im 5' *upstream* Bereich von *ramA*. Die *open reading frames* sowie die Leserichtungen sind für *ramA* durch einen dunkelblauen Pfeil und für *romA* jeweils durch einen hellblauen Pfeil markiert. Nicht übereinstimmende Basenpositionen sind durch einen Stern markiert. Dargestellt sind Ausschnitte der folgenden *reads*: GK2519: A7_21_12_11 ramA rv 2519; GK708: A7_21_12_11 ramA rv 708; GK2552: A7_21_12_11 ramA rv 2552.

III. Ergebnisse

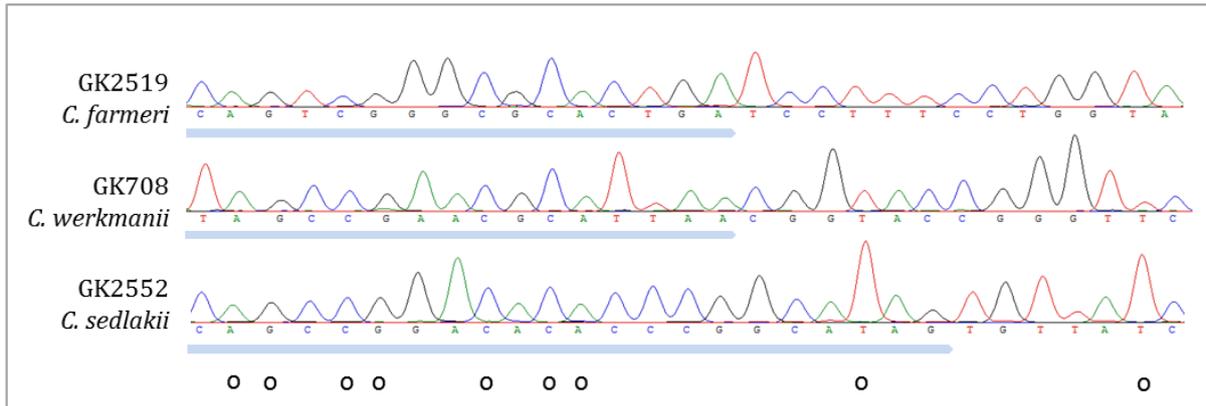


Abbildung III-11: Elektropherogramme der DNA-Sequenzierung im 3' *down stream* Bereich von *ramA*. Die *open reading frames* sowie die Leserichtungen sind für *ramA* durch einen hellblauen Pfeil markiert. Übereinstimmende Basenpositionen sind durch einen Kreis markiert. Dargestellt sind Ausschnitte der folgenden *reads*: GK2519: A8 15_02_12 *ramA* fw 2519; GK708: A8 15_02_12 *ramA* fw 708; GK2552: A8 17_02_12 *ramA* fw 2552.

Aus den DNA-Sequenzen der hier sequenzierten Stämme GK2519 *Citrobacter farmeri*, GK2552 *Citrobacter sedlakii* und GK708 *Citrobacter werkmanii* wurden jeweils die Aminosäuresequenzen für RamA, RamR und RomA abgeleitet und mit den abgeleiteten Sequenzen von GK100 *Citrobacter freundii* (Pott 2011) verglichen. Die Alignments sind in **Abbildung III-12**, **Abbildung III-13** und **Abbildung III-14** dargestellt. Sie zeigen eine sehr hohe Übereinstimmung in RamA in allen Bereichen des Alignments. Zu erkennen ist die um zwei Aminosäuren längere Sequenz in GK2552 *C. sedlakii*. Für RamR ist vor allem im 5'-Bereich eine sehr hohe Übereinstimmung im Alignment zu erkennen, während die zentralen Bereiche zum Teil variabel sind. Das Startcodon GTG wurde zu Valin übersetzt. Das Alignment für RomA weist sowohl hochkonservierte als auch variable Bereiche auf. Insbesondere das 3'-Ende wies jedoch eine hohe Variabilität auf, wobei die Stämme GK2552 *C. sedlakii* und GK259 *C. farmeri* eine um sieben Aminosäuren längere Sequenz besaßen als die Stämme GK 708 *C. werkannii* und GK100 *C. freundii*.

III. Ergebnisse



Abbildung III-12: Alignment der aus den DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen für RamA. Gelb hinterlegt: identische Aminosäuren, blau hinterlegt: mindestens in 3 der 4 Sequenzen identische Aminosäure, grün: Aminosäure ähnlicher Eigenschaften, blaue Schrift: Aminosäuren mit schwach ähnlichen Eigenschaften.

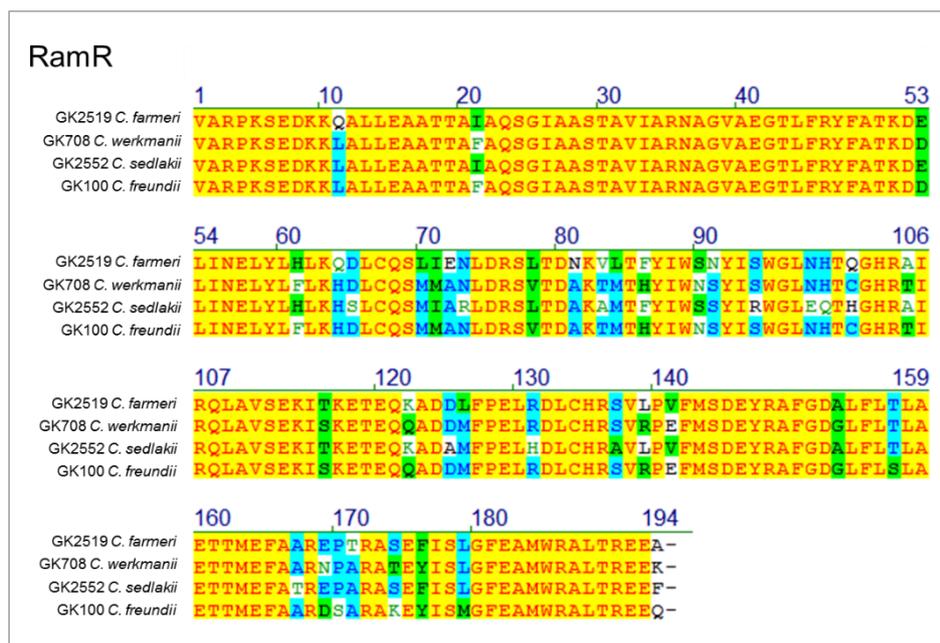


Abbildung III-13: Alignment der aus den DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen für RamR. Gelb hinterlegt: identische Aminosäuren, blau hinterlegt: mindestens in 3 der 4 Sequenzen identische Aminosäure, grün: Aminosäure ähnlicher Eigenschaften, blaue Schrift: Aminosäuren mit schwach ähnlichen Eigenschaften.

III. Ergebnisse

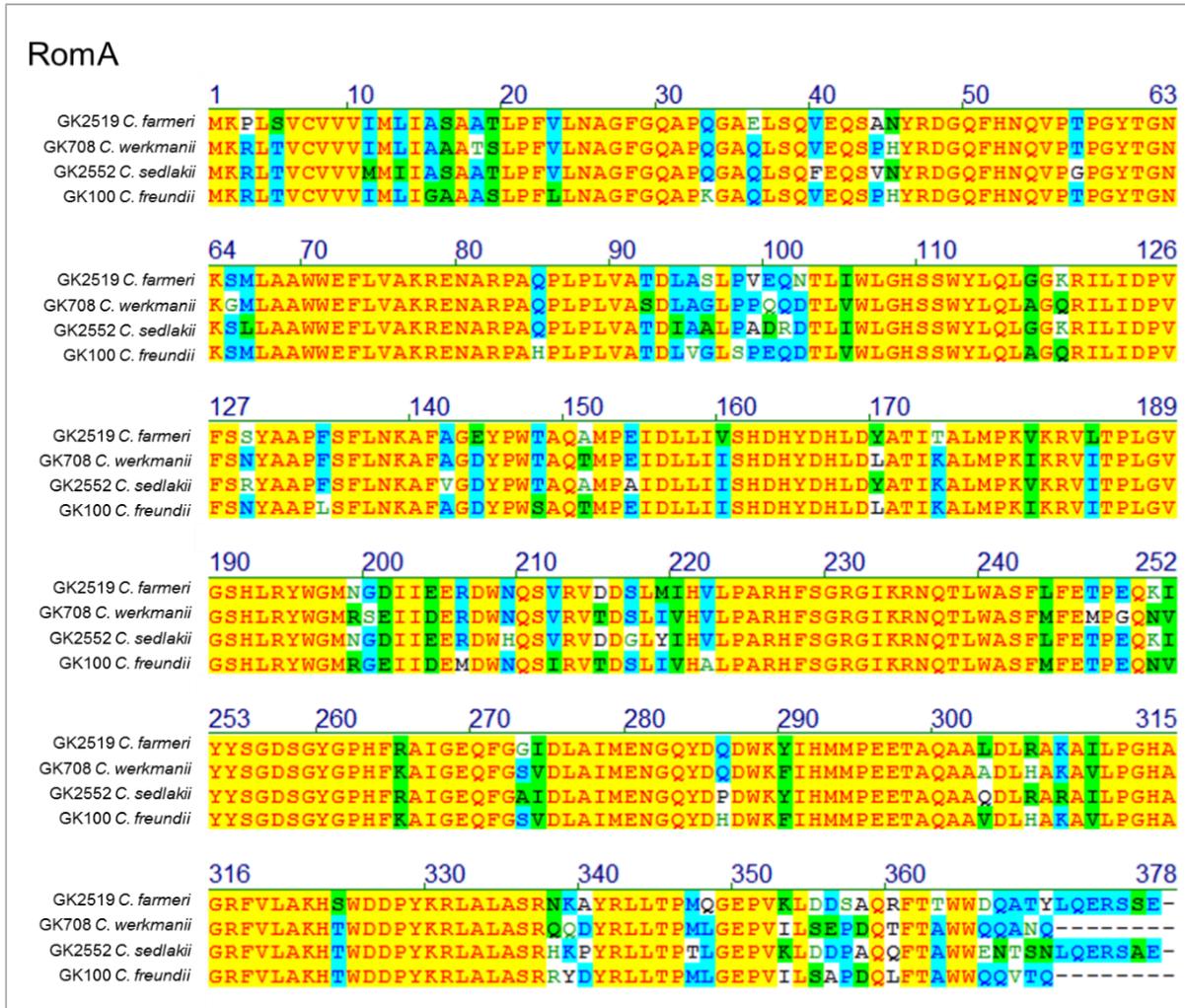


Abbildung III-14: Alignment der aus den DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen für RomA. Gelb hinterlegt: identische Aminosäuren, blau hinterlegt: mindestens in 3 der 4 Sequenzen identische Aminosäure, grün: Aminosäure ähnlicher Eigenschaften, blaue Schrift: Aminosäuren mit schwach ähnlichen Eigenschaften.

III.1.3 Prüfung der Operonstruktur in *C. rodentium*

Eine Analyse mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, siehe II.2.4) der *ramRA*-Sequenzen in der publizierten Genomsequenz von *C. rodentium* ICC168 (NCBI Acc.nr.: FN543502) zeigte, dass dieser Stamm im Vergleich zu den anderen *Citrobacter* Stämmen einen verkürzten intergenischen Bereich zwischen *ramR* und *ramA* besaß. In diesem war kein ORF für *romA* enthalten. Um zu überprüfen, ob das Fehlen des ORFs für *romA* lediglich eine spezifische Eigenschaft des Stammes *C. rodentium* ICC168 war, wurde der Stamm *C. rodentium* GK1253 der Laborstammsammlung (Speziesidentifizierung siehe III.1.1.4) daraufhin untersucht. In der durchgeführten Test-PCR wurde der Forward-Primer [R5] *ramR*_uniEnt_+146_for gewählt, der im ORF für *ramR* bindete und der Reverse-Primer [A3] *ramA*_uniEnt_+61_rev im ORF für *ramA*

III. Ergebnisse

platziert. Das PCR-Produkt der Größe von 469 bp war identisch mit dem entsprechenden Sequenzbereich in *C. rodentium* ICC168 (Cit02) (siehe **Abbildung III-15**) und bestätigt somit einen verkürzten intergenischen Bereich zwischen *ramR* und *ramA*. Eine nachfolgende Sequenzierung des PCR-Produktes bewies die Sequenzhomologie des Stammes GK1253 mit dem *C. rodentium* Stamm ICC168 des Referenzkollektives. Die analysierte DNA-Sequenz ist in **Abbildung III-16** aufgeführt. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass das Fehlen des *romA*-Gens in *C. rodentium* konserviert ist.

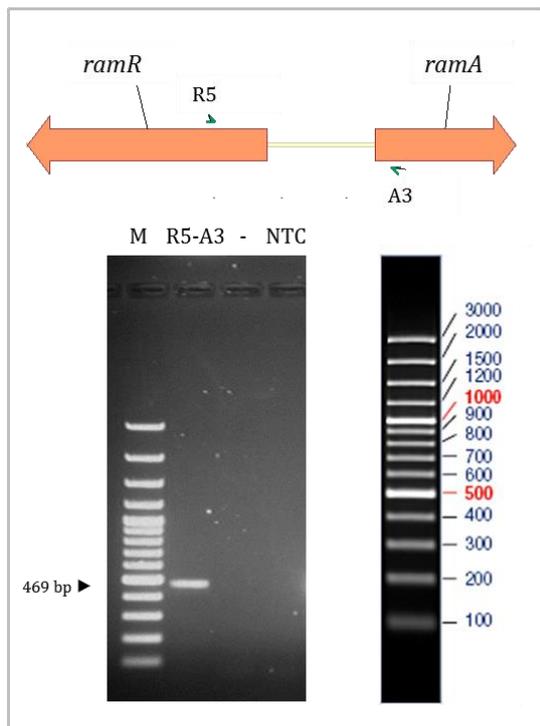


Abbildung III-15: Ergebnis der *ramR-ramA*-PCR in *Citrobacter rodentium* (GK1253) mit den Primern [R5] *ramR*_uniEnt_+146_for im ORF für *ramR* und der Reverse-Primer [A3] *ramA*_uniEnt_+61_rev nach der Gelelektrophorese. Aufgetragen wurden 5 μ L PCR Produkt und 3 μ L des Markers O'Gene Ruler 100 bp (Fermentas). Die angegebene Produktgröße entspricht der berechneten Größe.

III. Ergebnisse



Abbildung III-16: DNA-Sequenzalignment im Bereich zwischen *ramR* und *ramA* in dem hier sequenzierten Stamm *Citrobacter rodentium* GK1253 und dem entsprechendem Abschnitt im Genom von *Citrobacter rodentium* ICC168 (NCBI Acc.nr.: FN543502). Die offenen Leseraster der Gene *ramR* und *ramA* sind markiert.

III.1.4 *In silico* Untersuchungen des Transkriptionsfaktors RamA aus *Citrobacter koseri*

Auf Basis der Aminosäuresequenzinformation ist es möglich, die 3D Struktur eines Proteins computergestützt vorherzusagen. Voraussetzung dafür ist die Vorlage einer bekannten Struktur durch ein geeignetes homologes Protein. Diese war durch die Kristallstruktur des Transkriptionsfaktors MarA gegeben. Auf die Homologie zwischen RamA und MarA wird in den Kapiteln IV.2.2.8 und IV.4.1 ausführlich eingegangen und wird im Alignment der Sequenzen in **Abbildung III-18** deutlich. Um erste Hinweise auf eine mögliche Struktur des Transkriptionsfaktors RamA und somit zu dessen Funktionsweise zu erhalten, wurde mit Hilfe bioinformatischer Methoden ein 3D-Strukturmodell erstellt. Anschließend wurden die molekularen Interaktionen in einer Dynamikberechnung simuliert. Die Modellierung und die Dynamiksimulation wurden dankenswerter Weise mit Unterstützung durch Dr. Daniel Hasenpusch der Arbeitsgruppe Dr. Thomas Lemcke für Molecular Modelling und Medizinische Chemie am Institut für Pharmazie des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

Das Modell sollte auch Hinweise für wichtige Aminosäuren liefern, die sehr wahrscheinlich bei der DNA-Interaktion involviert sein würden und entsprechend experimentell untersucht werden könnten. Bei der Modellanalyse handelte es sich um eine *in silico* Auswertung und nicht um experimentelle Daten. Eine ausführliche Beschreibung des Modelles ist deshalb in der Diskussion unter IV.4 aufgeführt. Da die folgenden Experimente jedoch auf den Ergebnissen der Modellanalyse aufbauten, wird an dieser Stelle nur kurz auf die Modellanalyse eingegangen.

III. Ergebnisse

Das berechnete Modell umfasst eine simulierte 3D-Struktur von RamA, gebunden an eine DNA-Doppelhelix mit *marbox* aus dem *marAB*-Operon aus *E. coli*. Die Berechnung wurde auf Basis der Aminosäuresequenz von *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (NCBI Acc.nr.: CP000822, Region 2395300..2400500). Die Modellierung wurde mit der Methode des Homology Modellings durchgeführt (Fiser and Sali 2003). Als Template diente die durch Rhee et al. (1998) publizierte Kristallstruktur von MarA aus einem *E. coli* Stamm, gebunden an ein 22 bp langes DNA-Fragment des *marRAB*-Operons aus *E. coli* mit MarA-Bindemotiv (PDB-ID: 1BL0). An dem Modell wurde anschließend eine Dynamiksimulation durchgeführt, die sämtliche Interaktionen zwischen den Atomen des Proteins und der DNA über einen Zeitraum von 14 ns zeigt. Auf diese wird ebenfalls in der Diskussion unter IV.4 eingegangen.

Für die sequenzspezifische DNA-Interaktion wurden anhand des Modelles und der Dynamiksimulation folgende Aminosäuren als wichtig eingestuft: Tryptophan 37 (W37) und Arginin 41 (R41) im N-terminalen HTH-Motiv sowie Glutamin 87 (Q87) und Arginin 91 (R91) im C-terminalen HTH-Motiv. Diese ragten besonders tief in die jeweilige große Furche der DNA hinein und formten in der Dynamiksimulation eine stabile Bindung mit den Basen der Desoxyribonukleinsäuren. Das zu Q87 benachbarte Q86 zeigte keine basenspezifische Interaktion mit der DNA. Die beiden Arginine R41 und R91 bildeten H-Brückenbindungen zwischen den positivierten H-Atomen des Guanidiniumrestes und den Sauerstoffen der DNA-Basen aus. Gleiches galt für die H-Atome der endständigen Aminogruppe des Q87. Beim W37 dagegen wurde eine stabile π -Kationenbindungen beobachtet, die sich vom delokalisierten π -Elektronensystem des Indolrestes mit einem positivierten H-Atom der Base eines Cytosins bildete. Alle Bindungen sind in **Abbildung III-17** dargestellt. Alle vier genannten Aminosäuren waren in RamA in den untersuchten *Citrobacter*-Spezies als auch in MarA in *E. coli* konserviert, was in **Abbildung III-18** gezeigt wird.

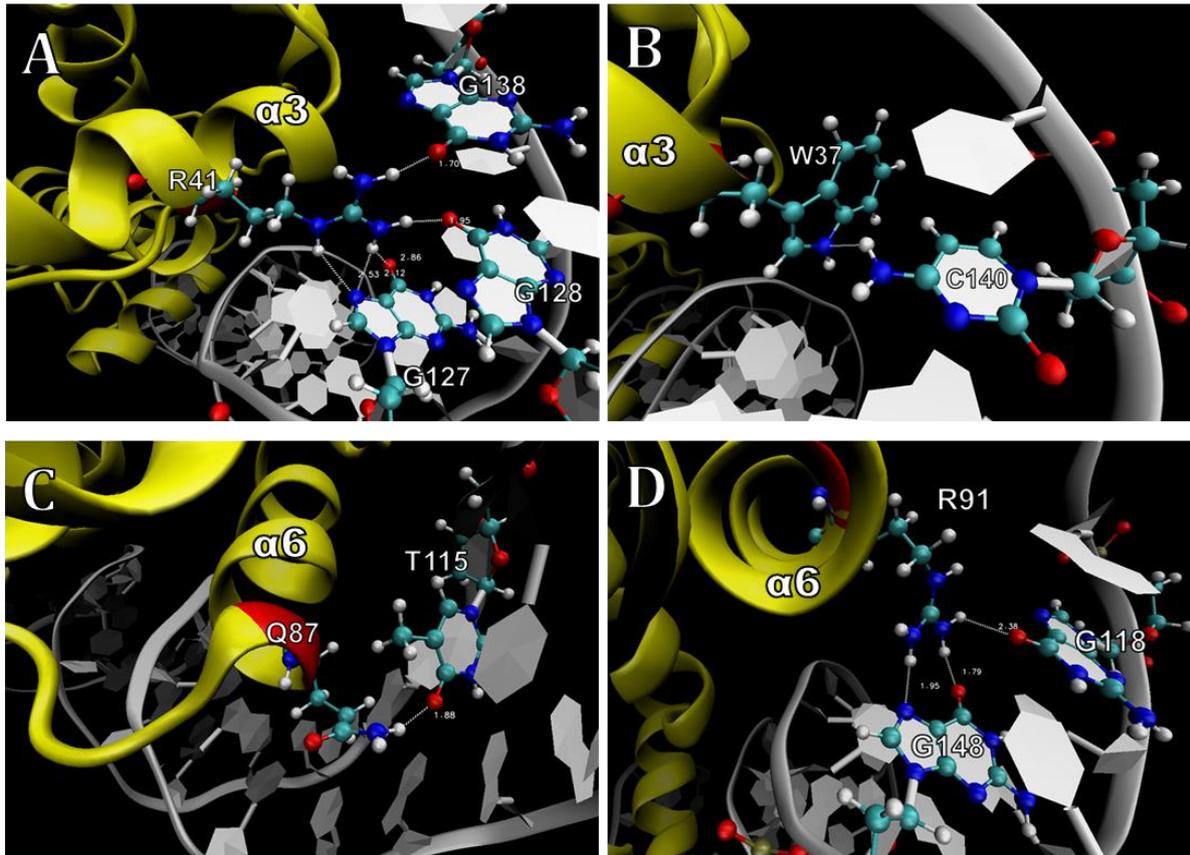


Abbildung III-17: Räumliche Darstellung der DNA-Interaktionspunkte im RamA-Modell. Aminosäuren in Interaktion mit den Basen der Nukleotide waren N-terminal in der Helix $\alpha 3$ (A und B) und C-terminal in der Helix $\alpha 6$ (C und D) lokalisiert. H-Brückenbindungen in A, C und D sind durch Linien gekennzeichnet zwischen den interagierenden Atomen (rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, hellblau: Kohlenstoff, weiß: Wasserstoff). Tryptophan 37 (B) bildete eine pi-stacking Bindung aus, bei der eines der beiden H-Atome der Aminogruppe der Pyrimidinbase des Cytosins 140 stets zentral über dem Fünfring der aromatischen Indolgruppe lokalisiert war. Die Abbildungen wurden mit der Software Visual Molecular Dynamics (VMD) erzeugt.

III. Ergebnisse

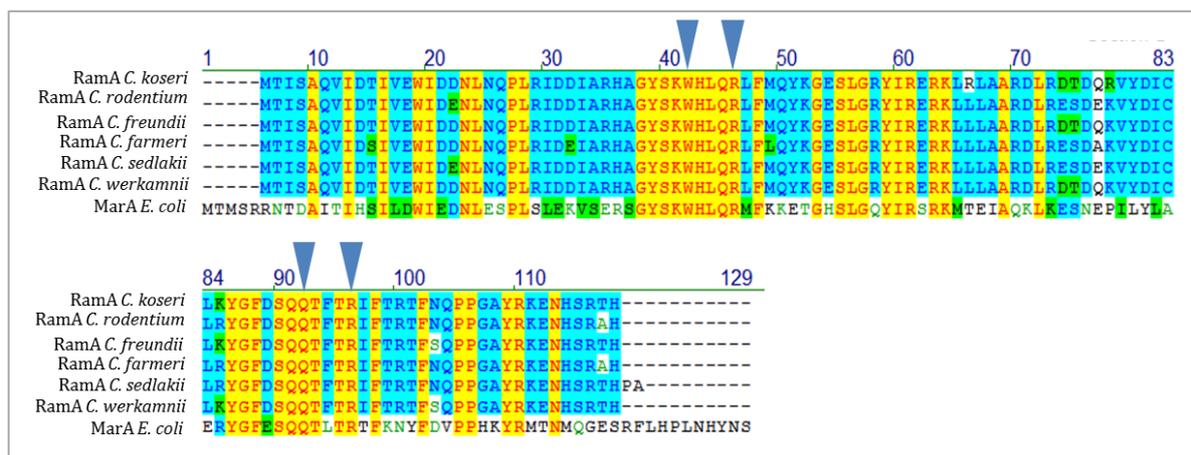


Abbildung III-18: Alignment der aus den DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen von RamA verschiedener *Citrobacter* Spezies und MarA aus *E. coli* (PDB-ID: 1BL0). *C. koseri*: *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (NCBI Acc.nr.: CP000822); *C. rodentium*: *Citrobacter rodentium* ICC168 (NCBI Acc.nr.: FN543502), *C. freundii*: *Citrobacter freundii* GK 100 (Pott 2011) (NCBI Acc.nr.: JF802197.1); *C. farmeri*: *Citrobacter farmeri* GK2519 (diese Arbeit), *C. sedlakii*: *Citrobacter sedlakii* GK2552 (diese Arbeit), *C. werkmanii*: *Citrobacter werkmanii* GK708 (diese Arbeit). Die Aminosäurepositionen W37, R41, Q87 und R91 sind durch blaue Dreiecke markiert (Nummerierung nach Position in *C. koseri*). Gelb hinterlegt: identische Aminosäuren, blau hinterlegt: mindestens in 3 der 4 Sequenzen identische Aminosäure, grün: Aminosäure ähnlicher Eigenschaften.

III.2 Untersuchung der DNA-Interaktion im N-Terminus von RamA *in vitro*

Anhand der röntgenkristallographischen Struktur von MarA, gebunden an ein DNA-Fragment mit Bindemotiv, waren Aminosäurepositionen bekannt, die eine tragende Rolle für die sequenzspezifische DNA-Interaktion spielen. Dieses waren unter anderem Tryptophan 42 (W42) und Arginin 46 (R46) in der N-terminalen Domäne (NTD) sowie Glutamin 92 (Q92) und R96 in der C-terminalen Domäne (CTD) (Rhee et al. 1998). Analog war für das zu MarA homologe RamA eine Interaktion mit der nahezu gleichen DNA-Sequenz denkbar. Im RamA-Strukturmodell waren die Aminosäuren W37 und R41 in der NTD sowie Q87 und R91 in der CTD an einer sequenzspezifischen DNA-Interaktion beteiligt (siehe III.1.4). Zur Überprüfung der Hypothese einer analogen DNA-Protein-Interaktion von RamA mit einer marbox sollte exemplarisch der Einfluss der zwei Aminosäuren W37 und R41 der NTD auf die Funktion als Transkriptionsaktivator untersucht werden.

Dafür wurde ein auf zwei kompatiblen Plasmiden basierendes Messsystem entworfen, in dem der Einfluss einer Überexpression verschiedener Varianten von RamA auf die Aktivität des *pacrAB*-Promotors mittels Luziferase-Reporter quantifiziert werden konnte. Dieser Promotor wurde gewählt, da für ihn in *Salmonella* bereits eine Bindestelle für RamA beschrieben worden ist und weiter dessen Bindung durch RamA zu einer Aktivierung der *acrAB*-Expression führt (E. Nikaido,

Yamaguchi, and Nishino 2008). Zudem sollte der Einfluss der Mutationen auf die Ausprägung eines MDR-Phänotypes mittels Bestimmung der MHK untersucht werden.

Zur Untersuchung der Aminosäuren W37 und R41 sollten diese jeweils einzeln und in Kombination gegen Alanin ausgetauscht werden und mit dem Wildtyp verglichen werden. Alanin wurde gewählt, da der Methylrest sterisch die Anordnung der umgebenden Aminosäuren nicht behindert, dabei im Vergleich zur kleineren Aminosäure Glycin jedoch die Eigenschaft der Chiralität besitzt und somit ähnliche Eigenschaften für die Struktur des Rückgrates beibehält. Außerdem können über die unpolaren H-Atome keine H-Brückenbindungen gebildet werden, wodurch der Funktionsverlust der substituierten Aminosäuren sichergestellt werden sollte.

Die Alanin-Substitutionsmutationen sollten in ein RamA-Überexpressionsplasmid eingeführt werden, dessen *ramA*-Wildtypvariante aus *Citrobacter freundii* (GK100) stammte und gleichzeitig als Kontrolle dienen würde. Als Bakterienstamm für die Messung wurde ebenfalls *C. freundii* (GK100) gewählt.

Die dem Messsystem zugrunde liegende Hypothese war, dass die Überexpression der Wildtyp-Form von RamA-WT einen aktivierenden Effekt auf die *acrA*-Expression hätte, der bei entsprechender Überexpression der mutierten Formen RamA-W37A, RamA-R41A sowie RamA-W37A+R41A deutlich geringer ausfiele, sofern die entsprechenden Aminosäuren von relevanter Funktion wären. Dass der Messtamm selbst die Wildtyp Form chromosomal kodiert, ist dabei irrelevant, da nur die Zustände bei einer RamA-Überexpression und somit nur die jeweiligen aktivierenden Effekte verglichen werden. Als Kontrolle und Bezugsgröße diente die *pacrA*-Promotoraktivität ohne *ramA*-Überexpression.

III.2.1 Konstruktion des *ramA*-Überexpressionsplasmides pHPAR19-01.3

Für die Überexpression von *ramA* aus *Citrobacter freundii* wurde hier der Vektor pUC19 ausgewählt. Dieser besitzt ein Replikon des ColE1-Typus, dessen stringente Replikationskontrolle durch eine Deletion des Repressorproteins Rop sowie durch eine Punktmutation im RNAI Primer, welcher für die Replikationsinitiation essentiell ist, ausgeschaltet ist. Die genannte Punktmutation führt dazu, dass der Negativregulator, eine *antisense* RNA (RNAI), nicht mehr effektiv an die RNAI binden und somit für die Replikationsinitiation nicht blockieren kann (Lin-Chao, Chen, and Wong 1992). Auf diese Weise wird das Plasmid bis zu einer Kopiezahl von 500-700 in der Zelle repliziert (Sambrook and Russel 2001). Weiter sollte *ramA* unter die Kontrolle des *placZ*-Promotors gestellt werden, welcher prinzipiell durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbar ist. Dieses basiert auf der Aufhebung einer Repression der Transkription durch den lac-Repressor, das Genprodukt von *lacI*. Im Normalzustand bindet dieser in den Operatorbereichen des *placZ*-Promotors und blockiert somit die Transkription. Zugegebenes

III. Ergebnisse

IPTG bindet an den lac-Repressor, der daraufhin eine Änderung seiner Konformation erfährt und somit nicht mehr an die DNA binden kann. Die Repression ist somit aufgehoben (Graw 2006).

Das Ausgangsplasmid pUC19 besaß eine Amp^R Resistenzkassette, deren *bla*-Gen für eine β -Lactamase kodiert, die eine Resistenz gegenüber Ampicillin vermittelt. Da der verwendete *Citrobacter freundii* Stamm selbst bereits eine natürliche Resistenz gegenüber Ampicillin aufwies, musste in das Plasmid eine andere Resistenzkassette eingefügt werden. Hierfür wurde die Chl^R Resistenzkassette des Vektors pACYC184 ausgewählt, dessen Gen *cat* für eine Chloramphenicol-Acetyltransferase kodiert und eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol vermittelt (Chang and Cohen 1978).

Dafür wurden beide Plasmide zunächst isoliert und aufgereinigt (II.2.2.2.3). Anschließend wurde die Chl^R Kasette aus pACYC184 mittels Phusion-PCR wie unter II.2.2.10 beschrieben mit den Primern *cat*_AatII_pACYC184_5'_{-190} und *cat*_BsaI_pACYC184_3'_{+670} (siehe II.1.1) amplifiziert (siehe **Abbildung III-19**). Das 956 bp lange Produkt umfasste den vollständigen open reading frame (ORF) des *cat* Genes sowie 210 bp des 5'-Bereiches, der den als „p5“ bezeichneten Promotorbereich beinhaltet (Stuber and Bujard 1981). Die Primer enthielten die Schnittstellen für die Enzyme *AatII* bzw. *BsaI* (=Eco31I). Das PCR-Produkt sowie das Plasmid pUC19 wurden anschließend mit diesen Enzymen wie unter II.2.2.5 beschrieben verdaut. Das für das Plasmid erhaltene 1825 bp Fragment wurde über eine Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Extraktion (siehe II.2.2.13.2) isoliert (siehe **Abbildung III-20**). Das PCR Produkt wurde nach dem Verdau direkt aufgereinigt (siehe II.2.2.13). Die Konzentration der Fragmente wurde dann über eine Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt (siehe II.2.2.4) und anschließend wie unter II.2.2.7 und II.2.2.8 beschrieben erst ligiert und dann in kompetente *E. coli* JM109 Zellen mittels Hitzeschock transformiert. Die Selektion erfolgte auf Chloramphenicol haltigen LB-Agarplatten. Da bei der Klonierung die Amp^R Resistenzkassette zerstört wurde, wurden die erhaltenen Transformanten auch auf den Verlust der Ampicillin-Resistenz überprüft. Aus Transformanten mit korrektem Resistenzprofil wurde dann mittels alkalischer Lyse (siehe II.2.2.2) die Plasmid-DNA isoliert und mittels *EcoRI* Verdau auf ein korrektes Restriktionsmuster hin überprüft (siehe **Abbildung III-22**, Fragmentgrößen: 894 bp und 1875 bp). Das erhaltene Plasmid pHPAR19-01.1 aus dem Transformant 1 wurde in den späteren Experimenten als Kontrollplasmid eingesetzt. Eine Plasmidkarte ist in **Abbildung III-21** dargestellt.

III. Ergebnisse

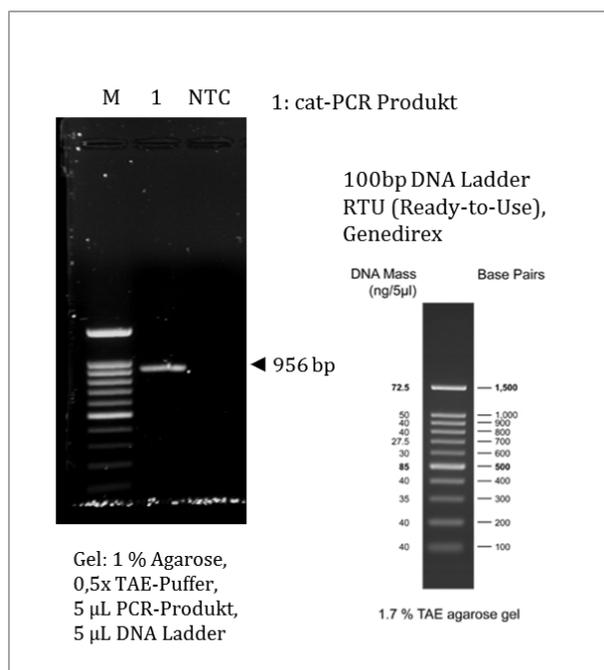


Abbildung III-19: PCR-Produkt der *cat*-Kassette von pACYC184 mit den Primern *cat_AatII_pACYC184_5'_{-190}* und *cat_BsaI_pACYC184_3'_{+670}*. UV-Aufnahme eines Agarosegels nach Elektrophorese (Bahn 1). M: DNA-Größenstandard 100 bp DNA Ladder RTU (Fa. Genedirex). Die angegebene Produktgröße entspricht der berechneten Größe.

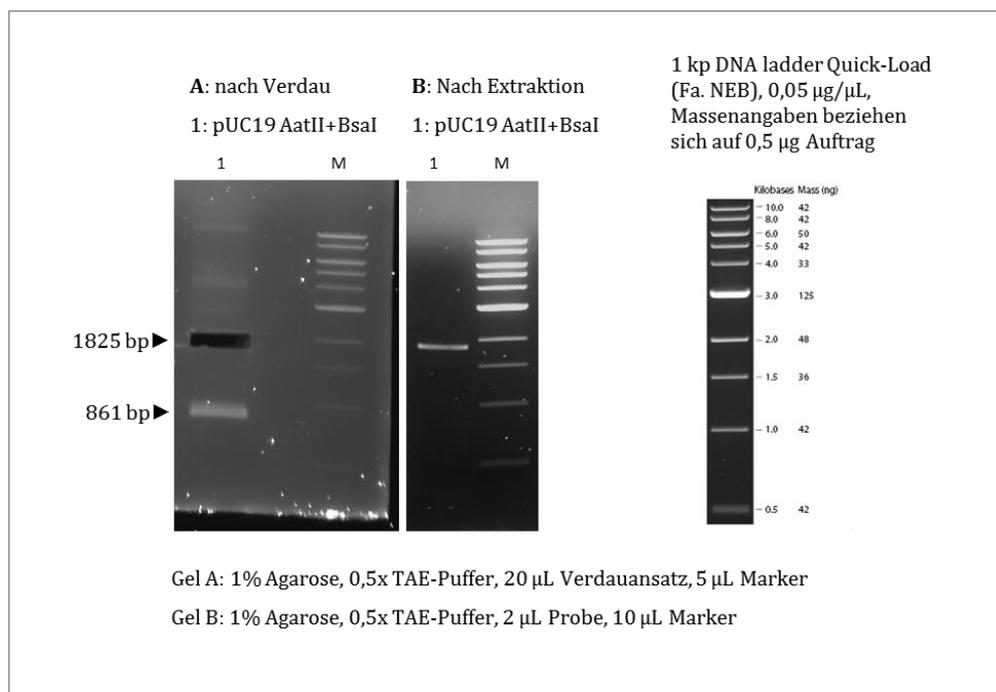


Abbildung III-20: pUC19 nach Verdau mit *AatII* und *BsaI* (A) und anschließender Extraktion des 1825 bp Fragmentes mittels Extraktionskit (siehe auch II.1.5). UV-Aufnahme eines Agarosegels nach Elektrophorese (Bahn 1). M: DNA-Größenstandard 1 kb DNA ladder Quick-Load (Fa. New England Biolabs). Die angegebene Produktgröße entspricht der berechneten Fragmentgröße.

III. Ergebnisse

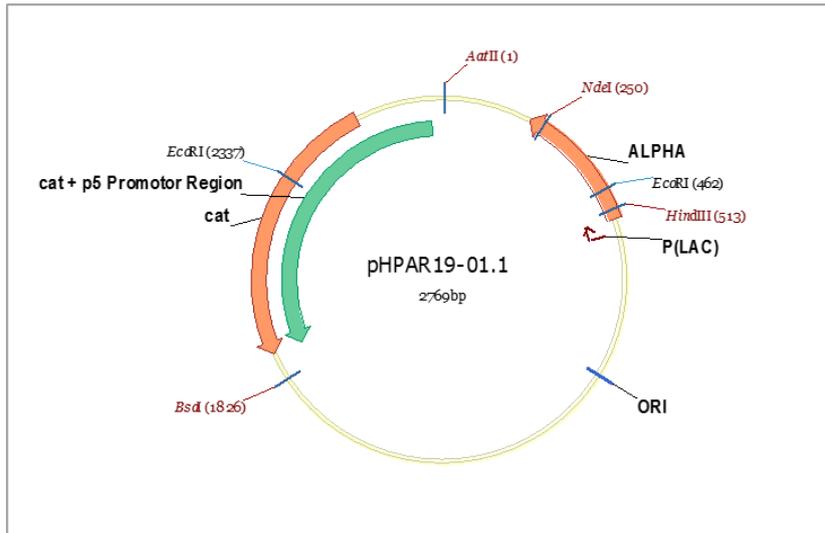


Abbildung III-21: Plasmidkarte des Vektors pHPAR19-01.1.

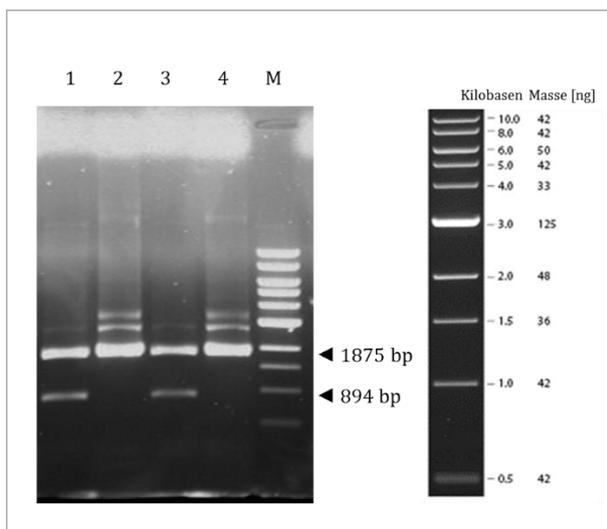


Abbildung III-22: Plasmid pHPAR19-01.1. UV-Aufnahme eines Agarosegels nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau mit *EcoRI*. 1: Plasmid-DNA aus Transformand 7, gespalten mit *EcoRI*; 2: Plasmid-DNA aus Transformand 7, ungespalten; 3: Plasmid-DNA aus Transformand 8, gespalten mit *EcoRI*; 4: Plasmid-DNA aus Transformand 8, ungespalten. M: DNA-Größenstandard 1kb DNA Ladder Quick-Load (Fa. NEB). Das hell leuchtende Material in den Auftragslots stammte von verbliebener genomischer DNA. Die angegebene Produktgröße entspricht der berechneten Fragmentgröße.

Im zweiten Schritt der Klonierung sollte das *ramA*-Gen in das Plasmid pHPAR19-01.1 integriert werden. Dazu wurde dieses aus dem *Citrobacter freundii* Stamm GK100 mittels Phusion-PCR amplifiziert, wobei die Primer *ramA_HindIII_C_freu_5'_{-10}* und *ramA_NdeI_C_freu_3'_{+328}* verwendet wurden, in denen die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *HindIII* bzw. *NdeI* enthalten waren (siehe II.1.1). Das PCR-Produkt (siehe **Abbildung III-23**) sowie das

III. Ergebnisse

aufgereinigtes Plasmid pHPAR19-01.1 wurden mit beiden Enzymen verdaut und das PCR-Produkt anschließend direkt aufgereinigt. Das nach dem Verdau des Plasmides mit *NdeI* und *HindIII* erhaltene 2506 bp Fragment (263 bp wurden ausgeschnitten) wurde über eine Agarose-Gelelektrophorese isoliert und dann aus dem Gel extrahiert (siehe **Abbildung III-24**). Im nächsten Schritt wurden PCR-Produkt und Vektorfragment miteinander ligiert und anschließend in CaCl_2 -kompetente Zellen des Stammes *E. coli* JM109 transformiert. Transformanden wurden mit Chloramphenicol auf LB-Agarplatten selektiert. Die Plasmid-DNA der erhaltenen Transformanden wurde dann mittels alkalischer Lyse isoliert und über einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *PstI* auf das korrekte Restriktionsmuster hin überprüft (918 bp und 1940 bp). Das Ergebnis ist in **Abbildung III-25** dargestellt. Das konstruierte Plasmid pHPAR19-01.2 aus dem Transformand 1 wurde isoliert und aufgereinigt (siehe II.2.2.2.3).

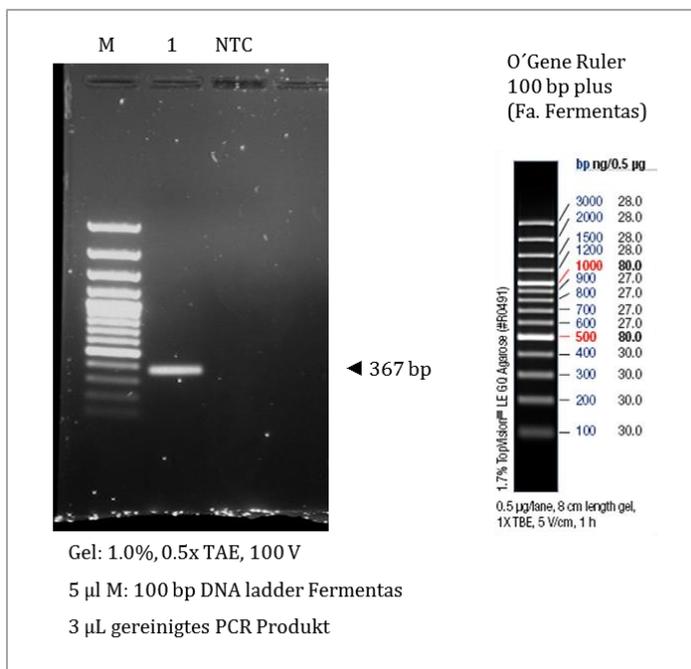


Abbildung III-23: PCR-Produkt der Amplifikation des *ramA*-Gens aus *Citrobacter freundii* (GK100) mit den Primern *ramA_HindIII_C_freu_5'-10* und *ramA_NdeI_C_freu_3'+328* (Bahn 1). UV-Aufnahme eines Agarosegels nach Elektrophorese. M: DNA-Größenstandard 100 bp plus (Fa. Fermentas). Die angegebene Produktgröße entspricht der berechneten Fragmentgröße.

III. Ergebnisse

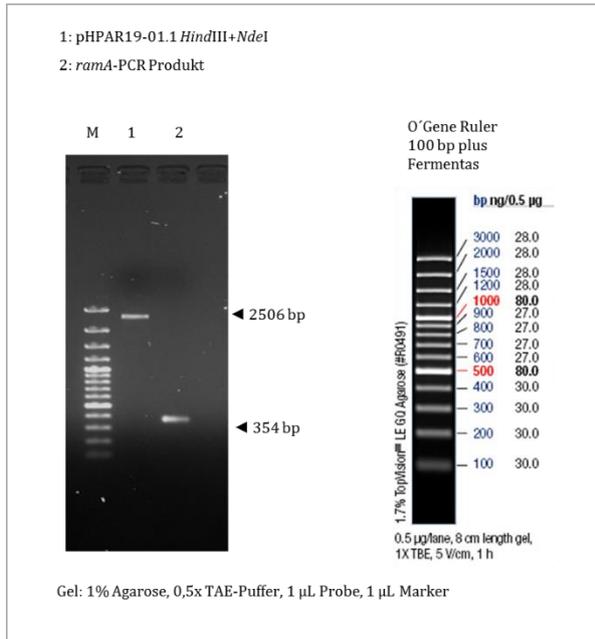


Abbildung III-24: Gereinigtes Fragment des Plamides pHPAR19-01.1 (Bahn 1) und gereinigtes *ramA*-PCR Produkt aus *Citrobacter freundii* (GK100) der nach *HindIII* und *NdeI* Verdau. UV-Aufnahme eines Agarosegels nach Elektrophorese. M: DNA-Größenstandard 100 bp plus (Fa. Fermentas). Die angegebene Produktgröße entspricht der berechneten Fragmentgröße.

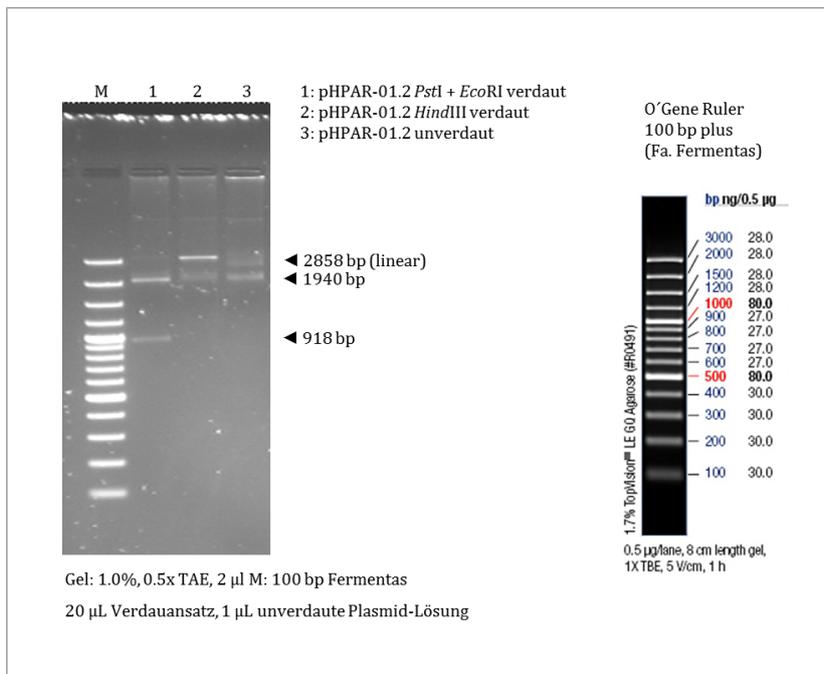


Abbildung III-25: Plasmid pHPAR19-01.2 aus Transformand 1. UV-Aufnahme eines Agarosegels nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau (Enzyme sind in der Abbildung angegeben) M: DNA-Größenstandard O'Gene Ruler 100 bp (Fa. Fermentas). Die angegebene Produktgröße entspricht der berechneten Fragmentgröße.

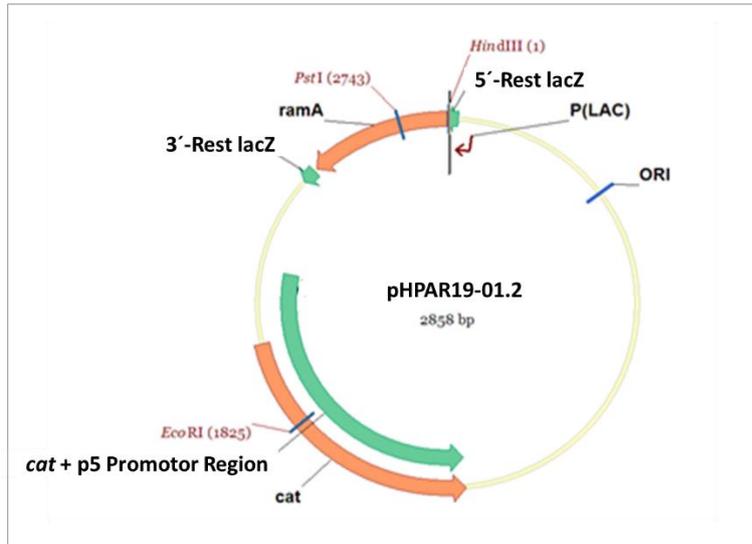


Abbildung III-26: Plasmidkarte des Vektors pHP19-01.2.

Bei der Insertion des *ramA*-Gens wurde *lacZ* unvollständig deletiert. Dabei blieben im 5'-Bereich von *ramA* 23 bp des ORFs erhalten. Im letzten Konstruktionsschritt sollten diese eliminiert werden, um eine optimale Expression des Gens zu gewährleisten. Dazu wurde eine Site Specific Mutagenesis (SSM)PCR wie unter II.2.2.11 beschrieben durchgeführt, bei der das ganze Plasmid bis auf den zu eliminierenden 23 bp Bereich amplifiziert wurde. Der Forward-Primer pUC19_cat_ramA_del-lacZ_5'+20 wurde dafür so entworfen, dass er unmittelbar vor dem ATG-Startcodon von *lacZ* bindet. Der reverse-Primer pUC19_cat_ramA_del-lacZ_3'+1 sollte direkt am ATG-Startcodon von *ramA* binden. Beide Primer enthielten einen zu einander komplementären Sequenzbereich von 20 bp Länge. Das 2855 bp lange PCR-Produkt wurde mit der Phusion-Polymerase erzeugt (siehe II.2.2.10), bei der der Vektor pHPAR-01.2 in einer 1:1000 Verdünnung als Template eingesetzt wurde. Danach wurde die Phusion-Polymerase durch eine Aufreinigung des PCR-Produktes entfernt (II.2.2.13.1). Das PCR-Produkt ist in **Abbildung III-27** dargestellt. Dieses wurde anschließend mit *DpnI* verdaut, um die Template-DNA in der Lösung abzubauen und dann mittels Hitzeschock in CaCl_2 -kompetente Zellen des Stammes *E. coli* JM109 transformiert. Die Transformanden wurden auf Chloramphenicol-LB-Agarplatten selektiert. Da in der eliminierten 23 bp Sequenz eine Schnittstelle für *HindIII* enthalten war, konnte die Plasmid-DNA der Transformanden auf den Verlust dieser Schnittstelle geprüft werden. Die Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse isoliert und in einem Doppelverdau mit *EcoRI* und *HindIII* untersucht. Korrekte Konstrukte wurden einfach geschnitten und zu einer Fragmentlänge von 2830 bp linearisiert. Dieses wurde für Transformanden 1 und 11 bestätigt (siehe **Abbildung III-28**). Die Plasmidkarte mit den entsprechenden Schnittstellen ist in **Abbildung III-29** zum Vergleich dargestellt.

III. Ergebnisse

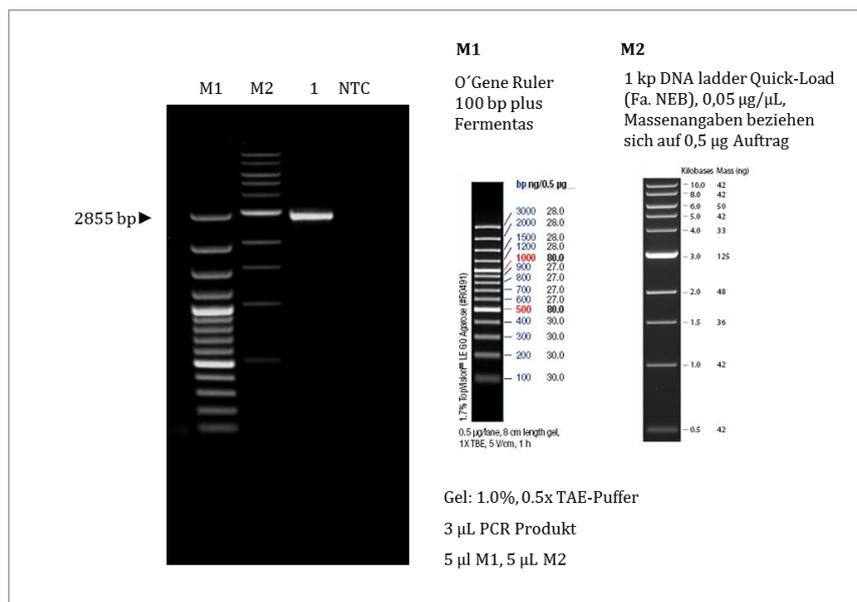


Abbildung III-27: Produkt der SSM-PCR, bei dem das Plasmid pHPAR19-01.2 amplifiziert wurde mit den Primern pUC19_cat_ramA_del-lacZ_5' +20 und pUC19_cat_ramA_del-lacZ_3' +1 (Bahn 1). UV-Aufnahme eines Agarosegels nach Elektrophorese. M: DNA-Größenstandards. Die angegebene Größe entspricht der berechneten Fragmentgröße.

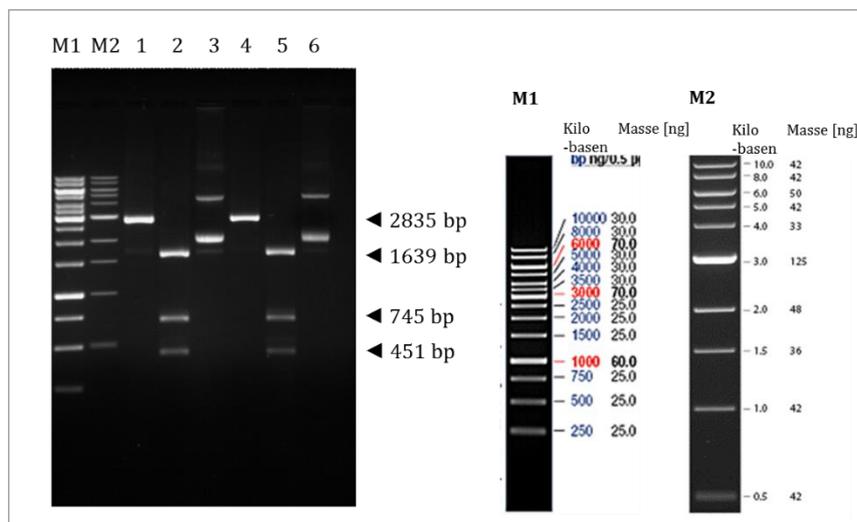


Abbildung III-28: Plasmid pHPAR19-01.3. UV-Aufnahme eines Agarosegels nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau mit *HindIII* + *AvaI* bzw. *EcoRI* + *BspHI*. 1: Plasmid-DNA aus Transformand 1, *HindIII* + *AvaI* verdaut; 2: Plasmid-DNA aus Transformand 1, *EcoRI* + *BspHI* verdaut; 3: Plasmid-DNA aus Transformand 1, unverdaut; 4: Plasmid-DNA aus Transformand 11, *HindIII* + *AvaI* verdaut; 5: Plasmid-DNA aus Transformand 11, *EcoRI* + *BspHI* verdaut; 6: Plasmid-DNA aus Transformand 11, unverdaut. M1: DNA-Größenstandard O'Gene Ruler 1kb DNA-Ladder (Fa. Fermentas, Thermofisher Scientific), M2: DNA-Größenstandard 1kb DNA Ladder Quick-Load (Fa. NEB). Die angegebenen Größen entsprechen den berechneten Fragmentgrößen.

III. Ergebnisse

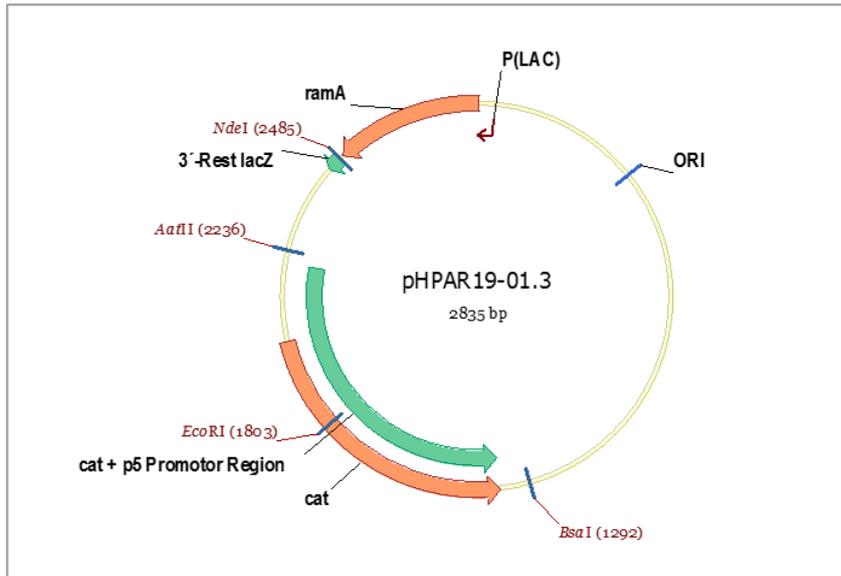


Abbildung III-29: Plasmidkarte des Vektors pHPAR19-01.3.

Die korrekte Eliminierung wurde anschließend durch eine Sequenzierung überprüft. Dazu wurde mit den Primern ramA_pUC19_5'_{-83} und ramA_pUC19_3'_{+459} ein 583 bp langes PCR-Produkt erzeugt, welches den eliminierten Bereich umfasste. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in **Abbildung III-30** dargestellt und bestätigt die korrekte Eliminierung der lacZ-Restsequenz. Die vollständige erzeugte Sequenz ist im Anhang unter VIII.1.1.5 aufgeführt. Die Plasmid-DNA des fertigen Konstruktes pHPAR19-01.3 wurde mittels Kit isoliert und aufgereinigt.

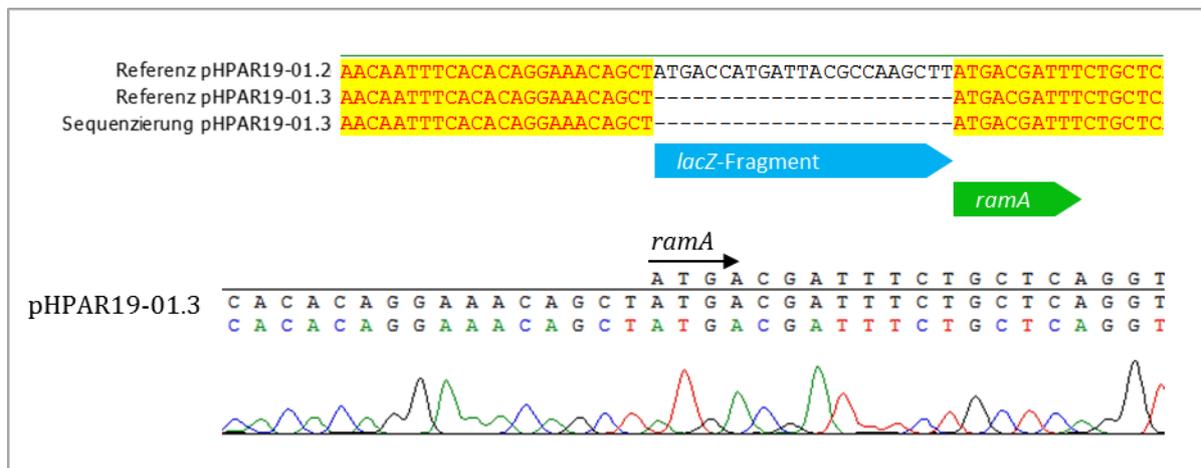


Abbildung III-30: Prüfung der Eliminierung des lacZ-Sequenzbereiches im fertigen Konstrukt. Der ORF für ramA ist durch einen Pfeil angezeigt. Das Elektropherogramm zeigt das Ergebnis der Sequenzierung des Bereiches auf pHPAR19-01.3.

III.2.2 Erstellung von Plasmiden zur Überexpression von RamA mit den Alanin-substitutionsvarianten W37A, R41A und W37A+R41A

Auf dem unter III.2.1 beschriebenen Plasmid pHPAR19-01.3 war die hier als Wildtyp definierte Variante des *ramA*-Gens bereits enthalten. Diese wurde mittels gerichteter Mutagenese jeweils so verändert, dass sie für die Alanin-Substitutionsmutationen W37A, R41A sowie W37A+R41A kodierte. Dazu wurde eine SSM-PCR (siehe II.2.2.11) mit pHPAR19-01.3 als Template-DNA durchgeführt, bei der für die jeweiligen Varianten folgende *forward*-Primer eingesetzt wurden: ramA-W37A_5'_+81 (für W37A), ramA-R41A_5'_+81 (für R41A) und ramA-W37A+R41A_5'_+81 (für W37A+R41A). Als *reverse*-Primer wurde jeweils ramA_3'_+61 eingesetzt. Das Ergebnis ist in **Abbildung III-31** dargestellt. Die PCR-Produkte wurden anschließend aufgereinigt (siehe II.2.2.13) und in CaCl₂-kompetente Zellen des Stammes *E. coli* JM109 mittels Hitzeschock transformiert (siehe II.2.2.8). Transformanden wurden auf Chloramphenicol haltigen LB-Agarplatten selektiert. Auf korrekte Konstrukte wurde in Pools mittels ARMS-PCR geprüft (siehe II.2.2.12). Für die Mutation W37A wurden dafür die Primer ramA_Cfreu_5_91_W37A-ARMS und ramA_Cfreu_5_91_W37-ARMS, der die Wildtyp-Sequenzvariante trug, eingesetzt. Die entsprechenden *forward*-Primer für die Substitutionsmutation R41A waren ramA_Cfreu_5_104_R41A-ARMS und ramA_Cfreu_5_+104_R41-ARMS. Als *reverse*-Primer wurde ramA_Cfreu_3_313 verwendet. Die Doppelmutation wurde entsprechend separat auf beide Mutationen hin überprüft. Alle Primersequenzen sind unter II.1.1 aufgeführt. Es wurde pro Mutationsansatz ein Transformand mit korrekter DNA-Anpassung identifiziert. Das Ergebnis der ARMS-PCR ist in **Abbildung III-32** dargestellt.

Pro Mutationstypus wurde für jeweils ein Plasmid mit korrektem ARMS-PCR Ergebnis die DNA-Sequenz zusätzlich mittels Sequenzierung nach Standardprotokoll analysiert (siehe II.2.2.14). Dazu wurden die Primer ramA_5'_-83 und ramA_C.freundii_3_+313 eingesetzt. Die PCR-Produkte zur Sequenzierung sind in **Abbildung III-33** dargestellt. Wie in **Abbildung III-34** gezeigt ist, enthielten die erzeugten Plasmide die korrekten Sequenzen für die entsprechenden Substitutionsmutationen. Die Plasmide wurden mit pHPAR19-01.4 (W37A), pHP19-01.5 (R41A) und pHP19-01.6 (W37A+R41A) benannt.

III. Ergebnisse

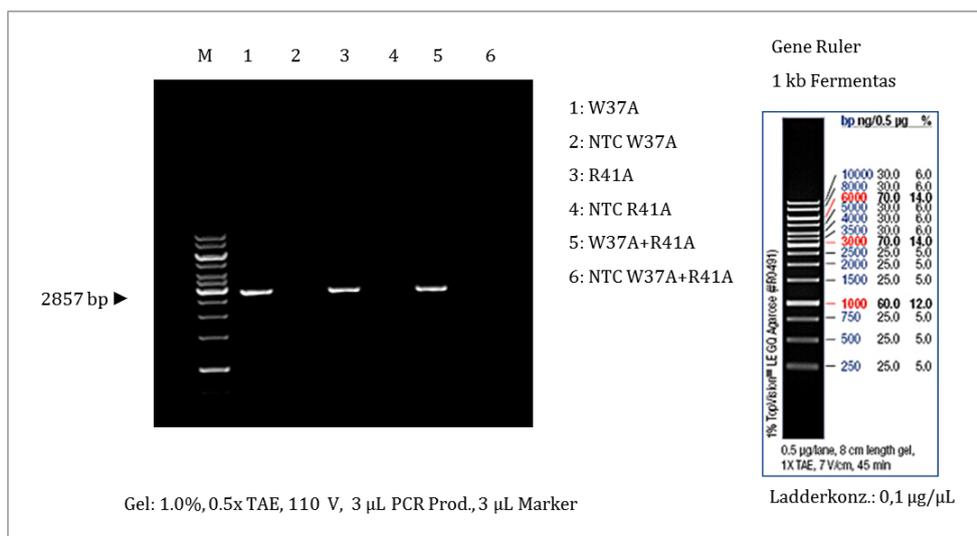


Abbildung III-31: Produkte der SSM-PCR zur Einfügung der *ramA*-Substitutionsvarianten. Das Template der PCR war die *ramA*-Wildtyp-Variante auf dem Vektor pHPAR19-01.3 (1:1000 verdünnt). Folgende *forward*-Primer wurden eingesetzt: *ramA*-W37A_{5'}+81 (für W37A), *ramA*-R41A_{5'}+81 (für R41A) und *ramA*-W37A+R41A_{5'}+81 (für W37A+R41A). Als reverse-Primer wurde jeweils *ramA*_{3'}+61 eingesetzt. UV-Aufnahme eines Agarosegels nach Elektrophorese. M: DNA-Größenstandard. Die angegebene Größe entspricht der berechneten Fragmentgröße. NTC: *no template control*.

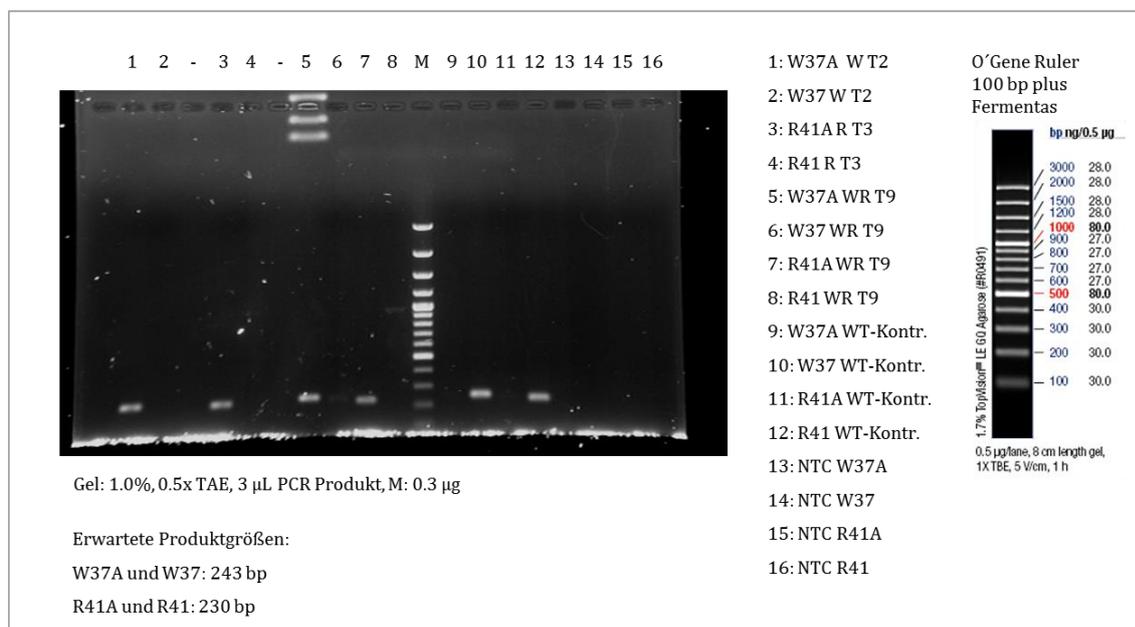


Abbildung III-32: Produkte der ARMS-PCR zur Kontrolle der *ramA*-Substitutionsvarianten nach der Transformation. Hier wurden zur besseren Übersicht die Bezeichnungen für den Aminosäureaustausch gewählt. Templates waren die isolierte DNA der Transformanden T2 (Substitutions-Ansatz W37A), T3 (Substitutions-Ansatz R41A) und T9 (Substitutions-Ansatz W37A + R41A) sowie das Plasmid pHP19-01.3 für die *ramA*-Wildtyp-Variante (WT-Kontr., 1:1000 verdünnt). Aufgetragen wurden jeweils die PCR-Produkte aus den Mutations-Ansätzen (Primer zum Nachweis von W37A bzw. R41A), PCR-Produkte aus den Kontrollansätzen (Primer zum Nachweis von W37 bzw. R21). UV-Aufnahme eines Agarosegels nach Elektrophorese, im oberen Bildbereich sind DNA-Fragmente des DNA-Größenstandards eines anderen Experimentes zu sehen. M: DNA-Größenstandard, NTC: *no template control*.

III. Ergebnisse

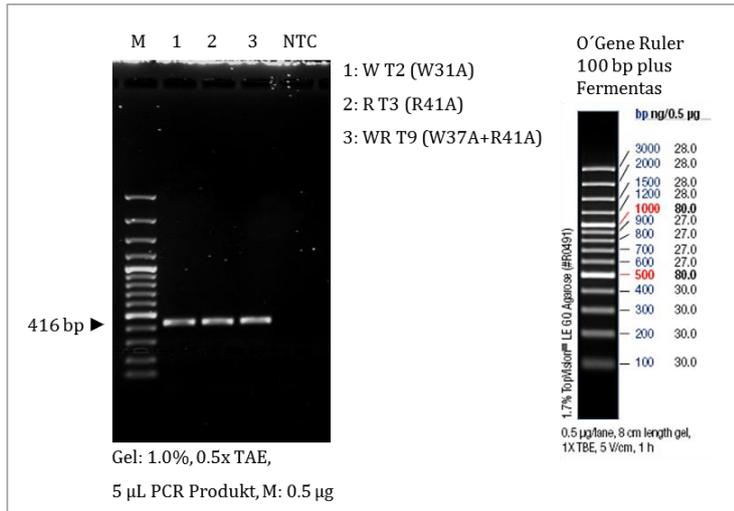


Abbildung III-33: PCR-Produkte zur Sequenzierung der *ramA*-Substitutionsvarianten. Die verwendeten Primer waren *ramA*_5'_{-83} und *ramA*_C.freundii_3_{+313}. UV-Aufnahme eines Agarosegels nach Elektrophorese. M: DNA-Größenstandard, NTC: *no template control*. Die angegebene Größe entspricht der berechneten Fragmentgröße.

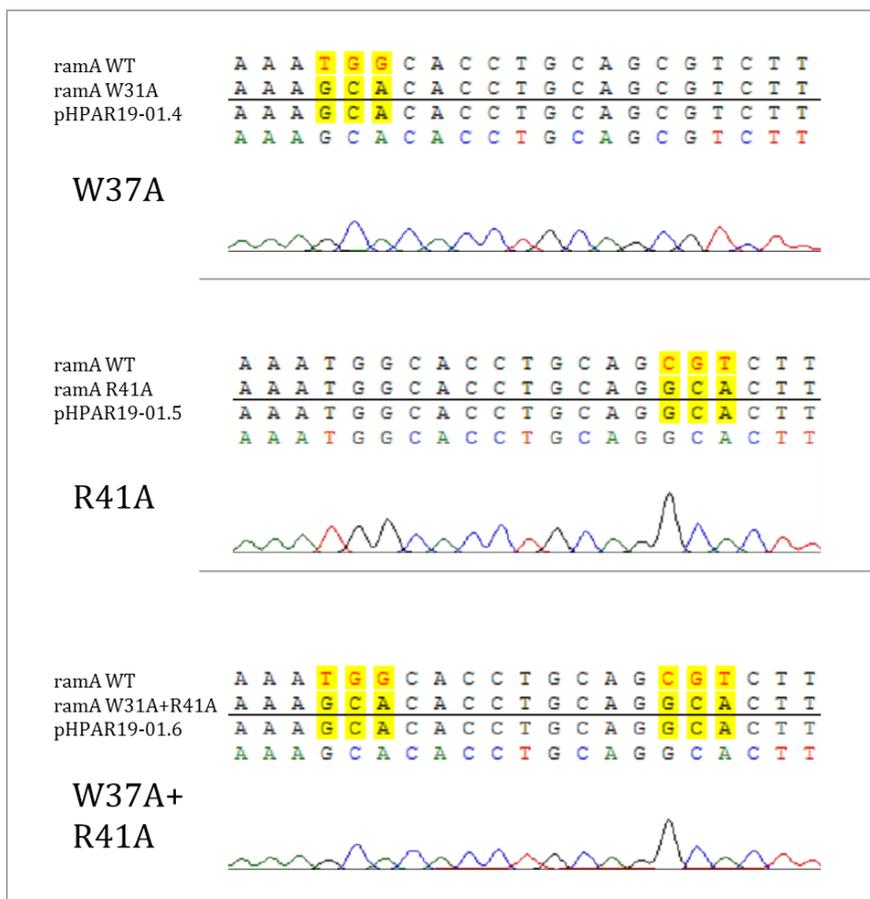


Abbildung III-34: Ergebnisse der Sequenzierung der *RamA*-Überexpressionsplasmide pHPAR19-01.4, pHPAR19-01.5 und pHPAR19-01.5 mit den jeweiligen Substitutionsvarianten W37A, R41A und W37A+R41A. Jeweils sind die Wildtypvariante und die entsprechende Mutationsvariante dargestellt im Vergleich zur Sequenz der Plasmide mit dem entsprechenden Elektropherogramm der DNA-Sequenzierung.

III.2.3 Konstruktion eines *pacrA*-Luziferase Reporterplasmides

Das Trägerplasmid des *pacrA-luc*-Reportergenkonstruktes sollte gleichzeitig mit dem Plasmid zur Überexpression von *ramA* pHPAR19-01.3, bzw. mit dem entsprechenden Kontrollplasmid pHPAR19-01.1 ohne *ramA*, im Messstamm *Citrobacter freundii* vorliegen. Darüber hinaus sollte das Reporterplasmid nur in geringer Kopienzahl vorliegen um die basale und allein von der Kopienzahl abhängige Expression des Reportergens so gering wie möglich zu halten.

Es ist bekannt, dass mehrere Plasmide mit selben Replikationsmechanismus um die für die Replikation benötigten Enzyme und Ressourcen konkurrieren können, was zu einer inkonsistenten Kopienzahl bis hin zur vollständigen Verdrängung eines Plasmides führen kann (Sambrook and Russel 2001). Um dieses zu vermeiden, sollte für das Reporterplasmid ein zum Überexpressionsplasmid kompatiblen Replikationsmechanismus enthalten. Letzteres wurde in dem Vektorhintergrund pUC19 konstruiert (siehe III.2.1), welches als Derivat des Plasmides pBR322 einen ColE1-Replikon besaß und zur Plasmid-Inkompatibilitätsgruppe pMB1/ColE1 gehörte.

Für das Reporterplasmid wurde pACYC177 als Vektorhintergrund gewählt. Dieser besitzt das p15A-Replikon, welches ursprünglich einem gleichnamigen Plasmid entstammt (Chang and Cohen 1978) und ebenfalls ein ColE1-Typ Replikon ist. Dieses ist jedoch durch Punktmutationen in seinen Regulator-RNAs (RNAI und RNAII) mit dem der Plasmide pBR322 und pUC19 kompatibel und gehört der Plasmidinkompatibilitätsgruppe p15A an (Davison 1984; Sambrook and Russel 2001). Beide Inkompatibilitätsgruppen sind wiederum miteinander kompatibel, was experimentell bewiesen wurde (Lin-Chao, Chen, and Wong 1992).

Weiter liegt pACYC177 in einer vergleichsweise niedrigen Kopienzahl in der Zelle vor (18-22, (Sambrook and Russel 2001)) und besitzt eine dem Transposon Tn903 entstammende Kan^R Resistenzkassette, deren Gen *aphA1* für eine Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase kodiert und eine Resistenz gegenüber Kanamycin vermittelt. Dieses machte es möglich gleichzeitig auf das Reporterplasmid und das *ramA*-Überexpressionsplasmid zu selektieren, welches eine Chl^R Kassette enthält, deren Gen *cat* für eine Chloramphenicol-Acetyltransferase kodiert und eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol vermittelt.

In der Arbeitsgruppe bestand mit pPHB331 bereits ein Plasmid, in welchem ein Fusionsprodukt des *pacrA*-Promotor Bereiches mit dem *luc* Gen der Luziferase enthalten war (Matthiessen 2007). Da dieser jedoch aus dem Ausgangsplasmid pBR322 konstruiert wurde, welches das gleiche Replikon enthält wie das *RamA*-Überexpressionsplasmid, waren beide nicht miteinander kompatibel. Deshalb sollte das *pacrA-luc* Konstrukt als Einheit in pACYC177 umkloniert werden. Da der *pacrA*-Promotor jedoch aus *E. coli* stammte, wurde mittels Sequenzvergleich zunächst die Übereinstimmung zwischen *E. coli* und *Citrobacter* geprüft. Verglichen wurden dazu die bekannte

III. Ergebnisse

marbox für *E. coli* (R. G. Martin et al. 1999) mit der beschriebenen RamA-Bindestelle in *Salmonella* (E. Nikaido, Yamaguchi, and Nishino 2008) und der entsprechenden Sequenzbereich in *Citrobacter*. Dafür wurde der *pacrA*-Promotorbereich aus dem Stamm *Citrobacter freundii* GK100 zunächst nach einem Standardprotokoll wie unter II.2.2.14 beschrieben sequenziert. Für die Amplifizierung und die Sequenzierung wurden die Primer *acrA_5_-367_Enter* und *acrA_3_+68_Enter* verwendet (siehe II.1.1), die einen Bereich von 472 bp im upstream-Bereich von *acrAB* abdeckten und basierend auf einem multiplen Sequenzalignment verschiedener Enterobakterienspezies entworfen wurden sind. Die erzeugte Sequenz ist in **Abbildung III-35** im Alignment mit dem *pacrA*-Promotorbereich aus *E. coli*, wie er im Plasmid pPHB331 enthalten war dargestellt. Außerdem ist der entsprechende Sequenzbereich in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium dargestellt, für den die RamA-Bindestelle beschrieben worden ist (E. Nikaido, Yamaguchi, and Nishino 2008). Der Sequenzvergleich zeigte, dass die RamA-Bindungssequenz 5'-TGTTTGGTTTTTCGTGCCAT-3' im *Citrobacter* Stamm GK100 identisch zu der für *Salmonella* beschriebenen ist und diese darüber hinaus vollständig mit dem entsprechenden Sequenzbereich auf dem Reporterplasmid pPHB331 übereinstimmte. Die genannte Bindungssequenz ist identisch mit der für den *pacrA*-Promotor in *E. coli* beschriebenen marbox.

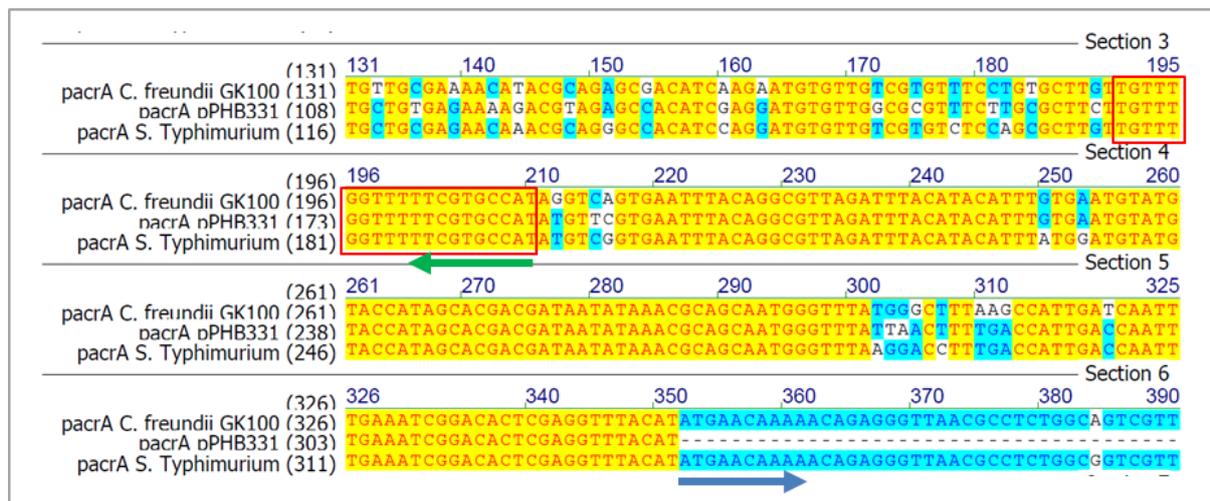


Abbildung III-35: Sequenzalignment des *pacrA*-Promotorbereiches. Dargestellt sind die Sequenzen aus *Citrobacter freundii* GK100, aus dem *pacrA*-Luziferase-Reporterplasmid pPHB331 sowie aus *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (GI:674281104 Region 501810..502344). Die Leserastermarkierung der Gene *acrR* und *acrA* sind durch einen grünen bzw. einen blauen Pfeil angezeigt. Die RamA-Bindungsbox ist rot umrandet.

Aufgrund der beschriebenen Übereinstimmung im *pacrA*-Promotor zwischen *E. coli* und *Citrobacter* wurde die *pacrA-luc* Kasette des Vektors pPHB331 für das hier erstellte Reporterplasmid als geeignet befunden und als Einheit in das Trägerplasmid pACYC177 umkloniert. Dazu wurden die Plasmide pACYC177 und pPHB331 wie unter II.2.2.2 beschrieben

III. Ergebnisse

aus ihren Trägerstämmen isoliert und aufgereinigt. Die Umklonierung erfolgte über einen Restriktionsverdau (siehe II.2.2.5) mit dem Enzym *Pst*I, bei dem die Amp^R-Resistenzkassette zerstört wurde. Die entsprechenden Restriktionsfragmente wurden elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und wie unter II.2.2.13.2 beschrieben aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Die Enden des DNA-Fragmentes aus pACYC177 wurden dann dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors in den folgenden Schritten zu verhindern (siehe II.2.2.6). Anschließend wurde die Konzentration der *Pst*I-Produkte durch eine weitere Agarose-Gelelektrophorese bestimmt (siehe **Abbildung III-36**).

Die entsprechenden DNA-Fragmente des Trägerplasmides pACYC177 und der *pacrA*-luc Kasette wurden dann wie unter II.2.2.7 miteinander ligiert und in CaCl₂-kompetente Zellen des Stammes *E. coli* JM109 mittels Hitzeschock transformiert (siehe II.2.2.8). Die Selektion der Transformanden erfolgte auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten. Aus 12 Transformanden wurde jeweils die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse isoliert (siehe II.2.2.2) und in einem Restriktionsverdau mit dem Enzym *Hinc*II auf das korrekte Klonierungsprodukt hin untersucht. Dabei wurde auch auf die richtige Orientierung der *pacrA*-luc Kasette im Vektor geprüft. Diese sollte entgegengesetzt aller übrigen auf dem Plasmid vorliegenden ORFs orientiert sein (inklusive ehemaliger Amp^R-Resistenzkassette), um mögliche störende Effekte anderer Promotoren bei der Quantifizierung der *pacrA*-Promotoraktivität auszuschließen. Dieses war in Transformand T3 gegeben (siehe **Abbildung III-38**, *Hinc*II-Fragmente: 701 bp, 5279 bp; falsche Orientierung: 1934 bp, 4046 bp), aus dem das in **Abbildung III-37** dargestellte fertige Konstrukt pHPAR177-01.1 mittels Miniprep-Kit isoliert und aufgereinigt wurde (siehe II.2.2.2.3).

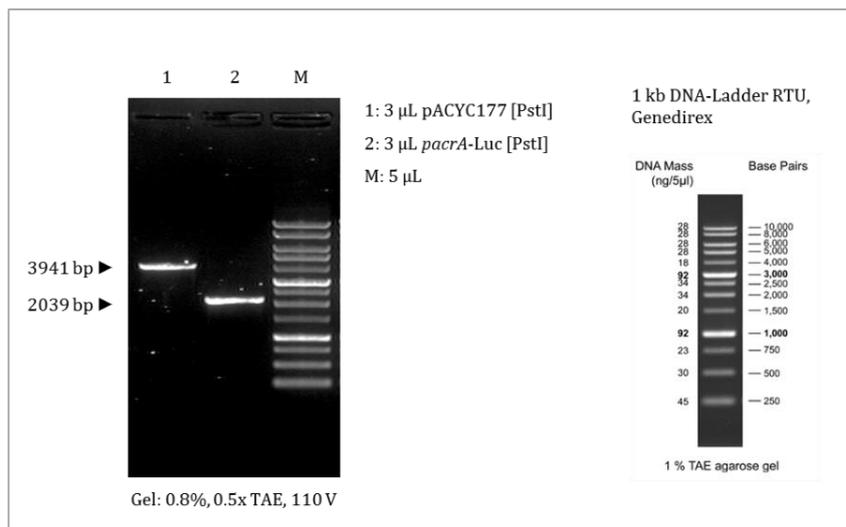


Abbildung III-36: Plasmid und Insert-Fragmente nach *Pst*I-Verdau und Gelextraktion zur Klonierung des Luziferase-Reporterplasmides. Das Insert *pacrA*-Luc stammt aus dem Vektor pPHB331 (Matthiessen 2007). UV-Aufnahme eines Agarosegels nach elektrophoretischer Auftrennung. M: DNA-Größenstandard. Die angegebenen Größen entsprechen den berechneten Fragmentgrößen.

III. Ergebnisse

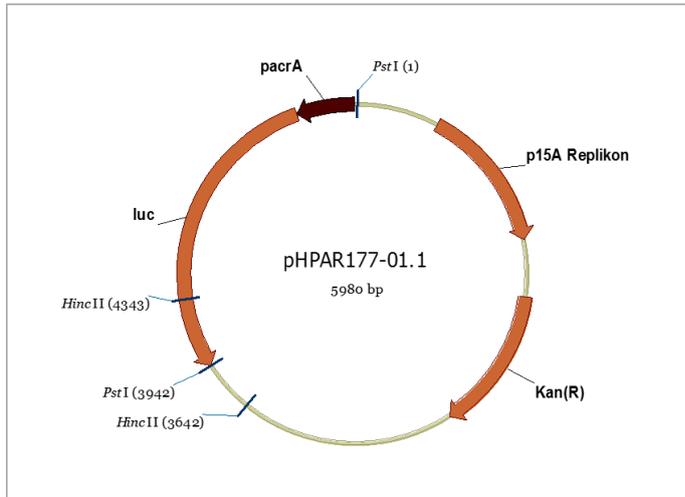


Abbildung III-37: Vektorkarte des *pacrA-luc* Reporterplasmides pHPAR177-01.1.

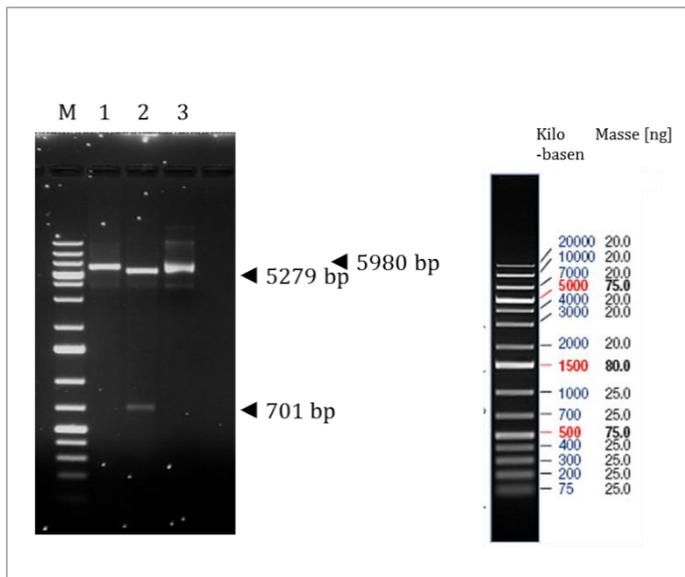


Abbildung III-38: Plasmid pHPAR177-01.1. UV-Aufnahme eines Agarosegels nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *HincII*. 1: Plasmid-DNA aus Transformand 3, *EcoRI* verdaut; 2: Plasmid-DNA aus Transformand 3, *HincII* verdaut; 3: Plasmid-DNA aus Transformand 3, unverdaut; M: DNA-Größenstandard Gene Ruler 1kb Plus (Fa. Fermentas Thermofisher Scientific). Die angegebenen Größen entsprechen den berechneten Fragmentgrößen.

III.2.4 Analyse der RamA-Substitutionsmutationsvarianten auf die *pacrA*-Promotoraktivität sowie die Ausprägung des MDR-Phänotyps

Die erzeugten Plasmide wurden zunächst in den Teststamm *Citrobacter freundii* GK100 eingebracht. Im ersten Schritt wurde das Reporterplasmid pHPAR177-01.1 mittels Elektroporation in entsprechend kompetente Zellen des Stammes transformiert (siehe II.2.2.8).

III. Ergebnisse

Die Selektion erfolgte durch Kanamycin. Im zweiten Schritt wurden diese Zellen ihrerseits elektrokompent gemacht und jeweils mit den Überexpressionsplasmiden pHPAR19-01.4, pHPAR19-01.5 und pHPAR19-01.6 der verschiedenen RamA-Varianten W37A, R41A bzw. W37A+R41A sowie der Wildtyp-Variante pHPAR19-01.3 und dem Kontrollplasmid ohne RamA pHPAR19-01.1 transformiert. Die Selektion erfolgte gleichzeitig mit Kanamycin und Chloramphenicol. Im Folgenden werden die jeweilig erzeugten Stämme „W37A“, „R41A“, „W37A+R41A“ sowie „pWT“ und Kontrolle genannt.

Für alle erzeugten Stämme wurde die *pacrA*-Promotoraktivität über die Messung der Luziferaseaktivität bestimmt. Das unter II.2.3 aufgeführte Protokoll wurde für diese Anwendung in mehreren Testmessungen (hier nicht gezeigt) hinsichtlich des Erntezeitpunktes der Zellen aus der wachsenden Kultur, des verwendeten Messgerätes sowie den Messpositionen auf der Mikrotitermessplatte optimiert. Es sollte ein möglichst starkes Messsignal erreicht werden, um feinere Unterschiede zwischen den Untersuchungsstämmen abbilden zu können. Die Messung wurde in drei Versuchsreplikaten durchgeführt, also mit drei unabhängigen Kulturen für jeden Untersuchungsstamm. Weiter wurde die Lumineszenz für jede Kultur dreifach auf der Messplatte bestimmt, also in drei Messreplikaten. Die Ergebnisse sind in **Abbildung III-39** dargestellt. Sie zeigen, dass es durch die Überexpression der Wildtyp Variante von *ramA* zu einer deutlich erhöhten Transkriptionsaktivität am *pacrA*-Promotor kam im Vergleich zum Kontrollstamm mit der Plasmidvariante ohne *ramA*. Die Überexpression der *ramA*-Mutationsvarianten führten dagegen zu einer deutlich geringeren Transkriptionsaktivität, wobei dieser Effekt in den Varianten R41A sowie W37A+R41A wesentlich stärker ausgeprägt war als in der W37A Variante.

III. Ergebnisse

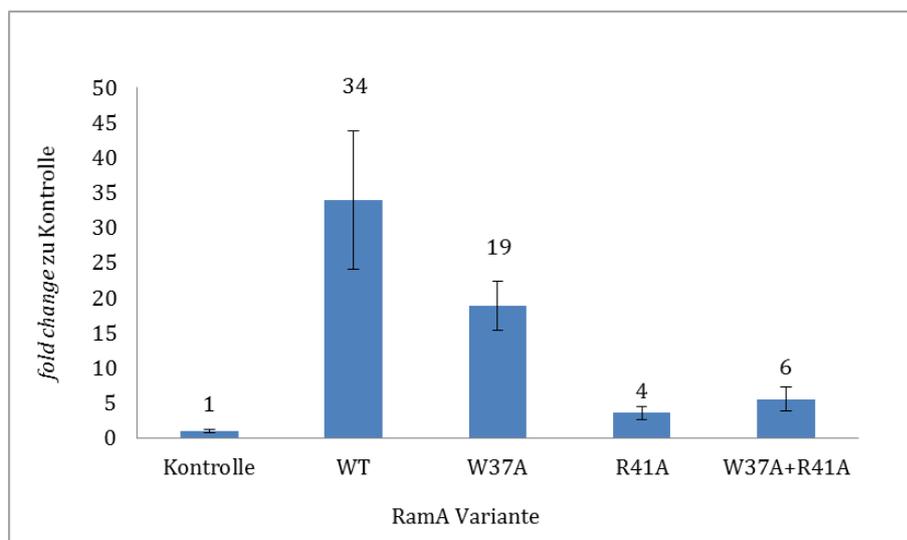


Abbildung III-39: Relative *pacrA*-Promotoraktivität der *ramA*-Überexpressionsvarianten im Verhältnis zur Kontrolle ohne *ramA*-Überexpression. Gemessen wurde die Lumineszenz im Luziferase-Reporterassay mit *Citrobacter freundii* Stämmen, die jeweils ein *multy copy* Plasmid zur Überexpression der unterschiedlichen Mutationsvarianten des *ramA* Gens trugen (WT: pHPAR19-01.3, W37A: pHPAR19-01.4, R41A: pHPAR19-01.5, W37A+R41A: pHPAR19-01.6). Das Promotor-Reportergerätkonstrukt war auf einem zweiten Plasmid (pHPAR177-01.1) in den Zellen vorhanden. Die Messung erfolgte in drei unabhängigen Versuchen, deren Schwankung vom angegebenen Mittelwert durch die Standardabweichung beschrieben ist.

Ein ähnliches Ergebnis lieferte der Vergleich der MHK für Ciprofloxacin und Tetracyclin zwischen den gleichen Stämmen. Die MHK wurde wie unter II.2.1.4 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle III-11** dargestellt. Die Überexpression der Wildtyp-*ramA*-Variante hatte jeweils eine 8 fache bzw. 16 fache Erhöhung der MHK von Ciprofloxacin bzw. Tetracyclin zur Folge, während die W37A Mutante für beide Antibiotika eine lediglich 4 fache MHK von beiden Antibiotika aufwies. Bei den Varianten R41A und W37A+R41A war überhaupt kein Effekt mehr zu sehen und die MHK blieb bei beiden Varianten auf Kontrollniveau.

Tabelle III-11: Minimale Hemmkonzentration (MHK) der Antibiotika Ciprofloxacin und Tetracyclin in den *ramA*-Überexpressionsstämmen. Aus den jeweiligen MHK Werten wurden das Verhältnis zur Kontrolle ohne *ramA*-Überexpression berechnet und als *fold change* (FC, blau hinterlegt) angegeben.

[µg/mL]	Kontrolle	WT		W37A		R41A		W37A+R41	
	MHK	MHK	FC	MHK	FC	MHK	FC	MHK	FC
Ciprofloxacin	0,004	0,032	8	0,016	4	0,004	1	0,004	1
Tetracycline	0,5	8	16	2	4	0,5	1	0,5	1

Die erhöhte Antibiotikaresistenz korrelierte also mit der Transkriptionsrate am *pacrAB*-Promotor bei einer Überexpression von *ramA*. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die analysierten Aminosäuren und insbesondere R41 eine essentielle Rolle für die Funktion von RamA als Transkriptionsfaktor spielen.

III.3 Untersuchung des Einflusses einer *ramA*-Überexpression auf die Ausprägung eines MDR-Phänotypes in *Citrobacter*

Um einen Einfluss des *ramA*-homologen Gens in *Citrobacter freundii* auf die Ausprägung eines MDR-Phänotyps zu prüfen, wurde das Gen überexprimiert und der Effekt auf die Antibiotikaresistenz bestimmt. Dazu wurde das *multicopy* Plasmid pHPAR19-01.3 verwendet, dessen Konstruktion unter III.2.1 beschrieben wurde. Der Einfluss auf die Ausprägung eines MDR-Phänotypes wurde zunächst in *Citrobacter freundii* und folgend nach verschiedenen Teilfragestellungen in weiteren Stämmen anderer Enterobakterienarten geprüft, wofür jeweils das *ramA*-Überexpressionsplasmid bzw. das Kontrollplasmid pHPAR19-01.1 (siehe III.2.1) ohne *ramA* in diese transformiert wurde. Dieses wurde für alle untersuchten Stämme in entsprechend kompetenten Zellen mittels Elektroporation durchgeführt (siehe II.2.2.8). Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Chloramphenicol. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) für die verschiedenen Antibiotika wurde wie unter II.2.1.4 beschrieben nach der Mikro-Bouillon-Dilutionsmethode bestimmt. Dabei wurde während der Inkubationsphase nicht mit Chloramphenicol selektiert. Alle Messungen wurden zusätzlich in Anwesenheit des Effluxpumpeninhibitors (EPI) Phenylalaninyl-Arginyl- β -Naphthylamid (PA β N) durchgeführt, der mit einer Konzentration entsprechend der 1/4 oder 1/8 MHK der Substanz selbst eingesetzt wurde. Zur Induktion des *placZ*-Promotors wurde Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Endkonzentration von 1 mM während der Inkubation eingesetzt. Alle Messungen wurden mindestens zweifach durchgeführt. Bei einer Abweichung der beiden ermittelten Messwerte, wurde die MHK ein drittes Mal bestimmt. Im Folgenden sind die MHK-Werte für den *ramA*-Überexpressionszustand (Zellen transformiert mit Überexpressionsplasmid pHPAR19-01.3) mit und ohne EPI sowie der Kontrollzustand (Zellen transformiert mit Kontrollplasmid pHPAR19-01.1) ohne *ramA*-Überexpression nach Telexperimenten aufgeführt.

III.3.1 Prüfung eines *ramA*-abhängigen MDR-Phänotypes in *Citrobacter freundii*

Um zu prüfen, ob die Überexpression von *ramA* in *Citrobacter freundii* einen Einfluss auf die Antibiotikaresistenz hat, wurde der Stamm GK100 mit dem *ramA*-Überexpressionsplasmid pHPAR19-01.3 und in einem weiteren Ansatz mit dem Kontrollplasmid pHPAR19-01.1 transformiert. Anschließend wurde die MHK der Antibiotika Ciprofloxacin, Nalidixinsäure, Tetracyclin und Puromycin bestimmt. Alle Bestimmungen wurden zusätzlich in Anwesenheit des Effluxpumpeninhibitors PA β N durchgeführt. Desweiteren sollte getestet werden, ob sich die Stärke der Ausprägung eines MDR-Phänotyps mittels Aktivierung des *placZ*-Promotors weiter steigern ließe. Dazu wurde die Messung auch jeweils unter Zugabe von IPTG durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle III-12** dargestellt. Sie zeigen, dass die Überexpression von *ramA* einen

III. Ergebnisse

MDR-Phänotyp induziert, da die Zellen simultan weniger empfindlich gegenüber den verschiedenen Antibiotika unterschiedlicher Substanzklassen reagierten. Bei gleichzeitiger Zugabe des EPIs fielen die gemessenen MHK-Werte deutlich geringer aus. Für Nalidixinsäure und Puromycin waren diese sogar deutlich geringer, wenn Zellen nur mit dem Kontrollplasmid transformiert waren. Durch die Verwendung von IPTG war keine zusätzliche Steigerung der MHK zu beobachten.

Tabelle III-12: Ergebnisse der MHK-Bestimmung bei *ramA*-Überexpression in *Citrobacter freundii* GK100. Der Stamm wurde mit dem *ramA*-Überexpressionsplasmid pHPAR19-01.3 bzw. dem Kontrollplasmid ohne *ramA* pHPAR19-01.1 transformiert. MHKs wurden im Mikro-Bouillon-Dilutionsverfahren bestimmt. EPI: Effluxpumpeninhibitor PA β N, eingesetzt in einer Endkonzentration entsprechend 1/4 der MHK, IPTG wurde in einer Endkonzentration von 1 mM eingesetzt.

<i>Citrobacter freundii</i> GK100	MHK [μ g/mL]			
	CIP	TET	NAL	PUR
pHPAR19-01.3 (<i>ramA</i>)	0,032	8	32	512
pHPAR19-01.3 (<i>ramA</i>) + IPTG	0,032	8	32	512
pHPAR19-01.3 (<i>ramA</i>) + EPI	0,008	2	0,5	32
pHPAR19-01.1 (Kontrolle)	0,004	1	8	128

III.3.2 Prüfung eines MDR-Phänotyps bei heterologer *ramA*-Überexpression in verschiedenen Enterobakterien

Hierfür wurden fünf *Citrobacter* Stämme verschiedener Spezies ausgewählt sowie jeweils ein Stamm der Spezies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium sowie *Enterobacter cloacae*. Die Stammbezeichnungen sind in **Tabelle III-13** bzw. **Tabelle III-14** aufgeführt. Mit *E. coli* WT GK571 wurde ein in der Arbeitsgruppe als Wildtyp-Stamm definiertes Isolat aus humanem Stuhl einer Testperson verwendet, die nie zuvor mit Chinolonen therapiert worden war (P. Heisig and Tschorny 1994). Auch die übrigen Stämme wurden im Bezug auf Antibiotikaresistenzen als Wildtyp-Stämme behandelt. Elektrokompetente Zellen wurden dazu mit den Plasmiden pHPAR-01.3 bzw. pHPAR19-01.1 transformiert. Die MHK-Bestimmung erfolgte in *E. coli* für die Antibiotika Ciprofloxacin, Nalidixinsäure, Tetracyclin und Puromycin. Bei allen anderen Untersuchungen wurde die MHK lediglich für Ciprofloxacin und Tetracyclin durchgeführt. Für alle Stämme wurde der Einfluss des EPI PA β N getestet. Für *E. coli* wurde zusätzlich getestet, ob sich ein MDR-Effekt durch den Einsatz von IPTG (zur Aktivierung des *placZ*-Promotors) noch verstärken ließe. Die Ergebnisse für *E. coli* sind in **Tabelle III-13** aufgelistet. Sie zeigen auch hier, dass der MDR-Effekt durch eine heterologe Überexpression in

III. Ergebnisse

E. coli übertragbar ist. Dieser Effekt ließ sich wie zuvor für *Citrobacter freundii* beschrieben nicht signifikant durch IPTG steigern. In allen folgenden Experimenten wurde auf die Verwendung von IPTG verzichtet. Die Ergebnisse für die anderen Stämme in **Tabelle III-14** zeigen, dass die heterologe Übertragbarkeit auch für alle getesteten *Citrobacter* Spezies aber auch für solche anderer Gattungen gilt, in denen die *ramRA*-Gene im Chromosomen präsent sind. Bei *ramA*-Überexpression und gleichzeitiger Verwendung des EPIs kam es nicht zu einer gesteigerten Antibiotikaresistenz.

Tabelle III-13: Ergebnisse der MHK-Bestimmung bei *ramA*-Überexpression in *E. coli* WT GK571. Der Stamm wurde mit dem *ramA*-Überexpressionsplasmid pHPAR19-01.3 bzw. dem Kontrollplasmid ohne *ramA* pHPAR19-01.1 transformiert. MHKs wurden im Mikro-Bouillon-Dilutionsverfahren bestimmt. EPI: Effluxpumpeninhibitor PA β N, eingesetzt in einer Endkonzentration entsprechend 1/4 der MHK, IPTG wurde in einer Endkonzentration von 1 mM eingesetzt.

<i>E. coli</i> WT GK571 Status	MHK [μ g/mL]			
	CIP	TET	NAL	PUR
pHPAR19-01.3 (<i>ramA</i>)	0,032	4	32	256
pHPAR19-01.3 (<i>ramA</i>) + IPTG	0,032	8	32	256
pHPAR19-01.3 (<i>ramA</i>) + EPI	0,008	2	0,5	64
pHPAR19-01.1 (Kontrolle)	0,016	1	8	64

III. Ergebnisse

Tabelle III-14: Ergebnisse der MHK-Bestimmung in verschiedenen Stämmen der Gattungen *Citrobacter* (*C.*), *Klebsiella* (*K.*), *Enterobacter* (*E.*) sowie *Salmonella* (*S.*). Die Stämme wurden mit dem *ramA*-Überexpressionsplasmid pHPAR19-01.3 (*ramA*-Überexpr.) bzw. dem Kontrollplasmid ohne *ramA* pHPAR19-01.1 (Kontrolle) transformiert. MHKs wurden im Mikro-Bouillon-Dilutionsverfahren bestimmt. EPI: Effluxpumpeninhibitor PAβN, wurde in 1/8 MHK des jeweiligen Stammes eingesetzt

Spezies	Stamm	<i>ramA</i> -Überexpr. (pHPAR19-01.3)		Kontrolle (pHPAR19-01.1)	<i>ramA</i> -Überexpr. (pHPAR19-01.3)		Kontrolle (pHPAR19-01.1)
		CIP	+EPI	CIP	TET	+EPI	TET
<i>C. koseri</i>	1264	0,032	0,004	0,004	4	1	0,5
<i>C. farmeri</i>	2519	0,064	0,008	0,008	4	2	1
<i>C. sedlakii</i>	2552	0,064	0,008	0,016	16	4	4
<i>C. werkmanii</i>	4089	0,128	0,032	0,032	4	2	1
<i>C. rodentium</i>	1253	0,016	0,008	0,004	4	2	1
<i>K. pneumoniae</i>	94	0,128	0,032	0,032	16	1	4
<i>E. cloacae</i>	489	0,016	0,002	0,002	0,5	0,3	0,5
<i>S. enterica</i> Typhimurium	501	0,064	0,004	0,016	8	2	1

III.3.3 Prüfung des Einflusses von *marA*, *soxS* und *rob* sowie *tolC* auf den *ramA*-abhängigen MDR-Effekt

In einem analogen Experiment sollte geprüft werden, welche Rolle andere Transkriptionsfaktoren der AraC/XylS Familie bei der Ausprägung eines effluxabhängigen MDR-Phänotyps bei gleichzeitiger *ramA*-Überexpression spielen. Dieses waren MarA, SoxS und Rob. Entsprechende Mutanten mit *knockout*-Mutationen in jeweils einem der Gene *marA*, *soxS* und *rob* standen für *E. coli* in der „Keio Collection“ zur Verfügung (Baba et al. 2006). Hintergrund für dieses Experiment war die Fragestellung, ob die heterologe *ramA*-Überexpression und der damit verbundene MDR-Effekt in *E. coli* durch eine direkte Interaktion von RamA mit der DNA, oder über einen Kaskadeneffekt zustande kommt. Bei einem solchen Kaskadeneffekt könnte RamA die Expression oder die Aktivität eines anderen AcrAB-TolC – Regulators der AcrAB-TolC Effluxpumpe beeinflussen, der dann letztlich zu einem MDR-Effekt führt.

Um eine Abhängigkeit des MDR-Effektes bei *ramA*-Überexpression von TolC-abhängigen Effluxpumpen zu prüfen, wurde die Untersuchung mit dem $\Delta tolC$ *knockout*-Stamm *E. coli* R7 durchgeführt. Dieser war in der Arbeitsgruppe im Rahmen der Promotionsarbeit von Frau Katja Carstens aus einem *E. coli* C600 Stamm erstellt worden. Alle *knockout*-Mutanten sowie die

III. Ergebnisse

Wildtyp-Ausgangsstämme wurden mit den Plasmiden pHPAR19-01.3 bzw. pHPAR19-01.1 transformiert und anschließend die MHK für die Antibiotika Ciprofloxacin und Tetracyclin bestimmt, auch unter Einfluss des Effluxinhibitors PA β N.

Wie in den Ergebnissen in **Tabelle III-15** zu sehen ist, wurde durch die heterologe *ramA*-Überexpression auch in den *knockout*-Mutanten $\Delta marA$, $\Delta soxS$ und Δrob ein effluxabhängiger MDR-Phänotyp induziert, was unter Einsatz des EPIs nicht der Fall war. Weiter ist zu sehen, dass im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* C600 in der $\Delta tolC$ -Mutante R7 unter gleichen Bedingungen kein MDR-Phänotyp induzierbar war.

Tabelle III-15: Ergebnisse der MHK-Bestimmung in verschiedenen *E. coli* Mutanten. Die Stämme wurden mit dem *ramA*-Überexpressionsplasmid pHPAR19-01.3 (*ramA*-Überexpr.) bzw. dem Kontrollplasmid ohne *ramA* pHPAR19-01.1 (Kontrolle) transformiert. MHKs wurden im Mikro-Bouillon-Dilutionsverfahren bestimmt. [K]: Stamm der Keio collection (Baba et al. 2006), EPI: Effluxpumpeninhibitor PA β N, wurde in 1/8 MHK des jeweiligen Stammes eingesetzt.

<i>E. coli</i> Stamm	Mutation	<i>ramA</i> -Überexpr. (pHPAR19-01.3)		Kontrolle (pHPAR19-01.1)	<i>ramA</i> -Überexpr. (pHPAR19-01.3)		Kontrolle (pHPAR19-01.1)
		CIP	+EPI	CIP	TET	+EPI	TET
BW25113 [K]	-	0,064	0,008	0,008	8,0	1,00	1,00
JW5249-1 [K]	$\Delta marA$	0,064	0,008	0,008	4,0	2,00	1,00
JW4359-1 [K]	Δrob	0,064	0,004	0,008	4,0	1,00	1,00
JW4023-5 [K]	$\Delta soxS$	0,032	0,004	0,008	4,0	1,00	1,00
C600	-	0,032	0,016	0,008	4,0	2,00	1,00
R7	$\Delta tolC$	0,002	0,001	0,002	0,3	0,13	0,25

Weiter wurde geprüft ob sich ein MDR-Phänotyp in *E. coli* und *C. freundii* durch die gleichzeitige Überexpression von *ramA* und *marA* noch verstärken ließe. Dazu wurde die MHK für Ciprofloxacin und Tetracyclin bestimmt bei gleichzeitiger Anwesenheit von Natriumsalicylat in einer Endkonzentration von 580 μ g/mL. Dieses Salz interagiert mit MarR, dem lokalen Repressor von *marA*. MarR wird daraufhin inaktiviert, was wiederum zu einer verstärkten Bildung von MarA und zu einem MDR-Phänotyp in *E. coli* führt (R G Martin and Rosner 1995; Cohen et al. 1993). Verglichen wurden jeweils die Wildtyp-Stämme *E. coli* BW25113 (GK4052, WT-Keio-Collection) und *C. freundii* (GK100), die *E. coli* $\Delta marA$ Mutante JW5249-1 der Keio Collection (GK4064), als Kontrollstamm für die Salicylat-Induktion, und eine *C. freundii* $\Delta ramR$ Mutante (GK3839). Diese wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von Franziska Kühn (geb. Pott) mittels gezielter Mutagenese erzeugt (Pott 2011) und weist eine *ramA*-Überexpression sowie einen MDR-

III. Ergebnisse

Phänotyp auf. Für jeden Stamm wurde der Zustand unter *ramA*-Überexpression (mit Plasmid pHPAR19-01.3) mit der Kontrollvariante (mit Plasmid pHPAR19-01.1) und den Ausgangsstämmen ohne Plasmid verglichen. Für den Stamm GK3839 wurde die MHK ausschließlich ohne Plasmid bestimmt, da dieser konstruktionsbedingt eine Chloramphenicolresistenz trug.

Die Ergebnisse sind in **Abbildung III-40** dargestellt. Sie zeigen, dass sich allein durch die Zugabe von Salicylat eine erhöhte MHK in *E. coli* GK4052 (WT-Keio-Collection) und *C. freundii* GK100 (WT) induzieren ließ (B, B +Sal). In *E. coli* WT waren die MHK-Werte für CIP und TET jeweils zweifach erhöht. In dem *C. freundii* Stamm waren die Werte für CIP und TET noch stärker erhöht um Faktor acht bzw. vier. Dieses konnte in dem *E. coli* Kontrollstamm mit der $\Delta marA$ Mutation nicht beobachtet werden, was die Abhängigkeit des Effektes von den *marRAB*-Genen bestätigte.

Der Vergleich der MHK-Werte bei *ramA*-Überexpression (A) mit denen bei Salicylat-Zugabe ohne *ramA*-Überexpression (B +Sal) zeigt, dass der *C. freundii* Stamm etwas stärker auf das Salicylat reagierte als der *E. coli* Stamm. Weiter waren bei gleichzeitiger *ramA*-Überexpression und Salicylat-Zugabe die MHK-Werte für *C. freundii* GK100 höher als bei *ramA*-Überexpression bzw. Salicylat-Zugabe allein. Hier war also ein additiver Effekt zu beobachten. Diese Beobachtung konnte für den *E. coli* Stamm nicht gemacht werden. Auch in der *C. freundii* $\Delta ramR$ Mutante GK3839 war eine Steigerung der MHK-Werte bei Salicylat-Zugabe zu beobachten, was zeigt, dass die Salicylat-Induktion in *C. freundii* nicht *ramR*-abhängig war.

III. Ergebnisse

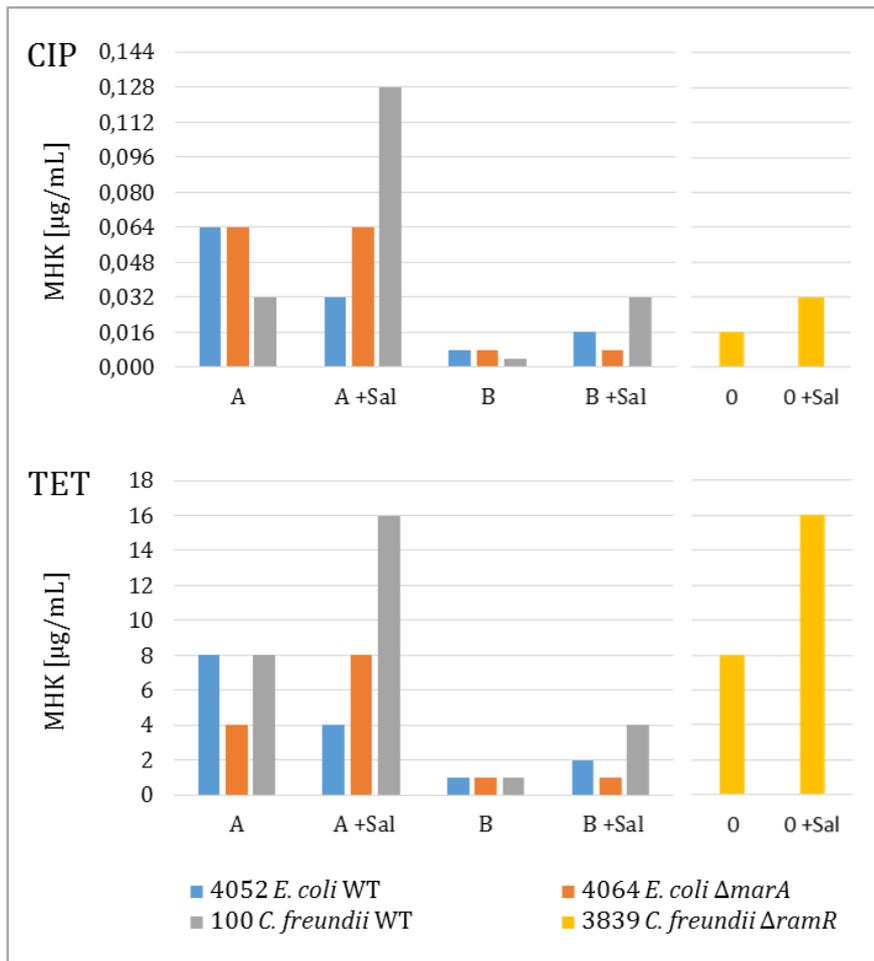


Abbildung III-40: Ergebnisse der MHK-Bestimmung bei *ramA*-Überexpression sowie durch Salicylat induzierter *marA*-Überexpression in *Escherichia coli* und *Citrobacter freundii*. Verglichen wurden die Wildtyp-(WT) Stämme *E. coli* GK4052 (WT-Keio-Collection) und *C. freundii* GK100 sowie die Mutanten *E. coli* $\Delta marA$ GK4064 und *C. freundii* $\Delta ramR$ (GK3839). Die Stämme GK4052 und GK4064 entsprechen den Stämmen BW25113 und JW5249-1 der Keio collection (Baba et al. 2006). Salicylat wurde als Natriumsalz in einer Endkonzentration von 580 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingesetzt. A: Stämme mit *ramA*-Überexpressionsplasmid pHPAR19-01.3, B: Stämme mit Kontrollplasmid pHPAR19-01.1, O: kein Plasmid.

IV. Diskussion

IV.1 Zur Speziesidentifikation im Genus *Citrobacter*

Grundlegend für die Beschreibung und Charakterisierung der *ramRA*-Gene war eine sichere Identifikation der verwendeten *Citrobacter* Stämme auf Speziesebene. Die hier analysierten Stämme hatten vor Beginn dieser Arbeit eine erste routinemäßige Spezieszuweisung erhalten, die auf einer biochemischen Charakterisierung basierte. Um diese für die nachfolgenden Untersuchungen zu prüfen, wurden die Stämme mit drei verschiedenen Methoden charakterisiert: über ihr biochemisches Profil (siehe II.2.1.5), über ihren massenspektrometrischen Fingerprint, der ribosomalen Proteine (siehe II.2.1.6) und über DNA-Sequenzanalysen ausgewählter Gene. Die Ergebnisse sind unter III.1.1 aufgeführt.

Hierbei wurden die zuvor bestehenden Speziesidentifikationen der Stämme *C. freundii* GK100, *C. farmeri* GK2519, *C. werkmanii* GK708 und *C. rodentium* GK1253 bestätigt. Die Stämme GK1189 und GK2552 wurden neu den Spezies *C. koseri* bzw. *C. sedlakii* zugewiesen, was die Notwendigkeit einer genauen Prüfung routinemäßiger Speziesidentifikation für spezielle Fragestellungen deutlich machte.

Bei den Untersuchungen wurden auch die Grenzen der jeweiligen Methoden aufgezeigt. Die Aussagekraft dieser Methoden wird im Folgenden kurz beleuchtet und mit aktuellen Publikationen abgeglichen.

IV.1.1 Prüfung einzelner Methoden zur Speziesidentifikation

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, dass die jeweiligen Methoden allein häufig nicht ausreichen, um eine sichere Speziesbestimmung zu gewährleisten. So führte die biochemische Charakterisierung mit Ausnahme des Stammes GK2519 bei allen anderen Stämmen nicht zu einer eindeutigen Spezieszuweisung (siehe **Tabelle III-4**). Dieses war jedoch durchaus zu erwarten, da Variationen im Reaktionsverhalten zwischen verschiedenen Stämmen der selben Art bekannt sind (Brenner et al. 1999, siehe **Tabelle III-3**).

Die massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF lieferte für alle Stämme eindeutige Ergebnisse. Da diese jedoch auf dem Abgleich mit einer begrenzten Referenzdatenbank beruhte, in der nicht alle *Citrobacter* Spezies vertreten waren, ist das Ergebnis dieser Methode für eine genaue Speziesbestimmung durch weitere Methoden zu prüfen. Erst zum Ende dieser Arbeit wurde eine umfangreiche Studie veröffentlicht, in der 152 *Citrobacter* Isolate mittels MALDI-TOF und biochemischen Reaktionsprofilen vergleichend charakterisiert wurden (Kolínská et al. 2015). Die Methode wurde als valide, sowie schneller und genauer als die biochemische

Charakterisierung befunden, wenngleich auch nicht alle der 11 bis dato anerkannten *Citrobacter* Spezies in der Untersuchung vertreten waren. Es bleibt abzuwarten, ab wann die bei dieser Studie erzeugten Messspektren als Referenzdaten für die Speziesidentifikation im Routineprozess in den kommerziellen MALDI-TOF Messsystemen zur Verfügung stehen werden. Im Allgemeinen bleiben valide Referenzdatenbanken weiterhin von entscheidender Bedeutung für eine sichere Speziesidentifikation mittels MALDI-TOF (Schaumann et al. 2013).

Eine eindeutige Speziesbestimmung von *Citrobacter* Isolaten mittels DNA-Sequenzabgleich wurde ebenfalls zum Ende dieser Arbeit erstmals veröffentlicht (Clermont et al. 2015). Es wurden in einem MLST (*multy locus sequence typing*) Ansatz die *house keeping* Gene *rpoB*, *fusA*, *pyrG* und *leuS* partiell analysiert und mit den biochemischen Reaktionsprofilen der jeweiligen Stämme abgeglichen. Die Methode wurde ebenfalls als valide befunden und bildete alle 11 bis dato beschriebenen *Citrobacter* Spezies ab. Weiter wurde mit *C. pasteurii* eine neue Spezies beschrieben, deren Stämme sich in der Charakterisierung deutlich von den übrigen Spezies abhoben.

Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte DNA-Sequenzvergleich von *gyrA* und *gyrB*, beides ebenfalls *house keeping* Gene, die in ähnlichen Untersuchungen an anderen Enterobakterienspezies bereits verwendet wurden (Fukushima, Kakinuma, and Kawaguchi 2002; Dauga 2002; Delmas et al. 2006) führte lediglich in den Stämmen GK100 und GK1189 zu einer eindeutigen Identifikation. So spiegelten sich hohe Sequenzübereinstimmungen für *gyrA* z. T. nicht in *gyrB* wider und umgekehrt. Weiter wurden die Stämme GK1253, GK2519 und GK2552 deutlich abweichend von der Identifikation mittels biochemischer und massenspektrometrischer Charakterisierung bestimmt. Dieses macht deutlich, dass weitere umfangreichere Analysen notwendig sind, um zu prüfen, ob die Sequenzhomologien in *gyrA* und *gyrB* die Verwandtschaftsbeziehungen in einem größeren Referenzstammkollektiv für eine Speziesidentifizierung geeignet wiedergeben. Prinzipiell wurden *gyrA* und *gyrB* in dieser Arbeit als dafür geeignet eingestuft, da sie ausreichend stark konserviert sind, um in allen Isolaten amplifiziert werden zu können, gleichzeitig aber auch noch variabel genug sind, um Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies darzustellen.

Dieses ist für das 16S rRNA-Gen nicht der Fall. So wurden hier 100 %ige Sequenzübereinstimmungen auch zwischen verschiedenen Spezies der für jede *Citrobacter* Spezies zur Verfügung stehenden Referenzsequenzen festgestellt (*C. amalonaticus* und *C. farmeri*, *C. murlinae* und *C. braakii*, *C. freundii* und *C. braakii*, *C. murlinae* und *C. werkmanii*). Die prozentuale Sequenzübereinstimmung im paarweisen Vergleich der 16S-rRNA Sequenzen ist in **Tabelle IV-1** gezeigt. Der Abgleich der 16S rRNA-Sequenzen wurde bereits vorher als ungeeignet zur Speziesidentifikation in *Citrobacter* eingestuft (Delmas et al. 2006; Kolínská et al. 2015). Daher

IV. Diskussion

erstaunt es umso mehr, dass sich Ko et al. (2015) bei der Beschreibung einer weiteren neuen *Citrobacter* Spezies, *C. bitternis*, isoliert aus Vögeln (Dommeln, engl. *bitterns*), vor allem auf Ergebnisse von 16S rRNA-Sequenzanalysen stützen.

Tabelle IV-1: Prozentuale Übereinstimmung publizierter DNA-Sequenzen der 16S-rRNA Gene in den verschiedenen *Citrobacter* Spezies im paarweisen Vergleich. Die Stämme sind in **Tabelle IV-2** mit der jeweiligen NCBI Acc.nr. aufgeführt.

Stamm ID	Cit02	Cit01	Cit03	Cit04	Cit05	Cit06	Cit07	Cit08	Cit09	Cit10	Cit11
Cit02	100	98	97	96	98	98	98	96	96	99	96
Cit01		100	97	97	98	98	98	97	97	98	96
Cit03			100	100	97	97	98	99	100	97	99
Cit04				100	97	97	98	99	99	96	99
Cit05					100	100	98	97	97	98	97
Cit06						100	98	97	97	99	97
Cit07							100	98	98	98	98
Cit08								100	100	97	99
Cit09									100	97	99
Cit10										100	97
Cit11											100

Tabelle IV-2: *Citrobacter* Stämme des paarweisen Sequenzvergleiches der 16S-rRNA Sequenzen mit Angabe der jeweiligen NCBI Acc.nr..

Stamm-ID	Stamm	NCBI Acc.nr.
Cit01	<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	CP000822.1, Region 93795..95336
Cit02	<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	FN543502.1, Region 3934001..3935542
Cit03	<i>Citrobacter braakii</i> 167	NR_028687.1
Cit04	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	NR_028894.1
Cit05	<i>Citrobacter amalonaticus</i> CECT 863	NR_104823.1
Cit06	<i>Citrobacter farmeri</i> CDC 2991-81	NR_024861.1
Cit07	<i>Citrobacter youngae</i> GTC 1314	NR_041527.1
Cit08	<i>Citrobacter werkmanii</i> CDC 0876-58	NR_024862.1
Cit09	<i>Citrobacter murlinae</i> CDC 2970-59	NR_028688.1
Cit10	<i>Citrobacter sedlakii</i> I-75	NR_028686.1
Cit11	<i>Citrobacter gillenii</i> CDC 4693-86	NR_041697.1

IV.1.2 Zur Speziesbestimmung und -abgrenzung im Genus *Citrobacter*

Die in der vorliegenden Arbeit berücksichtigten 11 Spezies der Gattung *Citrobacter* wurden bei ihrer Beschreibung basierend auf der Methode der DNA-Hybridisierung voneinander abgegrenzt (Brenner et al. 1993; Schauer et al. 1995; Brenner et al. 1999). Dabei wurde als Schwellenwert eine prozentuale Verwandtschaft von 70 % definiert. Da diese Methode zu komplex für ein Routinelabor im klinischen Bereich ist, wurden die zur Beschreibung der Arten verwendeten

Stämme auch biochemisch charakterisiert (Brenner et al. 1999). Die Spezies waren auch durch diese Methode voneinander abgrenzbar, jedoch zeigte sich, dass Stämme derselben Spezies z. T. deutliche Variationen in ihren Reaktionsprofilen aufwiesen (insbesondere *C. freundii*, siehe **Tabelle III-3**). Derartige Variationen waren auch bei der DNA-Hybridisierung zu beobachten. So wiesen bei den Untersuchungen die Stämme der Spezies *C. braakii* durchschnittlich lediglich 71 % Übereinstimmung zum deklarierten Typstamm auf. Dieser Wert wurde im paarweisen Vergleich unterschiedlicher Spezies sogar überschritten (z. B. 73 % Übereinstimmung zwischen *C. amalonaticus* 3314-73 und *C. farmeri* CDC 2991-81, siehe Brenner et al. 1993).

Dieses zeigt, dass die Einteilung und Abgrenzung der *Citrobacter* Spezies im erheblichen Maße von der verwendeten Methode und den dabei festgelegten Grenzwerten abhängig ist. Deshalb sollten Speziesbeschreibungen möglichst mit einer validierten Methode durchgeführt werden, um gleiche Bedingungen für alle Stämme zu schaffen. Weiter sollte die Methode routinetauglich sein, um neue Isolate auch in der klinischen Anwendung sicher bestimmen zu können. Von einer solchen Harmonisierung ist man heute durch die Fülle der unterschiedlichen zur Verfügung stehenden Methoden sowie deren sehr verschiedenen Aufwand/Kosten-Verhältnisse noch entfernt. Angesichts der raschen Entwicklung der Methode der Genomsequenzierung und der damit verbundenen Aufwands- und Kostenminimierung könnten sich MLST-Analysen als Standardmethode durchsetzen. Allgemein wirft die Problematik der Speziesabgrenzung und -identifikation die Frage nach der Sinnhaftigkeit einer weiteren Speziesbeschreibung im Genus *Citrobacter* auf. Letztlich entscheidet bei jeder Einteilung ein durch den Menschen gesetzter methodenabhängiger Schwellenwert für oder gegen eine Abgrenzung einer zumeist kleinen Zahl bekannter Isolate. Bei neu isolierten *Citrobacter* Stämmen mit Abweichungen zu den bisher beschriebenen Spezies sollte geprüft und begründet werden, ob die Notwendigkeit besteht diese durch eine gesonderte Speziesbenennung direkt ansprechen zu können und ob sich eine Abgrenzung stützen lässt.

IV.2 Analyse des *ramRA*-Operons im Genus *Citrobacter* im Vergleich zu anderen Spezies

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Bestimmung und Analyse der DNA-Sequenz des *ramRA*-Operons in verschiedenen Spezies der Gattung *Citrobacter*. Aus der Sequenzinformation ergaben sich weitere Fragestellungen nach der DNA-Sequenzvariabilität und der sich daraus ergebenden Aminosäuresequenzvariabilität, sowie nach der Verbreitung, der Topologie und der Genomposition des *ramRA*-Operons im Genus *Citrobacter* im Vergleich zu anderen Spezies. Die Beschreibung der Gene für diese Gattung war insofern von besonderem Interesse, da das *ramRA*-

Operon im Zusammenhang mit der Ausbildung einer multiplen Antibiotikaresistenz bislang erst in einer verhältnismäßig kleinen Gruppe von Spezies der Gattungen *Klebsiella*, *Salmonella* und *Enterobacter* ausführlich beschrieben und publiziert worden ist (George, Hall, and Stokes 1995; Yassien et al. 2002; Chollet et al. 2004).

Um die Variabilität des *ramRA*-Operon im Genus *Citrobacter* untersuchen zu können, wurde ein Sequenzkollektiv erstellt, welches mit *C. koseri*, *C. rodentium*, *C. freundii*, *C. farmeri*, *C. sedlakii* und *C. werkmanii* verschiedene *Citrobacter*-Arten umfasste. In dieser Arbeit wurde dazu das *ramRA*-Operon in den Stämmen *Citrobacter farmeri* GK2519, *C. sedlakii* GK2552 und *C. werkmanii* GK708 vollständig sequenziert. Für die übrigen genannten Spezies lagen bereits publizierte Sequenzinformationen z.T. aus Genomsequenzierung vor: *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (GB-Acc.nr: CP000822, Region: 2395300..2400500), *Citrobacter rodentium* ICC168 (GB-Acc.nr.: FN543502, Region 631700..635000) und *Citrobacter freundii* GK100 (GB-Acc.nr.: JF802197.1) (Pott 2011).

Für den gattungsübergreifenden Sequenzvergleich im *ramRA*-Operon wurde ein Kollektiv von Referenzsequenzen zusammengestellt, welches in den Datenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) publizierte Sequenzen umfasste. Dazu wurde das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) verwendet (Altschul et al. 1990), womit nach homologen Bereichen in sämtlichen hinterlegten Sequenzen gesucht wurde. Für die Suche wurden die Operonsequenzen der *Citrobacter* Stämme *C. farmeri* GK2519, *C. sedlakii* GK2552 und *C. werkmanii* GK708 verwendet. Aus den erhaltenen Treffern wurde dem Referenzsequenzkollektiv für jede Spezies mindestens eine Sequenz zugefügt. Dieses waren hier ausschließlich Genomsequenzen. Die *ramRA*-homologen ORFs der Sequenzbereiche wurden aligniert und auf Deletionen hin untersucht. Sequenzen, in denen die entsprechenden Leserahmen im Vergleich zu anderen Sequenzen derselben Spezies deutlich verschoben waren (stamm- aber nicht speziesspezifische Deletionen), wurden nicht in das Referenzkollektiv aufgenommen, um möglichst nur ORFs intakter Gene darin abzubilden. Das Kollektiv der Referenzsequenzen ist unter Nennung der Spezies und den jeweiligen Genomsequenzbereichen in **Tabelle IV-3** aufgelistet. Es stellt den Stand der Verbreitung der *ramRA*-Gene zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit auf Speziesebene dar. Alle folgenden Sequenzanalysen wurden mit den Programmen des Software-Paketes *Vector NTI* in der Version 11.5 durchgeführt. Die Translation der DNA-Sequenzen in die jeweiligen Aminosäuresequenzen sowie alle gezeigten Alignments, Diagramme zur lokalen Sequenzähnlichkeit und Operondarstellungen wurden ebenfalls im Programm *Vector NTI* Version 11.5 durchgeführt.

IV. Diskussion

Tabelle IV-3: Referenzsequenzkollektiv für die Homologieanalyse im *ramRA*-Operon. Alle Sequenzen stammen aus den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI). Die angegebenen Regionen entsprechen der Position des *ramRA*-Operons sowie Bereiche der *downstream*- und *upstream*-Umgebung. Weiter ist angegeben, ob ein *romA*-Homolog im jeweiligen Sequenzbereich enthalten war (+) oder nicht (-).

ID	Stamm	NCBI Acc.nr.	Region im Genom		<i>romA</i>
			von	bis	
Cit01	<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	CP000822.1	2395300	2400500	+
Cit02	<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	FN543502.1	631700	635000	-
Cro01	<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894	CP000783.1	884500	889200	-
Cro02	<i>Cronobacter turicensis</i> z3032	FN543093.2	3059800	3062200	-
Ent01	<i>Enterobacter aerogenes</i> EA1509E	FO203355.1	2563200	2566500	+
Ent02	<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190	CP002824.1	2894000	2898000	+
Ent03	<i>Enterobacter cloacae</i> EcWSU1	CP002886	1120300	1124500	+
Ent04	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047	CP001918.1	3217500	3220800	+
Ent05	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ENHKU01	CP003737.1	1241726	1244548	+
Kle01	<i>Klebsiella oxytoca</i> E718	CP003683.1	1620000	1625000	+
Kle02	<i>Klebsiella oxytoca</i> KCTC 1686	CP003218.1	2945687	2950426	+
Kle04	<i>Klebsiella pneumoniae</i> CG43	NC_022566	616400	620500	+
Kle05	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2242	CP002910	1177700	1184700	+
Kle06	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> NTUH-K2044 DNA	AP006725.1	1429800	1432800	+
Kle07	<i>Klebsiella variicola</i> At-22	CP001891.1	4019400	4022400	+
Rao01	<i>Raoultella ornithinolytica</i> B6	CP004142.1	2695132	2696932	+
Sal01	<i>Salmonella bongori</i> NCTC 12419	FR877557.1	552200	554500	-
Sal02	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Paratyphi A</i> str. ATCC 9150	CP000026.1	2242800	2244800	-
Sal03	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> str. CT18	AL513382.1	621800	623800	-
Sal04	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> Ty2	AE014613.1	2357200	2359400	-
Sal05	<i>Salmonella Typhimurium</i> LT2	NC_003197	637000	640900	-
Shm01	<i>Shimwellia blattae</i> DSM 4481 = NBRC 105725	CP001560.1	1740500	1743300	-

IV.2.1 Analyse der *ramRA*-Operontopologie im Genus *Citrobacter*

Die Topologie der Gene des *ramRA*-Operons in den sechs *Citrobacter*-Stämmen ist in **Abbildung IV-1** dargestellt. In **Tabelle IV-4** sind die Längen der ORFs vergleichend gegenübergestellt. Die Stämme *C. farmeri* GK2519 und *C. sedlakii* GK2552 wiesen eine Überlappung des 3'-Endes des ORFs von *romA* mit dem 5'-Ende des ORFs von *ramA* auf. Die ORFs für *romA* und *ramA* besaßen in allen untersuchten Spezies ein verschiedenes Leseraster. Der ORF für *romA* war somit im Gegensatz zu den anderen in seiner Länge weniger stark konserviert als die der Gene *ramR* und *ramA*. Die unterschiedliche Lokalisation des Stoppcodons lässt vermuten, dass die 11 C-terminalen Aminosäuren keine wichtige Rolle für die Funktion von RomA spielen, wobei dieses

IV. Diskussion

nicht überprüft werden konnte, da die Funktion von RomA bislang unbekannt ist. Weiterhin wies *C. sedlakii* GK2552 einen um sechs Basenpaare verlängerten ORF für *romA* auf (siehe III.1.2). Auch hier ist es möglich, dass die C-terminalen Aminosäuren keine bedeutende Rolle für die Funktionalität spielen. Dieses könnte geprüft werden, indem man z. B. *romA* dieses Stammes künstlich unter Einführen eines Stoppkodons um die DNA-Basen verkürzt, die für die sechs zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren kodieren. Diese Variante sowie die Wildtyp-Variante könnten dann überexprimiert und die Auswirkung auf die Ausprägung eines MDR-Phänotypes untersucht werden, wie es in dieser Arbeit für *C. freundii* GK100 gezeigt worden ist.

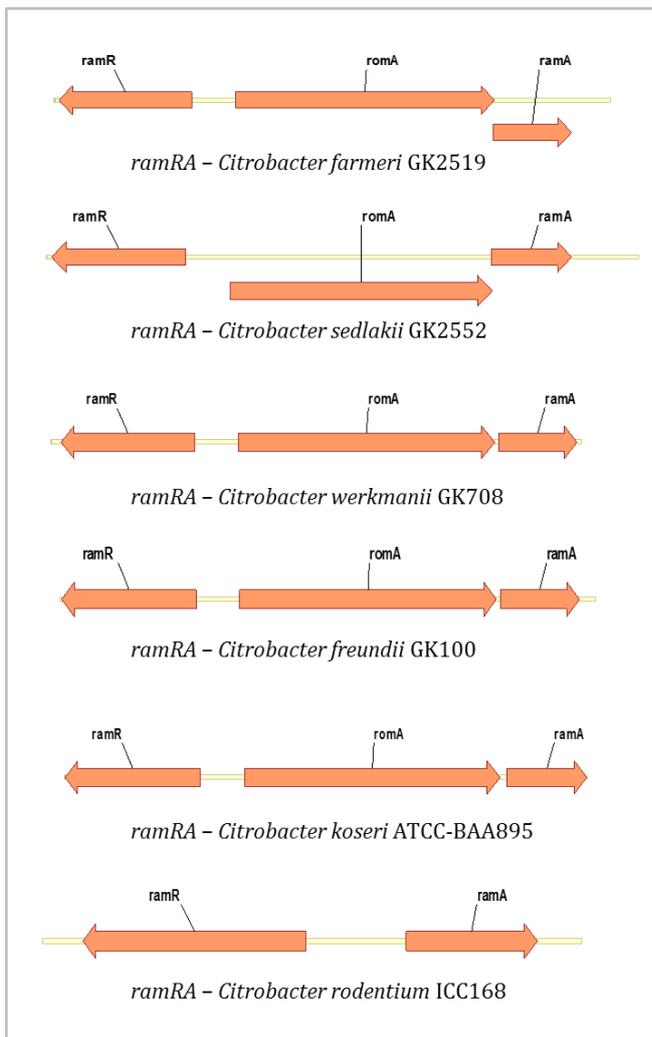


Abbildung IV-1: Übersicht der Topologie der *ramR*-, *romA*- und *ramA*-homologen Gene in den untersuchten *Citrobacter*-Stämmen.

IV. Diskussion

Tabelle IV-4: Gegenüberstellung der Längen der ORFs von *ramR*-, *romA*- und *ramA*-homologen Genen sowie die des gesamten Operons (vom 3'-Ende des *ramR*-Gens bis zum 3'-Ende des *ramA*-Gens) in den untersuchten *Citrobacter* Stämmen. Von den Spezies *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* und *Salmonella enterica* serovar Paratyphi, für die *ramRA*-Gensequenzen bereits beschrieben worden sind (George, Hall, and Stokes 1995; Chollet et al. 2004; Yassien et al. 2002), ist jeweils ein Stamm aufgeführt. In Klammern sind die Abkürzungen der Bezeichnung für die entsprechenden Stämme im Kollektiv der Referenzsequenzen angegeben (siehe **Tabelle IV-3**).

Spezies	ORF [bp]			Operon
	<i>ramR</i>	<i>romA</i>	<i>ramA</i>	
<i>C. farmeri</i> GK2519	582	1134	342	2246
<i>C. sedlakii</i> GK2552	582	1134	348	2249
<i>C. werkmanii</i> GK708	582	1113	342	2244
<i>C. freundii</i> GK100	582	1113	342	2243
<i>C. koseri</i> ATCC BAA895 (Cit01)	582	1098	342	2244
<i>C. rodentium</i> ICC168 (Cit02)	582	-	342	1185
<i>K. pneumoniae</i> (Kle05)	582	1101	342	2249
<i>E. aerogenes</i> (Ent02)	582	1125	342	2245
<i>S. Paratyphi</i> A (Sal02)	582	-	342	1212

Die Operontopologie des Stammes *C. rodentium* ICC168 unterschied sich deutlich von den übrigen *Citrobacter* Stämmen durch einen stark verkürzten *ramR-ramA* intergenischen Bereich und das Fehlen eines ORFs für *romA* (siehe III.1.3). Eine verkürzte Operonstruktur ohne ORF für *romA* ist bekannt bei *Salmonella* (Yassien et al. 2002). Diese Topologie wurde hier auch in den publizierten Sequenzen der Stämme *Shimwellia blattae* DSM 4481 (Shm01) sowie der beiden *Cronobacter*-Stämme (Cro01 und Cro02) des Referenzkollektives festgestellt. Dieser Befund lässt weiter die Frage nach der möglichen Funktion des Genprodukts von *romA* offen und deutet darauf hin, dass *romA* für die Funktion der Gene *ramR* und *ramA* zumindest im Zusammenhang mit der Ausprägung einer multiplen Antibiotikaresistenz keine tragende Rolle spielt.

IV.2.2 Homologievergleich der Gene des *ramRA*-Operons

Um der Fragestellung nachzugehen, ob sich die *ramRA*-Gene der *Citrobacter* Spezies von denen anderer Gattungen unterscheiden und ob sie Besonderheiten aufweisen, wurden die DNA-Sequenzen des gesamten Operons sowie die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der drei *ramRA*-Gene auf konservierte Bereiche geprüft und mit dem Referenzsequenzkollektiv verglichen.

Die DNA-Sequenzhomologie im gesamten *ramRA*-Operon ist für die *Citrobacter*-Stämme *C. farmeri* GK2519, *C. sedlakii* GK2552, *C. werkmanii* GK708, *C. koseri* (Cit01), *C. rodentium* (Cit02) und *C. freundii* GK100 in **Abbildung IV-2** dargestellt. Sie gibt die prozentuale Übereinstimmung

IV. Diskussion

der Basen an jeder Position im DNA-Alignment an (lokale Sequenzidentität). Das vollständige Alignment ist im Anhang unter VIII.1.2.3 aufgeführt. Die Abbildung spiegelt die Lage der ORFs der Gene *ramR*, *romA* und *ramA* wider. Im Vergleich der drei ORFs im Operon wies der des Genes *ramA* die geringste Variabilität auf. Es wird deutlich, dass bei der Spezies *C. rodentium* (Cit02) der ORF des Genes *romA* nicht im Operon enthalten ist. Auffallend für diese Spezies ist ein kurzes Fragment des *ramR-ramA* intergenischen Bereiches, der im Alignment isoliert vorlag und von großen nicht-homologen Bereichen umgeben war. An dieser Stelle zeigten sich Homologien zu einem kurzen Teilbereich von *romA*, der eine durch Rosenblum et al. (2011) postulierte zweite Promotorregion von *ramA* enthielt. Eine weitergehende Analyse dieses Bereiches ist unter IV.2.2.5 beschrieben.

Der Bereich *upstream* von *ramR* war bei allen Spezies hoch konserviert. Im Detail betrachtet war der 5'-Bereich sowie der unmittelbare 5'-*upstream* Bereich (-15 bis +55 bp) von *ramR* sehr stark konserviert. Der weiter entfernte 5'-*upstream* Bereich wies einen zu 100 % identischen Sequenzabschnitt auf (-113 bis -139 bp bei *Citrobacter farmeri* GK2519). Dieser war homolog zu der durch Baucheron et al. (2012) beschriebenen RamR-Bindestelle für die sich unter IV.2.2.5 eine detailliertere Auswertung findet.

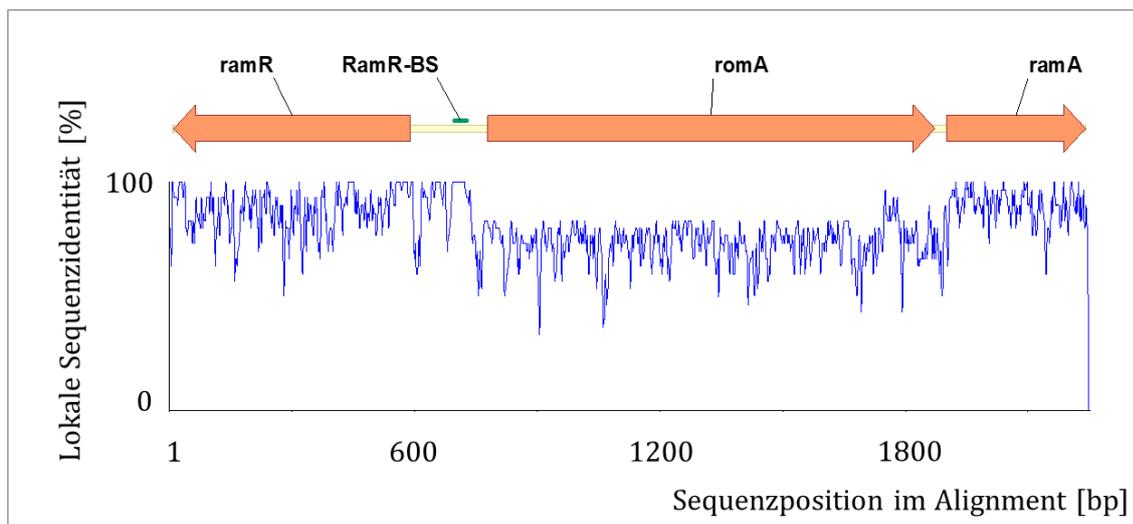


Abbildung IV-2: Lokale Sequenzidentität im *ramRA*-Operon der untersuchten *Citrobacter*-Stämme. Die DNA-Sequenzen der Stämme *C. farmeri* GK2519, *C. sedlakii* GK2552, *C. werkmanii* GK708, *C. koseri* ATCC-BAA895 (Cit01, NCBI Acc.nr.: CP000822.1), *C. rodentium* ICC168 (Cit02, NCBI Acc.nr.: FN543502.1) und *C. freundii* GK100 (Pott 2011) wurden mit der Software Vector NTI AlignX aligniert und dabei automatisiert die prozentuale Übereinstimmung jeder Basenposition berechnet.

IV.2.2.1 Analyse der Sequenzvariation in RamA

Wie oben festgestellt, war die Variabilität der DNA-Sequenzen im ORF für *ramA* sehr gering. Dieses bestätigte sich auch beim Vergleich der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Wie

IV. Diskussion

der Vergleich der prozentualen Ähnlichkeit (Anteil der Sequenzpositionen im Alignment, die mit der gleichen oder einer strukturell ähnlichen Aminosäure besetzt sind) in **Tabelle IV-5** zeigt, war eine maximale Abweichung von 4 % zu beobachten. Weiter war eine 100 %ige Übereinstimmung auch zwischen unterschiedlichen Spezies selbst von verschiedenen Gattungen zu beobachten. Dementsprechend fanden sich im Diagramm der lokalen Sequenzähnlichkeit (Darstellung der prozentualen Ähnlichkeit an jeder Position des Alignments) (**Abbildung IV-3**) keine Regionen mit erhöhter Variabilität. Diese hohe Konservierung des nur 113 as langen Proteins RamA lässt darauf schließen, dass es eine wichtige Funktion erfüllt und dementsprechend einem hohen Selektionsdruck ausgesetzt ist. Die Sequenzen der *Citrobacter* Stämme wiesen keine auffälligen Besonderheiten auf im Vergleich zu *Klebsiella*, *Enterobacter* oder *Salmonella*.

Tabelle IV-5: Prozentuale Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von RamA für die paarweise verglichenen Stämme. Die Translation aus den DNA-Sequenzen sowie die Alignierung und die Berechnung der Sequenzübereinstimmung erfolgten mittels der *Vector NTI* Software (siehe II.2.4.1).

Anteil identischer oder ähnlicher Aminosäurepositionen in RamA [%]									
Stamm	Cit01	Cit02	GK2552	GK2519	Ent02	Kle05	GK100	GK708	Sal02
<i>C. koseri</i> (Cit01)	100	98	99	97	97	98	99	99	98
<i>C. rodentium</i> (Cit02)		100	99	99	99	100	99	99	96
<i>C. sedlakii</i> GK2552			100	98	98	99	100	100	97
<i>C. farmeri</i> GK2519				100	98	99	98	98	96
<i>E. aerogenes</i> (Ent02)					100	99	98	98	96
<i>K. pneumoniae</i> (Kle05)						100	99	99	96
<i>C. freundii</i> GK100							100	100	97
<i>C. werkmanii</i> GK708								100	97
<i>S. Paratyphi A</i> (Sal02)									100

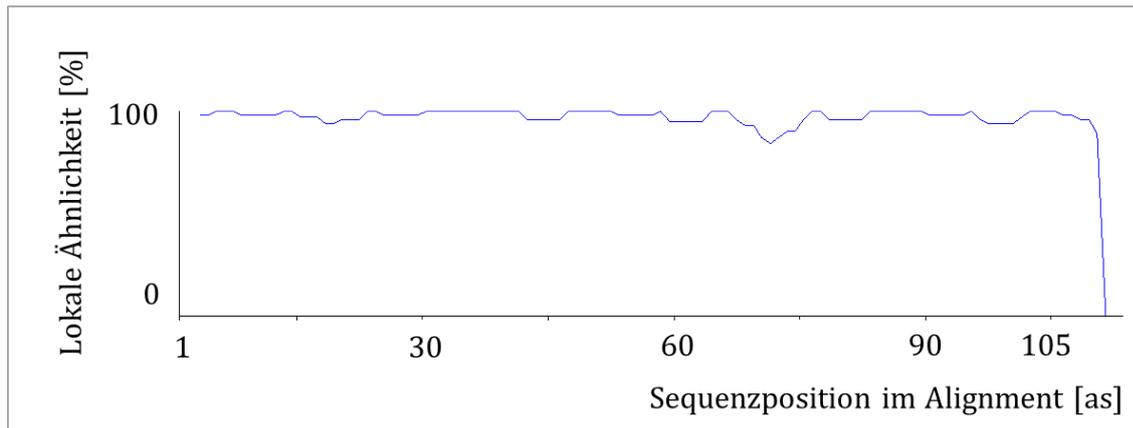


Abbildung IV-3: Lokale Ähnlichkeit der abgeleiteten RamA-Aminosäuresequenzen der in **Tabelle IV-5** aufgeführten Spezies. Die Translation aus den DNA-Sequenzen sowie die Alignierung und der Ähnlichkeitssvergleich erfolgten automatisiert mittels der Vector NTI Software.

IV.2.2.2 Analyse der Sequenzvariation in RamR

Im Vergleich zu RamA wiesen die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von RamR eine deutlich höhere Variabilität in denselben Spezies auf (siehe **Tabelle IV-6**). Die Sequenzen der *Citrobacter* Spezies unterschieden sich hier insbesondere von den untersuchten Stämmen der Spezies *Enterobacter aerogenes* (Ent02) und *Klebsiella pneumoniae* (Kle05), deren Sequenzpositionen zu maximal 79 % mit denen der *Citrobacter* Spezies übereinstimmten, bzw. durch strukturell ähnliche Aminosäuren besetzt waren. Dagegen zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zu der Sequenz von *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A (Sal02).

IV. Diskussion

Tabelle IV-6: Prozentuale Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von RamR für die paarweise verglichenen Stämme. Die Translation aus den DNA-Sequenzen sowie die Alignierung und die Berechnung der Sequenzübereinstimmung erfolgten mittels der *Vector NTI* Software (siehe II.2.4.1).

Stamm	Anteil identischer oder ähnlicher Aminosäurepositionen in RamR [%]								
	Cit01	GK100	GK708	Ent02	Kle05	Sal02	GK2519	Cit02	GK2552
<i>C. koseri</i> (Cit01)	100	93	94	76	76	91	94	92	91
<i>C. freundii</i> GK100		100	99	77	77	90	91	90	90
<i>C. werkmanii</i> GK708			100	77	77	90	92	90	90
<i>E. aerogenes</i> (Ent02)				100	98	77	78	79	77
<i>K. pneumoniae</i> (Kle05)					100	77	78	79	77
<i>S. Paratyphi A</i> (Sal02)						100	92	91	89
<i>C. farmeri</i> GK2519							100	94	92
<i>C. rodentium</i> (Cit02)								100	94
<i>C. sedlakii</i> GK2552									100

Für das Protein RamR aus *Salmonella enterica* wurde von Yamasaki et al. 2013 eine 3D-Struktur veröffentlicht, die auf einer kristallografischen Analyse basiert. Somit war für den Vergleich der lokalen Sequenzähnlichkeit auch ein direkter Vergleich mit den Strukturelementen des RamR-Proteins möglich. Es wurden dabei auch die beschriebenen Interaktionspunkte des RamR-Proteins mit den Bindungspartnern Berberin, Kristallviolett, Dequalinium, Ethidiumbromid und Rhodamin 6G berücksichtigt (Yamasaki et al. 2013). Das Ergebnis des Vergleiches ist in **Abbildung IV-4** dargestellt. In dieser ist schematisch ein Monomer des als Homodimer aktiven RamR-Proteins abgebildet. Sie zeigt, dass insbesondere die N-terminale DNA-Bindedomäne mit den Helices $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$ hochkonserviert ist. In allen analysierten Spezies stimmte die Anomalie des Startcodons, CAC anstatt ATG, kodierend für Valin anstatt Methionin, zu 100 % überein.

Im Kernbereich des Proteins war die Aminosäuresequenz dagegen weniger stark speziesübergreifend konserviert und besonders variabel in den Randbereichen der Strukturelemente bzw. zwischen den Helices $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$. Dennoch ist die Lage der Helices durch eine höhere Homologie in den zentralen Helixbereichen im Verlauf der Ähnlichkeitswertkurve zu erkennen. Die Helices $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$ bilden zusammen mit den Helices $\alpha 8$ und $\alpha 9$ eine Tasche, in der die genannten Substanzen bei der Kristallisierung lokalisiert worden waren (Yamasaki et al. 2013). Die Interaktionspunkte der verschiedenen Bindungssubstrate erstrecken sich über die zentralen und C-terminalen Bereiche des Proteins. Von den markierten Aminosäuren, die an einer direkten Interaktion mit den Substanzen beteiligt sind, waren im

IV. Diskussion

Alignment lediglich die Positionen L130, D152 und W185 zu 100 % identisch.

Die breite Verteilung der Interaktionspunkte und die Tatsache, dass je nach Substanz z. T. andere Aminosäuren in Wechselwirkung mit den Bindungspartnern traten, sowie das breite Substratspektrum der strukturell sehr verschiedenen Substanzen, sprechen für eine relativ unspezifische Interaktion. Auch der hier durchgeführte Sequenzvergleich unterstützt diese Vermutung, da er keine stringente Konservierung der beteiligten Aminosäuren aufzeigt. Offensichtlich unterliegt die *ramR* Sequenz einem deutlich geringeren Selektionsdruck als die von *ramA*. Vermutlich bietet diese Variabilität ein Potential zur Veränderung und evolutiven Anpassung für die verschiedenen Stämme und Spezies in ihren jeweiligen Habitaten.

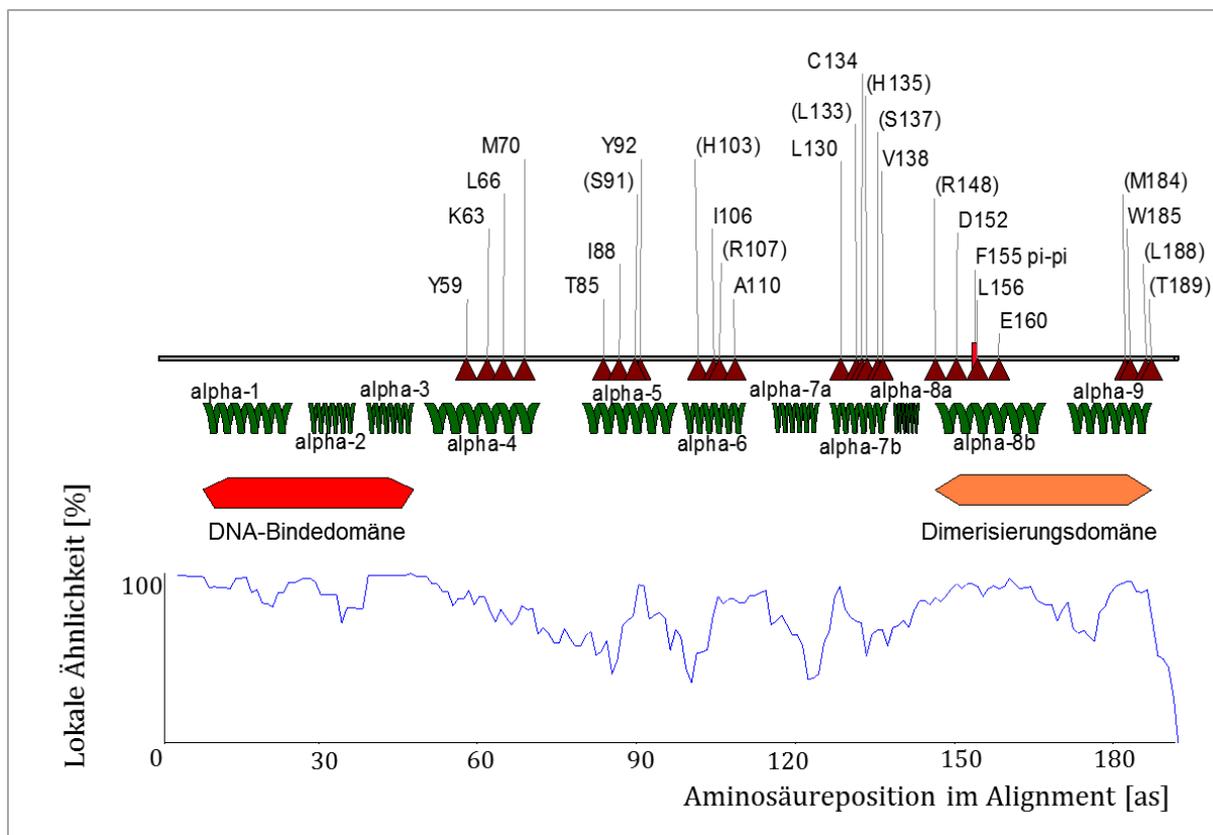


Abbildung IV-4: Vergleich der Aminosäuresequenzen des Proteins RamR zwischen den untersuchten *Citrobacter* Spezies und dem Referenzsequenzkollektiv (siehe **Tabelle IV-3**) mit den Strukturelementen der durch Yamasaki et al. (2013) publizierte Kristallstruktur. Angegeben ist der prozentuale Anteil identischer Aminosäuren an jeder Position des Alignments. Aminosäuren, die mit den Substanzen Berberin, Kristallviolett, Dequalinium, Ethidiumbromid und Rhodamin 6G in den jeweiligen Kristallen interagierten, sind durch Dreiecke markiert. Die Aminosäure Phenylalanin F155 befand sich als einzige in einer apolaren Region, in der π - π -Elektronenwechselwirkung (pi-pi) vorhanden sind und ist rot markiert. Aminosäuren in Klammern interagieren nur mit maximal drei der fünf Substanzen, die übrigen mit mindestens vier.

IV.2.2.3 Analyse der Sequenzvariation in RomA

Über das *romA*-Gen ist im Vergleich zu den anderen Genen des *ramRA*-Operons am wenigsten bekannt (siehe I.4.2.4). So weiß man bis heute nicht, ob das *romA* überhaupt für ein Protein kodiert. Die Homologieanalysen auf DNA- und Aminosäureebene haben gezeigt, dass die Sequenz des Gens und ebenso der Leserahmen konserviert ist. Lediglich die Position des Stopcodons variierte in den Analysen um bis zu 36 bp (Vergleich mit **Tabelle IV-4**).

In **Tabelle IV-7** ist gezeigt, dass die Aminosäuresequenzen gattungsübergreifend stärker konserviert sind als die von RamR, wobei die Sequenzen mit durchschnittlich 366 as deutlich länger sind als die von RamR (194 as). Der Selektionsdruck auf diese Gensequenz ist hier demnach größer und die Dichte der funktions- bzw. strukturelevanten Nuklein- oder Aminosäuren möglicherweise höher. Die Verteilung der lokalen Sequenzähnlichkeit in **Abbildung IV-5** zeigt, dass die N-terminalen sowie C-terminalen Bereiche weniger stark konserviert sind als die zentralen Bereiche. Weiter folgen die Bereiche hoher Sequenzähnlichkeit blockweise aufeinander, was auf eine Kodierung von mehreren Strukturelementen wie α -Helices oder β -Faltblätter hinweist. Die BLASTP-Analyse sowie die Suche nach konservierten Domänen in der NCBI Conserved Domain Database (CDD, www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/) zeigte für Teilbereiche von RomA eine Homologie zur Beta-Lactamase-Superfamilien-Domäne auf (NCBI CCD-ID: pfam12706).

Die Bedeutung des ORFs *romA* bleibt weiter ungeklärt. Eine Aufklärung der Funktion könnte eine Überexpression des Genes bringen. Dabei würde zunächst die Auswirkung auf die Antibiotikaresistenz geprüft werden, um zu testen, ob sich ein ähnlicher Effekt ergibt, wie für RamA. Weiter könnte eine gesamtheitliche Untersuchung des Phänotyps Hinweise auf eine mögliche Funktion geben, wenn sich beispielsweise die Zellform deutlich verändert. Ebenso wäre es möglich zu untersuchen, ob die Überexpression von *romA* einen Einfluss auf die Expression von *ramA* hat. Diese könnte zunächst in einem *real time* RT-PCR Experiment vergleichend quantifiziert werden. Auch ist es denkbar beide Gene, *ramA* und *romA*, überzuexprimieren und den Effekt auf die Antibiotikaresistenz zu analysieren. Sollte der Effekt beispielsweise schwächer ausfallen als bei der alleinigen Überexpression von *ramA*, wäre es denkbar, dass *romA* die Expressionsrate von *ramA* beeinflusst.

IV. Diskussion

Tabelle IV-7: Prozentuale Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von RomA für die verglichenen Stämme. Die Translation aus den DNA-Sequenzen sowie die Alignierung und der Ähnlichkeitsvergleich erfolgten automatisiert mittels der *Vector NTI* Software.

Spezies	Anteil identischer oder ähnlicher Aminosäurepositionen in RomA [%]						
	Cit01	Ent02	Kle05	GK100	GK708	GK2519	GK2552
<i>C. koseri</i> (Cit01)	100	90	90	92	94	94	94
<i>E. aerogenes</i> (Ent02)		100	95	89	90	88	88
<i>K. pneumoniae</i> (Kle05)			100	88	89	90	88
<i>C. freundii</i> GK100				100	95	91	90
<i>C. werkmanii</i> GK708					100	93	91
<i>C. farmeri</i> GK2519						100	94
<i>C. sedlakii</i> GK2552							100

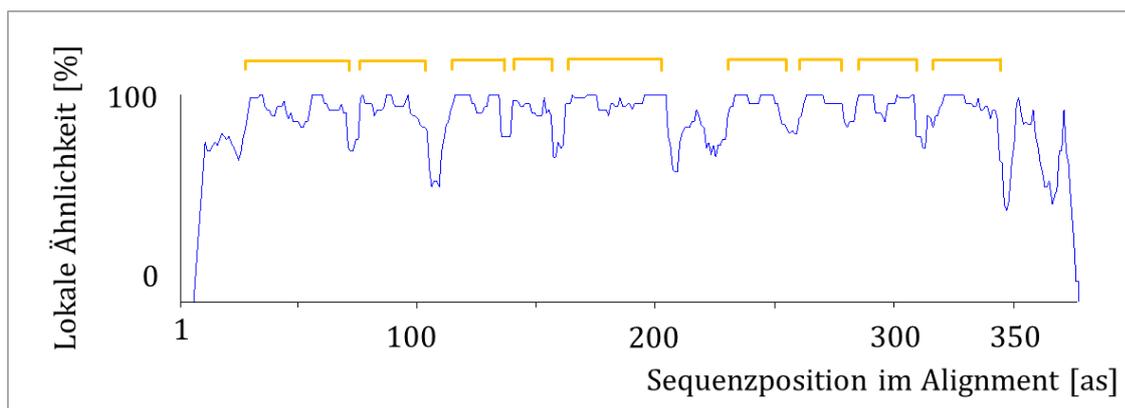


Abbildung IV-5: Lokale Ähnlichkeit der abgeleiteten RomA-Aminosäuresequenzen der in **Tabelle IV-5** aufgeführten Spezies. Die Translation aus den DNA-Sequenzen sowie die Alignierung und der Ähnlichkeitsvergleich erfolgten automatisiert mit Hilfe der *Vector NTI* Software. Zusammenhängende Sequenzbereiche mit einer hohen Übereinstimmung (Hinweis auf Strukturelemente), sind gelb markiert.

IV.2.2.4 Analyse des *ramR-ramA* intergenischen Bereiches in Spezies ohne *romA*-Gen

Wie oben beschrieben, wiesen die Stämme der Gattungen *Salmonella*, *Cronobacter*, *Shimwellia* und der Spezies *Citrobacter rodentium* keinen ORF für *romA* auf. Um eine Homologie der verkürzten intergenischen Bereiche zu prüfen, wurden die Operonsequenzen aligniert und ebenfalls die lokale Sequenzidentität untersucht. Diese ist in **Abbildung IV-6** dargestellt und zeigt eine auffällig niedrige Sequenzübereinstimmung in Teilbereichen des *ramR-ramA* intergenischen Bereichs an. Die ORFs der Gene *ramR* und *ramA* werden auch hier widergespiegelt. Der

angegebene Sequenzstammbaum wurde mit der Neighbor Joining Methode (Saitou and Nei 1987) im Programm *Vector NTI* erstellt und zeigt, dass die *ramRA*-Operonsequenz von *C. rodentium* ICC168 (Cit02) eine deutlich höhere Sequenzübereinstimmung zu den *Salmonella* Stämmen aufwies als zu den übrigen *romA*-negativen Stämmen. Der Vergleich mit dem Stammbaum der *ramRA*-DNA-Sequenzen aller Stämme des Sequenzkollektives in **Abbildung IV-9** zeigt, dass sämtliche *Citrobacter* und *Salmonella* Sequenzen eine sehr hohe Homologie aufwiesen, während die *Cronobacter* und *Shimwellia* Sequenzen deutlich weniger nah verwandt waren. Trotz der gleichen Operontopologie ist somit keine Abstammungsgleichheit der *ramRA*-Sequenzen in den Spezies ohne *romA* zu vermuten. Vielmehr scheint es sich hierbei um einen analogen Verlust von *romA* zu handeln, da die *Salmonella* Sequenzen eine monophyletische Gruppe innerhalb der *Citrobacter* Sequenzen bildeten und sich mit den *Cronobacter* und *Shimwellia* Sequenzen paraphyletisch anordneten.

Der intergenische Bereich von *C. rodentium* weist in weiten Teilen keine Homologie zu allen anderen Spezies auf. Lediglich zwei kurze Sequenzabschnitte einer Länge von 47 bp und 57 bp wiesen Homologien zum 3'-Bereich von *romA* bzw. zum 5'-upstream Bereich von *ramA* auf (siehe **Abbildung IV-8**). Beide Abschnitte sind im Alignment durch eine Lücke von 55 bp voneinander getrennt. Weiter liegen in *C. rodentium* keinerlei Homologien zum 5'-Bereich von *romA* der anderen Spezies vor. Eine BLAST-Analyse der kurzen Sequenzabschnitte in den NCBI-Datenbanken ergab keine signifikanten Treffer. Es ist möglich, dass die zu den übrigen Spezies homologen Sequenzabschnitte in *C. rodentium* im Alignment eine Restsequenz darstellt, die nach einem Deletionsprozess bestehen blieb.

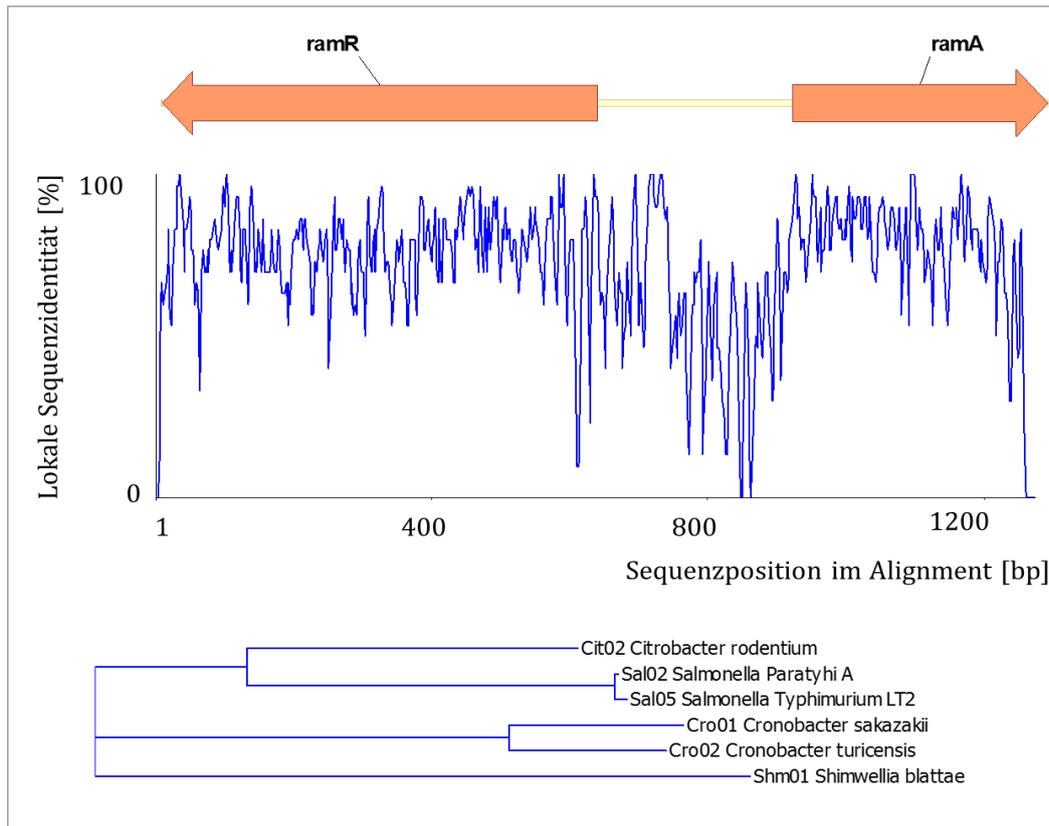


Abbildung IV-6: Lokale Sequenzidentität im *ramRA*-Operon *romA*-negativer Stämme des Sequenzkollektives. Die DNA-Sequenzen des *ramRA*-Operons der Stämme *Citrobacter rodentium* ICC168 (Cit02, NCBI Acc.nr.: FN543502.1), *Cronobacter sakazakii* ATCC BAA-894 (Cro01, NCBI Acc.nr.: CP000783.1), *Cronobacter turicensis* z3032 (Cro02, NCBI Acc.nr.: FN543093.2), *Shimwellia blattae* DSM 4481 (Shm01, NCBI Acc.nr.: CP001560.1), *Salmonella enterica* Paratyphi A ATCC9150 (Sal02, NCBI Acc.nr.: CP000026.1) und *Salmonella enterica* Typhimurium LT2 (Sal05, NCBI Acc.nr.: NC_003197) wurden mit der Software *Vector NTI AlignX* aligniert und dabei die prozentuale Übereinstimmung jeder Basenposition berechnet sowie ein Stammbaum erstellt. Dieser wurde mit der Neighbor Joining Methode (Saitou and Nei 1987) erstellt.

IV.2.2.5 Analyse der Variation in regulatorischen Bereichen im *ramRA*-Operon

Die Bindestelle des lokalen Transkriptionsregulators RamR im Promotorbereich von *ramA* wurde durch Baucheron et al. (2012) detailliert beschrieben (siehe I.4.2.4). Diese zeichnet sich durch eine exakt invers repetitive Sequenz von sieben Basenpaaren aus (*inverted repeat*, IR), welche durch drei Basenpaare getrennt voneinander sind. Ein Teil des IR überlappt mit der TATA-Box in der -10-Region des *pramA*-Promotors (hier als TATAAT Motiv ausgeprägt).

Im Vergleich der IR-Sequenzen der hier untersuchten *Citrobacter* Stämme mit denen der Stämme des Referenzkollektives zeigte sich, dass diese in allen Spezies zu 100 % identisch sind (siehe **Abbildung IV-7**). Weiter ist das RamR-Bindemotiv über die IR-Sequenz hinaus hochkonserviert, was auch die angrenzende TATA-Box umfasst und ebenso die im *pramA*-Promotor weiter *upstream* gelegene -35-Region. Dieses ist auch bei den Spezies der Fall, welche keinen ORF für *romA* im Operon enthalten und einen deutlich verkürzten *ramR-ramA* intergenischen Bereich

IV. Diskussion

aufweisen. Die Sequenzhomologie in diesem verkürzten Bereich erstreckte sich für diese Stämme bis unmittelbar an die RamR-Bindestelle.

Sequenzvariationen wurden in der genannten TATA-Box beobachtet, die in den *Klebsiella*, *Raoultella* und *Enterobacter* Stämmen um ein Adenin zu TAATAAT (TATAAT in den übrigen Stämmen) verlängert war. Weiter unterschied sich der Sequenzbereich zwischen den IR-Sequenzen insbesondere in den *Cronobacter* Stämmen von dem der übrigen.

Ungeachtet der unter IV.2.2.2 beschriebenen Variationen in der RamR-Sequenz, der variierenden Präsenz des *romA*-ORFs sowie der weiter unten unter IV.2.2.6 analysierten Phylogenie der *ramRA*-Sequenzen in den untersuchten Spezies ist die RamR-Bindungssequenz in allen analysierten Sequenzen hoch konserviert. Dieses ist ein Hinweis darauf, dass auch der Modus der Transkriptionsregulation des *ramA*-Gens durch die Bindung des lokalen Repressors RamR an die beschriebene Bindesequenz in allen Spezies strikt konserviert ist. Dieses unterstreicht die Bedeutung des Regulators RamR für das gesamte RamA-Regulationssystem.

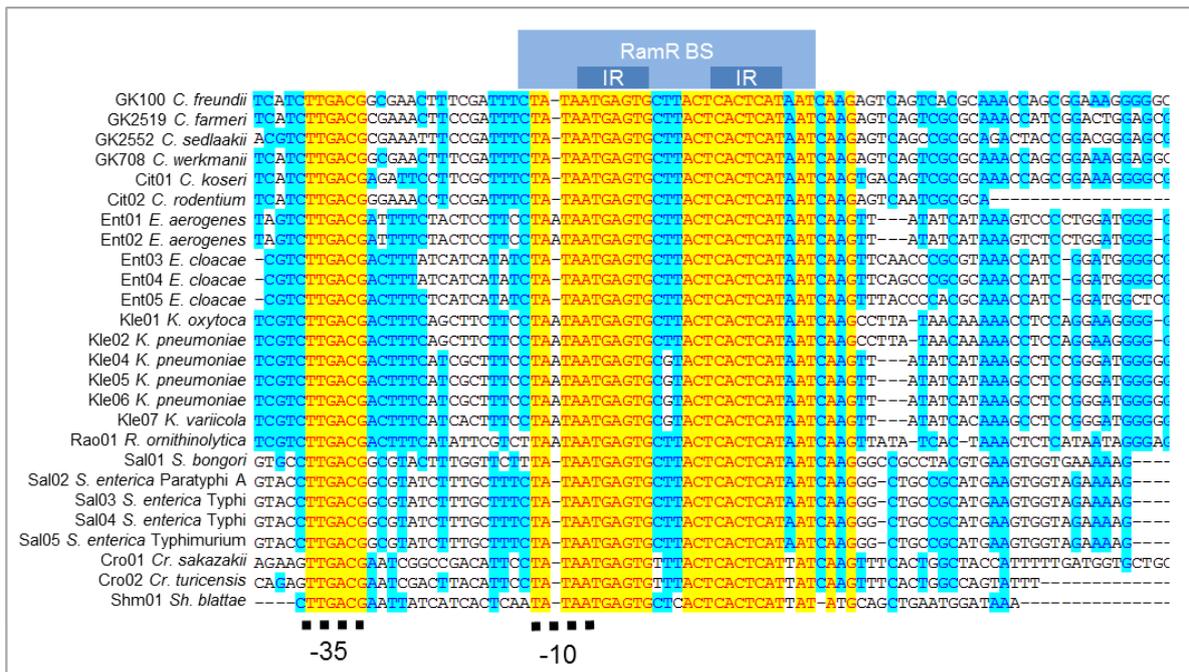


Abbildung IV-7: Multiples Alignment der *ramRA*-Sequenzen im *pramA*-Promotorbereich upstream des ORFs von *romA*. Die RamR-Bindestelle (RamR-BS) mit dem invertierten Sequenzmotiv (*inverted repeat*, IR) ist blau markiert. Die -10 bp und die -35 bp-Region des *pramA*-Promotors sind durch gepunktete Linien angezeigt. Das Alignment umfasst die Sequenzen der dieser Arbeit untersuchten *Citrobacter*-Stämme sowie die Sequenzen des Referenzkollektives (siehe **Tabelle IV-3**, C.: *Citrobacter*, Cr.: *Cronobacter*, E.: *Enterobacter*, K.: *Klebsiella*, R.: *Raoultella*, S.: *Salmonella*, Sh.: *Shimwellia*).

Weiter wurden konservierte Bereiche *upstream* von *ramA* innerhalb des ORFs für *romA* auf mögliche regulatorische Motive hin untersucht. Das entsprechende Alignment ist in **Abbildung IV-8** dargestellt. Es zeigt, dass der kodierende Bereich von *romA* in weiten Teilen hochkonserviert

ist, der Bereich von -40 bis -10 bp *upstream* von *ramA* jedoch sehr variabel. Für *Citrobacter rodentium* (Cit02) wurde hier festgestellt, dass trotz des oben beschriebenen Fehlens eines ORFs für *romA* ein Inselbereich mit hoher Homologie zu den übrigen Spezies innerhalb des *ramR-ramA* intergenischen Bereiches vorliegt (siehe **Abbildung IV-8**, umgeben von weiten Lücken im Alignment). Wie bereits oben genannt, ergab eine BLAST-Analyse keinen signifikanten Treffer für die 47 bp langen Inselsequenz, durch welchen deren Bedeutung hätte erklärt werden können.

Weiter waren für *C. rodentium* im direkten *upstream* Bereich von *ramA* (-1 bis -60 bp) Homologien zu den übrigen Spezies zu beobachten. In allen Sequenzen des Alignments war insbesondere der Bereich -13 bis -7 bp *upstream* vom Startcodon von *ramA* stark konserviert. Zu 100 % identisch waren die Basen GAG (-9 bis -7 bp). In den *Citrobacter*-Spezies waren die Basen GGAG (-10 bis -7 bp) identisch. Hier ist vermutlich die Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno Sequenz) der mRNA von *ramA* lokalisiert. Diese entspricht einer häufigen Variante der Shine-Dalgarno Sequenz (Malys 2012).

Der Bereich von -57 bis -38 bp *upstream* vom Startcodon von *ramA* stimmte in allen Spezies im Alignment, inklusive *C. rodentium*, mit der durch Chollet et al. (2004) für *Enterobacter aerogenes* vorhergesagten marbox überein. Dieses könnte ein Hinweis auf eine mögliche Autoregulation von RamA in *Citrobacter* sein. Das Alignment zeigt jedoch auch, dass diese postulierte marbox (in schwarzer Box umrandet in **Abbildung IV-8**) nicht strikt in allen Stämmen konserviert ist. In der Literatur wurden keine weiteren Hinweise auf eine definierte marbox innerhalb des *ramRA*-Operons gefunden.

Ein weiteres regulatorisches Element einer möglichen Selbstregulation wurde von Rosenblum et al. (2011) ebenfalls im *ramA upstream* Bereich postuliert. Durch Protein-DNA Bindungsstudien ist gezeigt worden, dass RamA ein DNA-Fragment im intergenischen Bereich zwischen *ramR* und *ramA* bindet. Durch Sequenzanalyse und cDNA-Sequenzierung wurde dort neben dem zuvor beschriebenen *pramA*-Promotor mit RamR-Bindestelle (Baucheron et al. 2012) ein zweiter Promotorbereich ca. 310 bp *upstream* von *ramA* vorhergesagt (PII). Dieser zeichnete sich durch das Motiv einer degenerierten invertierten Sequenzwiederholung aus. Der Abgleich dieses Motives im Alignment zeigte eine relativ starke Konservierung in diesem Bereich zwischen den analysierten Spezies an, die sich jedoch nicht von den umgebenden Bereichen abhob (siehe **Abbildung IV-8**).

Bei den Protein-DNA Bindungsstudien von Rosenblum et al. (Rosenblum et al. 2011) wurde gezeigt, dass RamA nicht an das *ramR-ramA* intergenische DNA-Fragment bindet, welches den postulierten Promotor PII nicht enthielt. Interessanter Weise enthielt das entsprechende nicht bindende DNA-Fragment jedoch die durch Chollet et al. postulierte marbox, was von den Autoren nicht angesprochen wurde. Dieses lässt vermuten, dass es zu keiner Autoregulation von RamA an

diesem entsprechenden Sequenzmotiv kommt, dessen Bedeutung fraglich ist. Ob es zu einer Interaktion an dieser Stelle durch einen anderen Transkriptionsfaktor der AraC/XylS-Familie kommt, wurde bislang nicht untersucht.

Um weitere Informationen über die *pramA*-Promotorbereiche mittels bioinformatischer Analyse zu erhalten, wurde eine BLAST Suche der Sequenz von *ramA* in den NCBI Datenbanken durchgeführt, welche Sequenzen exprimierter Gene enthalten (TSA_NT: Transcriptome Shotgun Assembly, EST: Expressed Sequence Tags, GEO: Gene Expression Omnibus, RefSeq_rna: NCBI Transcript Reference Sequences). Diese ergab jedoch keine signifikanten Treffer, sodass hier keine unterstützende Aussage über die wahrscheinliche Transkriptlänge des *ramA*-Gens sowie die Lage eines zweiten Promotors gemacht werden kann. Die gleiche Beobachtung ergab sich bei einer entsprechenden BLAST-Suche mit der *romA*-Sequenz. Somit bleibt eine Autoregulation von RamA ungeklärt. Für eine Identifizierung einer RamA-Bindungsstelle müssten RamA-DNA Bindungsstudien durchgeführt werden, bei denen entsprechende DNA-Fragmente unterschiedlicher Teilbereiche des *ramRA*-Operons untersucht werden sollten.

IV. Diskussion

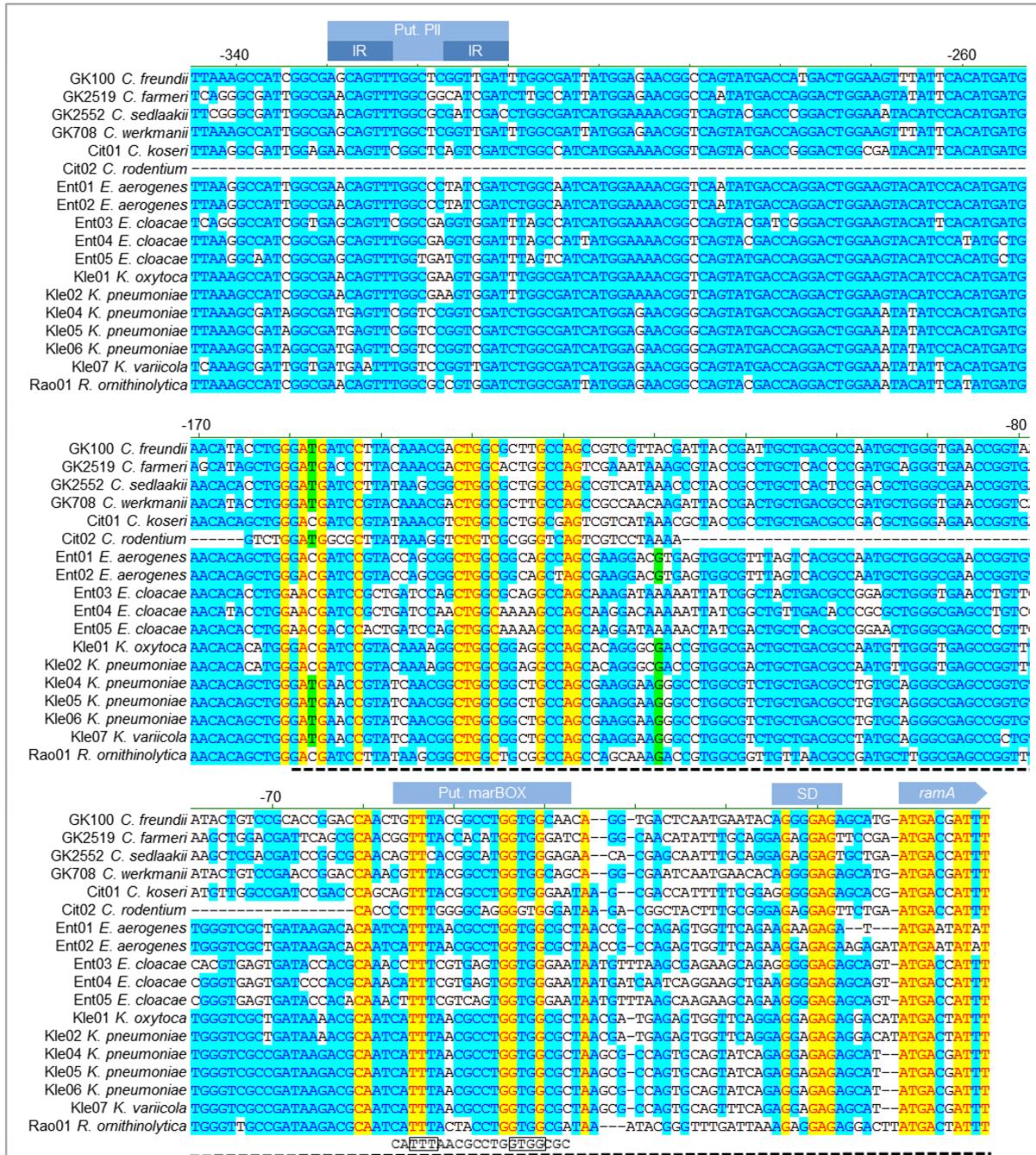


Abbildung IV-8: Alignment der DNA-Sequenzen im Bereich 5'-upstream von *ramA* der untersuchten *Citrobacter* Spezies und des Referenzkollektives. Markiert sind die degenerierte invertierte Sequenzwiederholung (*inverted repeat*, IR) in dem durch Rosenblum et al. (2011) postulierten zweiten Promotorbereich von *ramA* (PII) sowie die durch Chollet et al. (2004) postulierte marbox (aus *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048). Die Bezeichnungen der Bakterienstämme des Referenzkollektives entsprechen denen der **Tabelle IV-3** (*C.*: *Citrobacter*, *Cr.*: *Cronobacter*, *E.*: *Enterobacter*; *K.*: *Klebsiella*, *R.*: *Raoultella*, *S.*: *Salmonella*, *Sh.*: *Shimwellia*). Die gestrichelte Linie markiert den Bereich, der in den Protein-DNA Bindungsstudien publiziert durch Rosenblum et al. 2011 keine Bindung durch RamA in *K. pneumoniae* gezeigt hat (Rosenblum et al. 2011). Der ORF für *ramA* ist durch einen blauen Pfeil markiert. SD: mögliche Shine-Dalgarno Sequenz.

IV.2.2.6 Phylogenie der *ram*-Gene

Um zu prüfen, ob sich in den DNA-Sequenzen entsprechende Hinweise dafür finden ließen, ob sich das *ramRA*-Operon in den Enterobakterien horizontal ausgebreitet hat, wurde eine vergleichende Stammbaumanalyse durchgeführt. Dazu wurde ein Stammbaum für die DNA-Sequenzen des gesamten *ramRA*-Operons erstellt und mit einem Stammbaum der 16S rRNA Sequenzen derselben Stämme verglichen. Die 16S rRNA kodiert für die ribosomale RNA der 30S Untereinheit der bakteriellen Ribosomen und wird wegen ihrer besonders starken Sequenzkonservierung standardmäßig für phylogenetische Analysen eingesetzt (Case et al. 2007). Die zu prüfende Hypothese war, dass sich die beiden Stammbäume deutlich voneinander unterscheiden müssten, sofern eine horizontale Ausbreitung der *ramRA*-Gene nach der Aufspaltung der einzelnen Spezies stattfand. Bei einer Übereinstimmung wäre ein vertikaler Gentransfer anzunehmen, der von einem gemeinsamen Vorfahren ausging. Die Stammbäume wurden wie unter II.2.4.1 beschrieben mit dem Web-basierten Programmpaket *phylogeny.fr* (Dereeper et al. 2008) erstellt. Für die *Citrobacter* Stämme wurden publizierte partielle 16S-Sequenzen verwendet. Die entsprechenden NCBI Acc.nr. sind in der Darstellung der Stammbäume angegeben.

Der Vergleich beider Stammbäume (siehe **Abbildung IV-9**) zeigt, dass die *ramRA*-Sequenzen die Verwandtschaftsbeziehungen der 16S-Sequenzen und somit der Speziesgrenzen im Wesentlichen widerspiegeln. In beiden Stammbäumen bildeten die *Cronobacter* Spezies zusammen mit *Shimwellia blattae* eine Gruppe. Die *Salmonella* Spezies gruppieren nahe bzw. innerhalb der *Citrobacter* Spezies. Die Spezies der Gattungen *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Raoultella* bildeten eine gemischte Gruppe, innerhalb derer sich die *ramRA*- und 16S-Sequenzen der Spezies *Enterobacter cloacae* am stärksten von den übrigen unterscheiden. Die einzige deutliche Abweichung zwischen beiden Stammbäumen findet sich bei den Spezies *Citrobacter freundii* und *Citrobacter werkmanii*, welche im *ramRA*-Stammbaum Teil der *Citrobacter* Gruppe sind, im 16S-rRNA-Stammbaum jedoch innerhalb der *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Raoultella* Spezies gruppiert wurden. Hier ist jedoch anzuzweifeln, ob die 16S rRNA-Sequenzen tatsächlich die Verwandtschaftsbeziehungen korrekt abbildet, da beide *Citrobacter* Stämme, *Citrobacter freundii* ATCC 8090 und *Citrobacter werkmanii* CDC 0876-58, Teil des Stammkollektives sind, an dem beide Spezies mittels DNA-Hybridisierungstechnik erstmals beschrieben wurden (Brenner et al. 1993).

Somit ist anzunehmen, dass die *ramRA*-Gene bereits in den Chromosomen der hier untersuchten Spezies vertreten waren, als diese sich im Lauf der Evolution voneinander abgegrenzt haben. Die Analyse legt einen gemeinsamen Vorfahr aller Spezies nahe, der die *ramRA*-Gene bereits enthielt.

IV. Diskussion

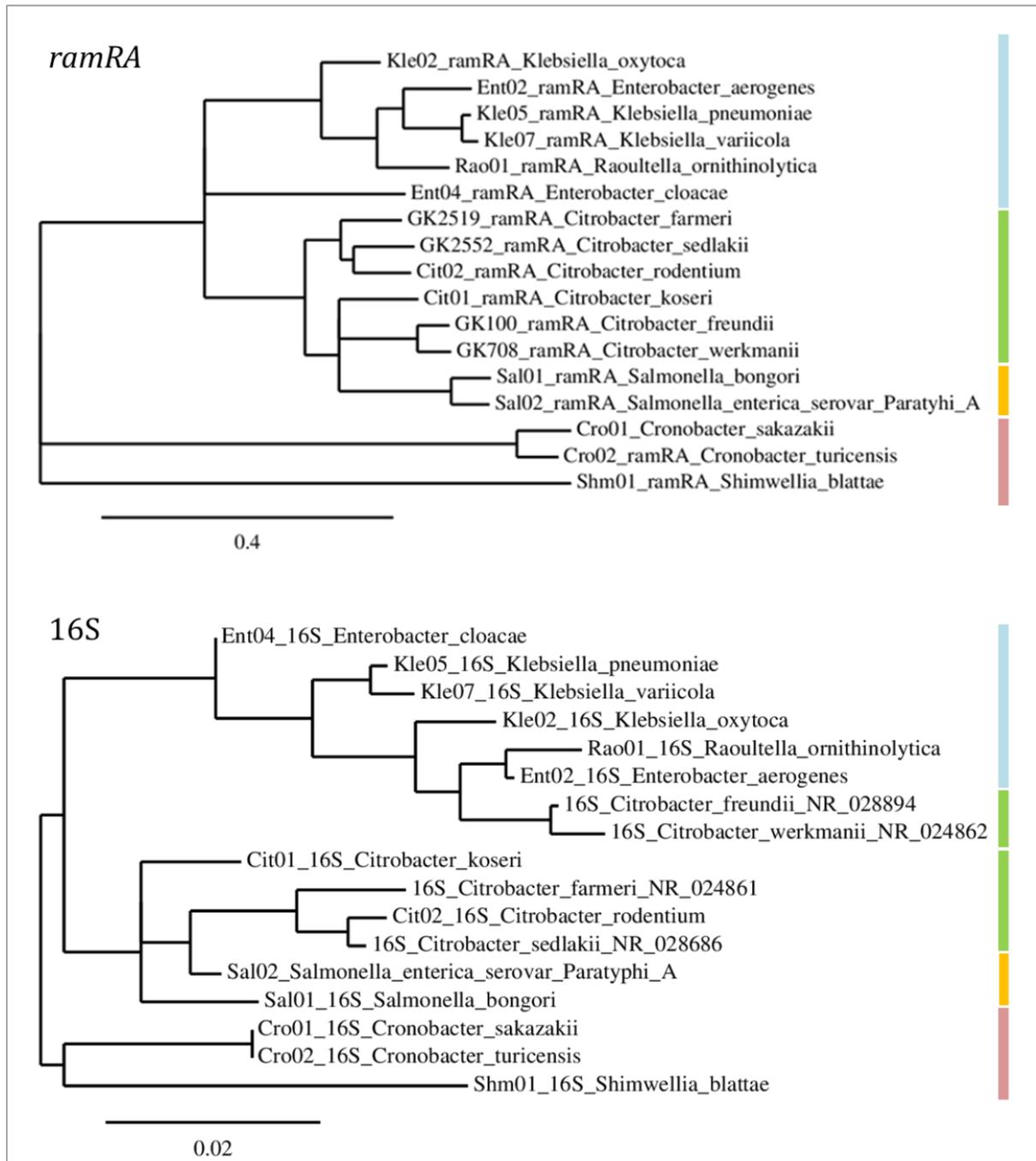


Abbildung IV-9: Stammbäume der *ramRA* und 16S rRNA-Sequenzen im Vergleich. Die Stämme entsprechen denen in **Tabelle IV-3**. Die Berechnung wurde mit dem Web-Softwarepaket *phylogeny.fr* (Dereeper et al. 2008) durchgeführt, wobei die Alignments mit MUSCLE und die Stammbäume mit PhyML erstellt wurden. Verzweigungen mit Bootstrap-Werten unter 50 % wurden aufgelöst. NCBI Acc.nr. für die 16S Sequenzen der *Citrobacter* Spezies sind jeweils nach dem Speziesnamen aufgeführt.

IV.2.2.7 Syntenie-Analyse in der Operonumgebung

Um weitere Hinweise über die Art der Verbreitung des *ramRA*-Operons zu erhalten, wurde die Region um das Gen *ramA* in verschiedenen Spezies auf Konservierung der Genreihenfolge (Syntenie) untersucht. Dafür wurden die Genome der in **Tabelle IV-3** aufgeführten Spezies des Referenzkollektives sowie eines *Citrobacter freundii* Stammes (*Citrobacter_frendii_CFN1H1*, NCBI Acc.nr.: CP007557) analysiert, welches für die vorherigen Analysen noch nicht zur Verfügung stand, da es noch nicht publiziert war. Für die Untersuchung wurden die beiden web-basierten Programme *SyntTax* (Oberto 2013) und der *Genome Synteny Analyzer* des Institut de Génétique et Microbiologie, Université Paris-Sud verwendet (II.1.12). Diese arbeiteten beide mit einem BLAST Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool), mit dem in jedem analysierten Genom Homologe zu einem vorgegebenen Gen gesucht wurden. Hierbei wurden entsprechende Homologe zum Gen *ramA* aus *Citrobacter freundii* (GK100) gesucht. Da der Algorithmus mit einem Abgleich der Aminosäuresequenzen arbeitet, wurde die DNA-Sequenz von *ramA* im Programm *Vector NTI* (siehe II.2.4) zunächst translatiert. Zwischen den verschiedenen Genomen wurden dann die Gene automatisiert auf Homologie untersucht, die das jeweilige *ramA* homologe Gen umgaben. Dabei wurde jeweils ein Bereich von 15 kB analysiert. Die Ergebnisse beider Programme wurden abgeglichen und z. T. durch Sequenzvergleiche manuell überprüft. Aus der Ergebnisdarstellung von *SyntTax* wurde eine modifizierte Abbildung erstellt (**Abbildung IV-10**). In den Ergebnissen zeigte sich, dass es in den Genomen z. T. größere Übereinstimmungen mit taxonomisch weiter entfernt eingeordneten Spezies gibt als mit solchen derselben Gattung. So wies *Klebsiella oxytoca* mehr Übereinstimmungen zu *Raoultella ornitholytica* und *Citrobacter koseri* auf als zu *Klebsiella pneumoniae*. Ebenso war zu sehen, dass die Bereiche *upstream* und *downstream* zum *ramRA*-Operon unterschiedlich stark konserviert sind. So sind die beiden direkt an *ramR* angrenzenden ORFs (gelb und hellblau) mit der Annotation *nfnB* und *ybdF* („oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase“ bzw. „hypothetical protein“ in Sal02) in allen Genomen konserviert gewesen, mit Ausnahme von *Cronobacter sakazakii* (Cro01) und *Shimwellia blattae* (Shm01). Dagegen wies der direkt an *ramA* angrenzende Bereich eine höhere Variabilität auf. In der Syntenie des *downstream* Bereiches von *ramA* zeigten sich drei Gruppierungen: **1.** Kle05 und Ent01, **2.** Kle02, Rao01 und Cit01 und **3.** *C. freundii*, Sal02 und Cit02. Es wird deutlich, dass auch die *Citrobacter* Stämme untereinander heterogen sind. Die in dieser Arbeit bearbeiteten *Citrobacter* Stämme der Spezies *C. farmeri* (GK2519) und *C. sedlakii* (GK2552) wiesen in der direkten Umgebung *downstream* von *ramA* eine Syntenie zu *C. koseri* (Cit01) auf. Somit lassen sich die *Citrobacter* Spezies *C. koseri*, *C. farmeri* und *C. sedlakii* mit Syntenie zu *Roultella ornitholytica* gruppieren. *C. freundii* weist eine umgekehrte Reihenfolge der ORFs *downstream* von *ramA* auf im Vergleich zu den genannten *Citrobacter* Spezies und zeigt somit größere Übereinstimmungen mit

Salmonella enterica (Sal02). Hier ist ein zusätzlicher ORF (CFNIH1_13005) inseriert, zu dem sich lediglich in *C. rodentium* mit dem ORF ROD_05741 eine schwache Homologie nachweisen ließ (36 % Aminosäureidentität, BLAST Hit: „GCN5 family acetyltransferase“). *C. rodentium* wies bis auf die zwei jeweils *upstream* und *downstream* an das *ramRA*-Operon angrenzenden ORFs sowie dem genannten ORF ROD_05741 keine Übereinstimmung mit den übrigen analysierten Spezies auf. Die Spezies *Cronobacter sakazaki* und *Shimwelia blattae* sind als vollständig isoliert zu betrachten und zeigten weder Übereinstimmung zueinander noch zu allen übrigen Spezies. Dieses stimmt mit den Ergebnissen der Phylogenieanalyse unter IV.2.2.6 überein.

Diese Beobachtungen lassen z. T. andere genetische Verwandtschaftsverhältnisse vermuten, als jene, die durch die reine Sequenzhomologie innerhalb des *ramRA*-Operons berechnet wurden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass auf Syntenien funktionell verschiedener Gene sehr wahrscheinlich ein geringerer Selektionsdruck lastet als auf den jeweiligen Genen selbst. Deshalb ist fraglich, ob sich Syntenien zur Verwandtschaftsanalyse in der Zukunft bewähren werden, da immer die Gefahr besteht Analogien statt Homologien zu betrachten. Deutlich wurde jedoch auch, dass die Gene *ramR* und *ramA* trotz aller Variabilität der genomischen Umgebung immer zusammen auftauchen und mit Ausnahme von *romA* auch immer im selben Abstand. Offensichtlich lastet auf der Anordnung der Gene ein hoher Selektionsdruck. Dieses ist sehr wahrscheinlich durch die starke Konservierung der RamR Bindestelle zu erklären, welche in den Promotorbereichen beider Gene, *ramA* und *ramR*, liegt und entscheidend für die Funktion des *ramRA*-Operons ist (siehe auch Homologieanalyse der RamR Bindestelle unter IV.2.2.5).

IV. Diskussion

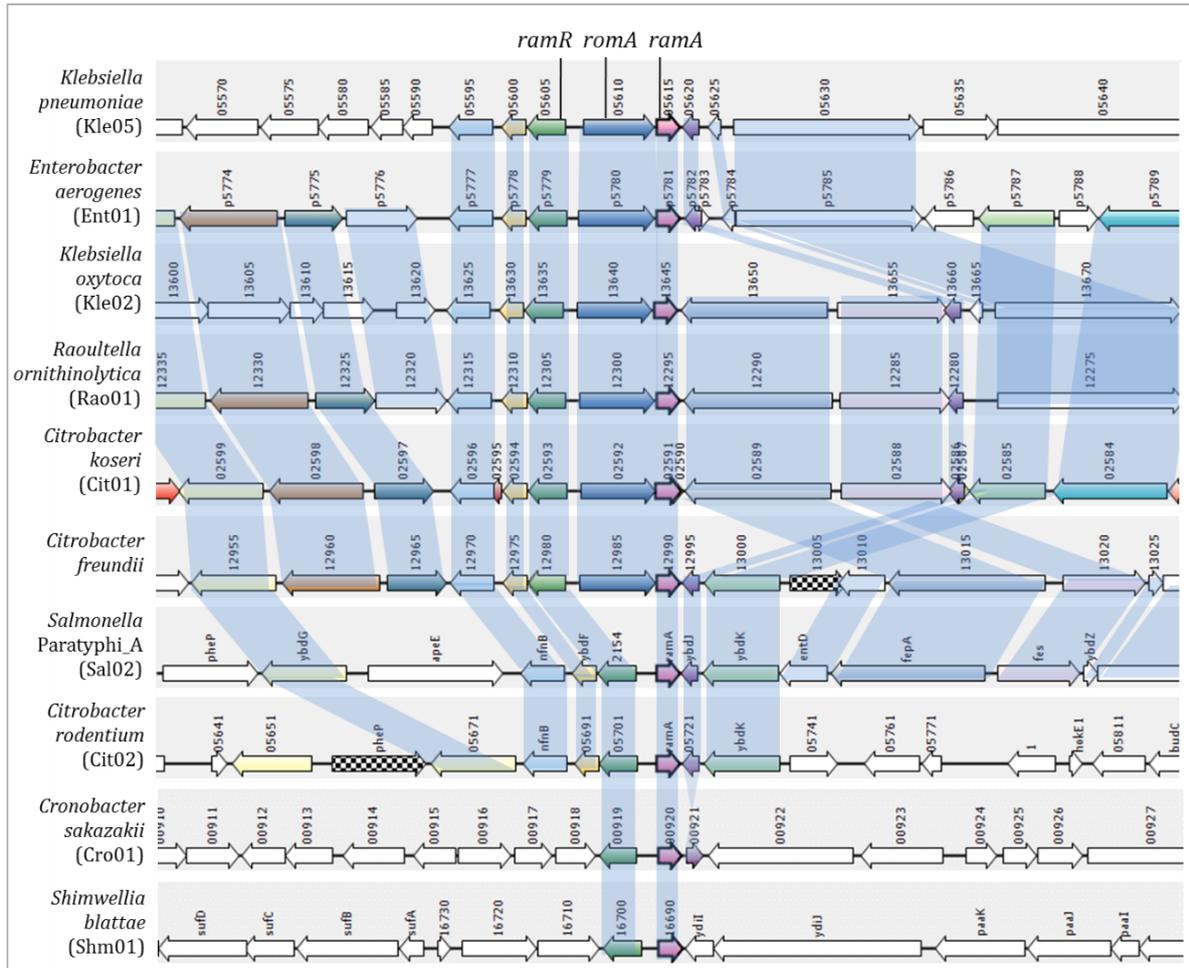


Abbildung IV-10: Syntenieanalyse im Bereich um das Gen *ramA* in den Genomen ausgewählter Spezies. Abgebildet ist ein Bereich von 15 kB um das zentrierte *ramA* Gen (pink, fett schwarz umrandet). Homologe Gene sind durch blaue Verknüpfungen markiert. Die Darstellung wurde mit dem Programm *SyntTax* erstellt und modifiziert. Die Spezies und Genome entsprechen denen des Referenzkollektives in **Tabelle IV-3**. Das Genom von *Citrobacter freundii* CFNIH1 mit der NCBI Acc.nr.: CP007557 wurde zusätzlich hinzugenommen. Die Genbezeichnungen entsprechen den Annotationen in den jeweiligen Genomen.

Desweiteren wurden hier Syntenien zu *E. coli* untersucht. Im Chromosom von *E. coli* ist kein *ramA* homologes Gen vorhanden. Es stellte sich daher die Frage, ob es hier zu einem Verlust der *ramRA*-Gene in einem konservierten Bereich gekommen ist oder ob die Genomstruktur gänzlich verschieden ist und niemals *ramA* enthielt. Dazu wurde eine entsprechende Analyse mit *SyntTax* durchgeführt bei der die Genome der *Citrobacter* Spezies mit dem von *E. coli* W3110 (NCBI Acc.nr.: NC_007779) verglichen wurden. Dabei wurde die Aminosäuresequenz des translatierten Gens *ybdF* aus *C. koseri* (Cit01) vorgegeben, welches in den zuvor untersuchten Stämmen stark konserviert war. Aus der Ergebnisdarstellung von *SyntTax* wurde eine modifizierte Abbildung erstellt (**Abbildung IV-11**).

Es zeigte sich, dass das Gen *ybdF* auch in *E. coli* in einer Umgebung mit hoher Übereinstimmung

IV. Diskussion

zu den übrigen Spezies lokalisiert war. Die ORFs der Gene *ybdK*, *ybdJ*, *ybdF* und *nfnB* folgen direkt aufeinander, während sie in den *Citrobacter* Spezies durch die *ramRA*-Gene zwischen *ybdJ* und *ybdF* unterbrochen sind. Die zuvor beobachteten ORFs *downstream* von *ramA* mit umgekehrter Reihenfolge in *C. koseri* im Vergleich zu *C. freundii* wiesen ebenfalls eine hohe Homologie zu dem Gen *fepA* (lila) in *E. coli* auf. Der weiter entfernte *downstream* Bereich von *ybdF* zeigte dagegen eine höhere Übereinstimmung mit den übrigen Spezies nur in dem Gen *ybdG* an. Die Gene *ybdK* (Glutamat-Cystein-Ligase Familie, PFAM Acc.nr.: pfam04107), *ybdJ* (Putatives Protein der inneren Membran, PFAM Acc.nr.: pfam06643), *ybdF* (Hypothetisches Protein, Yjbr Superfamilie, PFAM Acc.nr.: pfam04237) und *nfnB* (Dihydropteridin-Reductase, PFAM Acc.nr.: pfam00881) sowie ihre Reihenfolge waren in den Spezies *C. freundii*, *C. rodentium*, *S. enterica* sowie *E. coli* konserviert. Während diese Gene in *E. coli* direkt aufeinander folgen, sind sie bei den anderen Spezies zwischen *ybdJ* und *ybdF* durch die *ramRA*-Gene getrennt. Ob diese bei *E. coli* deletiert wurden oder in einer der anderen Spezies an dieser Stelle inseriert wurden und sich dann bei der Aufteilung der einzelnen Arten in der Evolution etabliert hat, kann anhand dieser Ergebnisse nicht beantwortet werden.

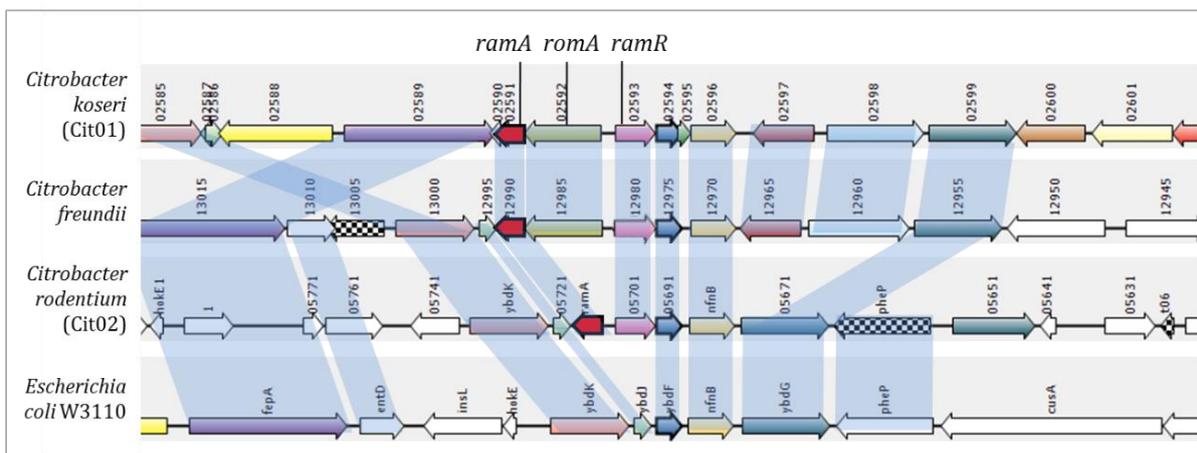


Abbildung IV-11: Syntenieanalyse im Bereich um das Gen *ramA* in den Genomen der *Citrobacter* Spezies mit dem entsprechendem Genombereich in *E. coli* W3110. Abgebildet ist ein Bereich von 15 kB um das zentrierte Gen *ybdF* (blau, fett schwarz umrandet). Homologe Gene sind durch blaue Verknüpfungen markiert. Die Darstellung wurde mit dem Programm *SyntTax* erstellt und modifiziert. Die Spezies und Genome entsprechen denen des Referenzkollektives in **Tabelle IV-3**. Das Genom von *Citrobacter freundii* CFNIH1 mit der NCBI Acc.nr.: CP007557 wurde zusätzlich hinzugenommen. Das *E. coli* W3110 Genom hat die NCBI Acc.nr. NC_007779.1. Die Genbezeichnungen entsprechen den Annotationen in den jeweiligen Genomen.

Das Ergebnis der Analyse wirft die Frage auf, ob die bestehende Taxonomie der Spezies und Gattungen die tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnisse widerspiegeln, da einzelne Stämme eine höhere Syntenie zu Vertretern einer anderen Gattung aufwiesen als zu Vertretern derselben Gattung. Bei der Analyse von Verwandtschaftsbeziehungen können lediglich Ähnlichkeiten ausgewählter Merkmale herangezogen werden. Die Auswahl anderer Merkmale führt unter Umständen zu einer anderen Bewertung der Verwandtschaftsbeziehung. Letztlich ist dieses Problem der Evolutionsforschung nie lösbar, da nur bestehende Merkmale empirisch untersucht werden können, nie aber der Verlauf einer Speziesentwicklung, die sich über einen sehr langen Zeitraum abspielt.

IV.2.2.8 Homologievergleich von RamA mit Vertretern der AraC/XylS Proteinfamilie

Das Genom von *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (NCBI Acc.nr.: CP000822) enthält mit den Genen *marA*, *soxS*, *rob* und *ramA* alle Gene der Transkriptionsfaktoren der AraC/XylS Proteinfamilie, die mit der Regulation der MDR Efflux Pumpe AcrAB-TolC assoziiert sind (siehe I.4.2). Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller vier Transkriptionsfaktoren zeigt eine hohe Homologie vor allem in den für die Proteinfamilie typischen Helix-Turn-Helix Motiven an (siehe **Abbildung IV-12**). Der paarweise Vergleich der Konservierung der einzelnen Aminosäurepositionen unter den Transkriptionsfaktoren zeigt, dass über 60 % der Positionen durch Aminosäuren ähnlicher Eigenschaften besetzt sind (in **Tabelle IV-8** angegeben durch die prozentuale Ähnlichkeit). Der Vergleich der einzelnen Transkriptionsfaktoren zwischen *C. koseri* und *E. coli* zeigt eine Ähnlichkeit von 97 % und höher für MarA, Rob und SoxS an. Diese Beobachtung lässt eine ähnliche Funktionsweise des Transkriptionsfaktors RamA aus *Citrobacter* vermuten, wie sie für MarA und Rob jeweils anhand der Kristallstrukturen beschrieben worden ist (Rhee et al. 1998 bzw. Kwon et al. 2000). Diese Feststellung wurde im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit zur Grundlage einer *in silico* Strukturmodellierung von RamA aus *C. koseri* genommen, anhand derer weitere funktionelle Untersuchungen folgten.

IV. Diskussion

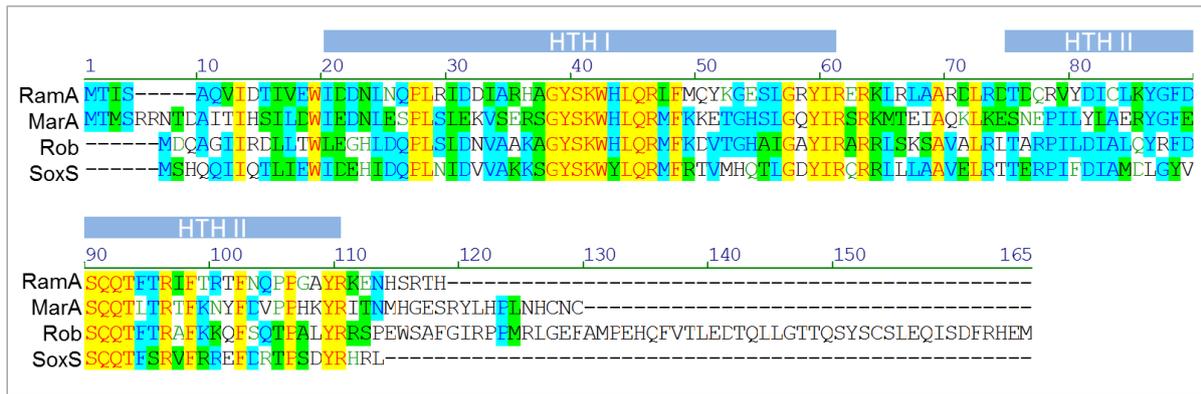


Abbildung IV-12: Multiples Sequenzalignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Transkriptionsfaktoren RamA, MarA, Rob und SoxS aus *Citrobacter koseri* ATCC BAA895 (NCBI Acc.nr.: CP000822). Die Gene wurden mittels BLAST Analyse in dem Genom des Stammes identifiziert und mit der Software *Vector NTI* translatiert und aligniert. Die angegebenen Helix-Turn-Helix- (HTH) Motive wurden durch den Abgleich in der NCBI Conserved Domains Datenbank vorhergesagt.

Tabelle IV-8: Prozentualer Anteil im paarweisen Vergleich übereinstimmender oder ähnlicher Positionen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von RamA, MarA, Rob und SoxS aus *Citrobacter koseri* ATCC-BAA895 (NCBI Acc.nr.: CP000822) (Ck) und *E. coli* (Ec) (MarA PDB Acc.nr.: 1BL0, Rob NCBI Acc.nr.: CDL38740, SoxS NCBI Acc.nr.: CDL37793). Die Translation aus den *C. koseri* DNA-Sequenzen sowie die Alignierung und der Ähnlichkeitsvergleich erfolgten automatisiert mittels der *Vector NTI* Software.

	RamA Ck	MarA Ck	MarA Ec	Rob Ck	Rob Ec	SoxS Ck	SoxS Ec
RamA <i>C. koseri</i>	100	67	67	65	65	76	76
MarA <i>C. koseri</i>		100	98	62	62	64	65
MarA <i>E. coli</i>			100	62	62	64	65
Rob <i>C. koseri</i>				100	97	70	71
Rob <i>E. coli</i>					100	70	71
SoxS <i>C. koseri</i>						100	97
SoxS <i>E. coli</i>							100

IV.3 RamA und multiple drug resistance (MDR) in *Citrobacter spec.*

Die hohe Homologie der DNA-Sequenz für *ramA* aus *Citrobacter freundii* GK100 zu denen anderer Enterobakterien wurde bereits durch die Dissertation von Franziska Pott gezeigt (Pott 2011). Der weitergehende Vergleich der Sequenzen in der vorliegenden Arbeit hat gezeigt, dass diese hohe Homologie auch zwischen verschiedenen Arten der Gattung *Citrobacter* besteht. Dieses ließ auf eine ähnlich Bedeutung von *ramA* für die potentielle Ausprägung eines *multiple drug resistance*

(MDR) Phänotypes in *Citrobacter* schließen, wie sie für *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumonia* und *Enterobacter aerogenes* beschrieben worden ist (George, Hall, and Stokes 1995; Yassien et al. 2002; Chollet et al. 2004). Für all diese Stämme wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von *ramA* zur Ausprägung eines MDR-Phänotypes führte, bei dem simultan die MHK-Werte für verschiedene Antibiotika unterschiedlicher Klassen erhöht waren. Ähnliches ließ sich auch in dem klinischen *Citrobacter freundii* Isolat 1392 nachweisen. In der Dissertation von Franziska Pott wurde gezeigt, dass dieser Stamm eine *knockout*-Mutation in *ramR* trägt und eine erhöhte Expression von *ramA* und dem Gen *acrB* der MDR-Effluxpumpe AcrAB-TolC aufweist. Die Komplementation mit dem Wildtyp-Gen führte zu einer deutlich geringeren Expression beider Gene (Pott 2011).

Um zu klären, ob eine gezielte Überexpression von *ramA* auch in *C. freundii* zur Ausprägung eines MDR-Phänotyp führte, wurde das Gen aus dem Stamm *C. freundii* GK100 isoliert und in einen Überexpressionsvektor kloniert. Dieser wurde dann in den Stamm *C. freundii* GK100 transformiert und anschließend ein Antibiotikaresistenzprofil erstellt. Weiter sollte geprüft werden, ob eine heterologe Expression von *ramA* in Stämmen anderer Enterobakterienarten, u. a. auch *E. coli*, welcher kein *ramA*-homologes Gen im Genom trägt, zur Ausprägung eines MDR-Phänotypes führte. Dabei wurden auch *E. coli* Mutanten ausgewählt, die *knockout*-Mutationen in den Genen *marA*, *soxS* und *rob* trugen. Darüber sollte geprüft werden, ob sich Rückschlüsse auf etwaige Interaktionen dieser Gene bzw. deren entsprechenden Genprodukte mit dem heterolog exprimierten *ramA* aus *C. freundii* ziehen ließen.

IV.3.1 Zur Überexpression von *ramA* in *Citrobacter* und anderen Enterobakterien

Zellen des *Citrobacter freundii* Stammes GK100, die mit dem *ramA*-Überexpressionplasmid pHPAR19-01.3 transformiert waren, wiesen im Vergleich zu den mit dem Referenzplasmid pHPAR19-01.1 für alle getesteten Antibiotika eine 2-8fach erhöhte MHK auf (siehe **Tabelle III-12**). Hierdurch wurde gezeigt, dass das *ramA*-homologe Gen in *C. freundii* mit der Ausbildung eines MDR-Phänotypes assoziiert ist.

Bei dem Experiment hat sich gezeigt, dass es durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) zu keiner Verstärkung des MHK-steigernden Effektes kam. Dieses deutet daraufhin, dass entweder die *ramA*-Expression von dem Plasmid ausgehend durch die Zugabe von IPTG nicht weiter gesteigert werden konnte oder, dass es durch eine weitere Expressionssteigerung nicht zu einer verstärkten Wirkung des Transkriptionsfaktors kam. Betrachtet man die Regulation der IPTG vermittelten Induktion der Transkriptionsrate am *plac*-Promotor, ist jedoch zu vermuten, dass sich der Expressionsstatus bereits ohne IPTG-Zugabe auf höchstem Niveau befand. So bindet IPTG den LacI-Repressor und inaktiviert diesen, wodurch er

nicht mehr in den Operator-Bereichen des *plac*-Promotors binden kann. Durch die hohe Kopiezahl des Plasmides reicht jedoch die Anzahl natürlich gebildeten LacI-Repressors sehr wahrscheinlich nicht aus, um die Transkription effektiv zu unterbinden. Deshalb sollte für eine Kontrolle des *plac*-Promotors durch IPTG auf pUC18 Plasmidderivaten das Gen des Repressors LacI ebenfalls überexprimiert werden (Stark 1987). Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit war dieses nicht von Interesse. Auf die Verwendung von IPTG wurde deshalb im weiteren Verlauf verzichtet.

Eine Steigerung der Resistenz gegenüber den Antibiotika CIP und TET wurde bei der Überexpression von *ramA* aus *C. freundii* auch in den *Citrobacter* Stämmen *C. koseri* GK1189, *C. sedlakii* GK2552, *C. farmeri* GK2519, *C. werkmannii* GK708 und *C. rodentium* GK1253 beobachtet, die mit dem *ramA* Überexpressionsplasmid pHPAR19-01.3 transformiert waren. Das entsprechende Experiment mit den Stämmen *K. pneumoniae* GK94, *E. cloacae* GK489 und *S. enterica* Typhimurium GK501 (siehe **Tabelle III-14**) sowie mit *E. coli* GK571 (siehe **Tabelle III-13**) zeigte, dass selbst bei einer gattungsübergreifenden heterologen Expression des *ramA*-Gens aus *C. freundii* GK100 der MDR-induzierende Effekt zu beobachten war. Lediglich der *E. cloacae* Stamm zeigte ausschließlich für CIP eine erhöhte MHK, nicht jedoch für TET. Die Ursache hierfür ist unbekannt. Es sind weitere Untersuchungen mit anderen Antibiotika andere Substanzklassen nötig, um einen MDR-induzierenden Effekt zweifelsfrei zu prüfen.

Für die jeweiligen *ramA*-Gene in den Chromosomen von *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* und auch *Salmonella enterica* serovar Paratyphi wurde ebenfalls eine Übertragbarkeit des MDR-induktiven Effektes in *E. coli* gezeigt (George, Hall, and Stokes 1995; Chollet et al. 2004; Yassien et al. 2002). Dieses war bereits bei der ersten Entdeckung insofern überraschend, als dass das *E. coli* Genom die *ramRA*-Gene nicht enthält und der Organismus somit auch keine natürliche Regulationskaskade über diese Transkriptionsfaktoren verfügt. Es ist anzunehmen, dass in allen untersuchten Stämmen der heterologe Transkriptionsfaktor RamA funktionsfähig gebildet wird und seine resistenzsteigernde Wirkung entfaltet.

Der Literaturabgleich der MHK-Unterschiede zwischen Zellen mit *ramA*-Überexpression und der entsprechenden Kontrollzellen (siehe **Tabelle IV-9**) zeigte, dass die für *Citrobacter freundii* ermittelten Werte niedriger ausfielen als für *Klebsiella*, jedoch mit einzelnen Ausnahmen vergleichbar mit denen für *Enterobacter* und *Salmonella* waren (George, Hall, and Stokes 1995; Chollet et al. 2004; Yassien et al. 2002). Die deutlich größeren MHK-Unterschiede, die bei der *ramA*-Überexpression mittels *multicopy* Plasmid in einem *Klebsiella pneumoniae* Stamm publiziert wurden (George, Hall, and Stokes 1995), könnten in der unterschiedlichen Methode der Bestimmung der MHK-Werte begründet sein. So wurden diese in der vorliegenden Arbeit mit dem Mikrodilutionsverfahren stufenweise mit definierten Antibiotikakonzentrationen bestimmt. In

IV. Diskussion

der angesprochenen Publikation wurden die MHK-Werte über eine Agar-Gradientenmethode bestimmt, bei der ein kontinuierlicher Antibiotikagradient in einem festen Nährmedium zugrunde gelegt wurde (George, Hall, and Stokes 1995). Letztere muss als ungenauer eingeschätzt werden, da diese Gradientenplatten sehr wahrscheinlich nicht mit definierten Antibiotikakonzentrationen an jedem Punkt der Platten hergestellt werden können. Insofern sind die Werte zwischen der Untersuchung in *Citrobacter* und *Klebsiella* nicht direkt vergleichbar. In den übrigen Stämmen hat sich jedoch gezeigt, dass die Resistenz gegenüber allen untersuchten Antibiotika um 1-3 MHK Stufen erhöht war. Somit handelt es sich um eine leichte Resistenzhöhung, die allein nicht für die Ausprägung einer klinisch relevanten Resistenz ausreicht.

Tabelle IV-9: Literaturangaben für MHK-Werte, die bei artifizieller *ramA*-Überexpression gemessen wurden. TET: Tetracyclin, NAL: Nalidixinsäure, PUR: Puromycin, n.v.: nicht verfügbar.

Spezies	<i>ramA</i> -Überexpr.	TET	NAL	PUR	Quelle
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	16,5	35	>860	George et al. 1995
	-	1,6	1,2	7	
<i>Escherichia coli</i>	+ (<i>K. pneumoniae</i>)	15	12,5	>860	George et al. 1995
	-	1,5	1,2	4	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	16	32	n.v.	Chollet et al. 2004
	-	4	8	n.v.	
<i>Escherichia coli</i>	+ (<i>E. aerogenes</i>)	16	128	n.v.	Chollet et al. 2004
	-	1	64	n.v.	
<i>Salmonella</i> Hadar	+	128	16	n.v.	Feuerriegel and Heisig 2008
	-	8	1	n.v.	
<i>Escherichia coli</i>	+ (<i>S. Paratyphi</i>)	4	n.v.	n.v.	Yassien et al. 2002
	-	0,5	n.v.	n.v.	
<i>Citrobacter freundii</i>	+	8	32	512	Diese Arbeit
	-	1	8	128	
<i>Escherichia coli</i>	+ (<i>C. freundii</i>)	4	32	256	Diese Arbeit
	-	1	8	64	

In der Dissertation von Franziska Kühn (geb. Pott) wurde gezeigt, dass die Expression von *ramA* im Stamm *C. freundii* GK100 in Abhängigkeit von *ramR* steht (Pott 2011). In einer entsprechenden $\Delta ramR$ *knockout*-Mutante war die *ramA*-Expression um Faktor 29 erhöht und die minimale Hemmkonzentration (MHK) für die Antibiotika Ciprofloxacin (4-fach), Tetracyclin (8-fach) und Florfenicol (8-fach) gesteigert. Die vergleichende Quantifizierung der Transkription des Gens

acrB zeigte, dass das Gen *acrB* der MDR-Effluxpumpe AcrAB-TolC um den Faktor 2,3 verstärkt exprimiert wurde (Pott 2011). Dies sind starke Hinweise dafür, dass die Gene *ramA* und *ramR* eine bedeutende Rolle bei der Ausprägung einer multiplen Antibiotikaresistenz in den *Citrobacter*-Stämmen haben. Doch erst die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben eindeutig bestätigt, dass das *ramA*-Gen mit der Ausprägung eines MDR-Phänotypes assoziiert war, da dieses hier isoliert untersucht wurde.

IV.3.2 Einfluss von Effluxpumpen

Die Untersuchung des MDR-induzierenden Effektes einer *ramA*-Überexpression wurde auch unter Verwendung von Phenylalanin-Arginyl β -Naphthylamid (PA β N) durchgeführt. PA β N ist ein Substrat der AcrAB-TolC Effluxpumpe und bindet an die Proteinkomponente AcrB, was durch eine Kokristallisation gezeigt werden konnte (Yu et al. 2005). Die genaue Wirkungsweise des Inhibitors ist noch nicht geklärt, man vermutet jedoch, dass es zu einer Konkurrenz der Bindung von PA β N mit den Substraten der Effluxpumpe kommt, wodurch diese in der Zelle akkumulieren (Barbara Zechini 2009). Neuere Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass PA β N zu einer erhöhten Permeabilität der äußeren Zellmembran führt und somit ebenso die Sensitivität der Zelle steigert, wobei dieses auch vom jeweiligen Antibiotikum abhängig ist (Lamers, Cavallari, and Burrows 2013).

Unter Zugabe des Effluxpumpeninhibitors (EPI) PA β N waren bei gleichzeitiger *ramA*-Überexpression in allen untersuchten Stämmen der verschiedenen Gattungen *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Salmonella* die MHK-Werte deutlich geringer als ohne PA β N und vielfach auf Kontrollniveau. Daher ist anzunehmen, dass der beobachtete *ramA*-abhängige Effekt der Ausbildung eines MDR-Phänotyps unter Beteiligung der AcrAB-TolC Effluxpumpe zustande kam.

Weiter wurde beobachtet, dass unter Zugabe von PA β N insbesondere die Sensitivität gegenüber Nalidixinsäure (NAL) in den untersuchten *ramA*-überexprimierenden Stämmen der Arten *Citrobacter freundii* und *E. coli* deutlich gesteigert war. Die entsprechenden MHK-Werte waren sogar vielfach geringer als die der Kontrollgruppe ohne *ramA*-Überexpression (siehe **Tabelle III-12** und **Tabelle III-13**). Dieses wurde für kein anderes Antibiotikum so deutlich beobachtet mit Ausnahme von CIP im Stamm *Salmonella enterica* Typhimurium. Aus den Beobachtungen ist zu schließen, dass NAL stärker in der Zelle akkumuliert bei der Hemmung der Effluxpumpen als die anderen Antibiotika, was den gewichtigen Anteil der Effluxpumpe bei der Resistenzbildung gegenüber dem Chinolon NAL unterstreicht.

Eine Abhängigkeit des *ramA*-induzierten MDR-Phänotyps von Effluxpumpen konnte auch durch die entsprechende *ramA*-Überexpression in der *E. coli* Δ *tolC*-Mutante R7 gezeigt werden. Im

Vergleich zum entsprechenden Wildtyp-Stamm *E. coli* C600 kam es nicht zur Ausbildung eines MDR-Phänotypes (siehe **Tabelle III-15**). In diesem Stamm war das Gen *tolC* inaktiviert, weshalb keine intakten *tolC*-abhängigen Effluxpumpen wie AcrAB-TolC oder AcrEF-TolC gebildet werden können. Damit wurde gezeigt, dass auch *ramA* aus *C. freundii* mit der Ausbildung eines von der Effluxpumpe AcrAB-TolC abhängigen MDR-Phänotypes assoziiert ist, wie es für die homologen Gene in *K. pneumoniae*, *S. enterica* und *E. aerogenes* bereits bekannt war (George, Hall, and Stokes 1995; Chollet et al. 2004; Yassien et al. 2002; Feuerriegel and Heisig 2008).

IV.3.3 Induktion des MDR-Phänotypes durch Überexpression in den *E. coli* $\Delta marA$, $\Delta soxS$ und Δrob Mutanten

Die Expression der MDR-Effluxpumpe AcrAB-TolC wird in *E. coli* reguliert durch die globalen Transkriptionsfaktoren MarA, SoxS und Rob, die im Promotorbereich von *acrAB* und *tolC* binden (siehe I.4.2). Der Regulator RamA ist im *E. coli* Genom nicht kodiert. Das hier durchgeführte Experiment, bei dem *ramA* aus *C. freundii* mit Hilfe des Plasmides pHPAR19-01.3 in *E. coli* heterolog überexprimiert wurde, hat gezeigt, dass es auch zur Ausbildung eines MDR-Phänotypes kommt (siehe **Tabelle III-13**). Diese resistenzsteigernde Wirkung war effluxabhängig, was durch den Einsatz des Effluxpumpenhemmers gezeigt wurde. Hierbei stellte sich die Frage, ob das heterolog exprimierte *ramA*-Genprodukt in *E. coli* eine direkte Interaktion mit dem *pacrAB*-Promotor einging, wie es für RamA in *Salmonella* berichtet wurde (E. Nikaido, Yamaguchi, and Nishino 2008), oder ob es zu einer Interaktion mit MarA, SoxS oder Rob kam, die letztlich zu einem gesteigerten Efflux führte.

In der vorliegenden Arbeit wurde dazu experimentell die *ramA*-Überexpression in drei *E. coli* Stämmen mit jeweils einer *knockout*-Mutation im Gen *marA*, *soxS* oder *rob* untersucht. Die Mutanten entstammten der „Keio collection“, einer Stammsammlung, die nahezu für jedes Gen in *E. coli* eine *knockout*-Mutante enthält (Baba et al. 2006). Diese wurden über eine gezielte Mutagenese durch homologe Rekombination hergestellt, bei der das entsprechende Gen durch eine Kanamycinresistenzkassette ausgetauscht und anschließend mittels Flippase eliminiert wurde. In allen drei hier untersuchten Stämmen war die Ausbildung eines MDR-Phänotypes zu beobachten, wenn diese mit dem *ramA*-Überexpressionsplasmid pHPAR19-01.3 transformiert wurden (siehe III.3.3.). Dieses macht deutlich, dass RamA seine effluxaktivierende Wirkung nicht in Abhängigkeit eines einzelnen der ausgeschalteten Transkriptionsfaktoren etabliert. Deshalb ist zu vermuten, dass die Effluxinduktion durch eine direkte RamA-DNA-Interaktion zustande kommt. Eine komplexe gleichzeitige Interaktion von RamA mit MarA, SoxS und Rob kann durch dieses Experiment jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dazu müssten jeweils Mutanten mit *knockout*-Kombinationen in den jeweiligen Genen untersucht werden.

Weiter wurde untersucht, ob eine gleichzeitige Überexpression mehrerer Transkriptionsfaktoren der AcrAB-TolC-Effluxpumpe eine weitere Steigerung der MHK-Werte zur Folge hat. Dazu wurden die Zellen mit *ramA*-Überexpression zusätzlich mit Natriumsalicylat induziert. Es ist bekannt, dass dieses Salz mit MarR, dem lokalen Repressor von *marA*, interagiert, woraufhin dieser inaktiviert wird. Das wiederum führt zu einer verstärkten Expression von *marA* und somit zu einem MDR-Phänotyp in *E. coli* (R G Martin and Rosner 1995; Cohen et al. 1993). Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die gemessenen MHK-Werte für CIP und TET von *C. freundii* unter *ramA*-Überexpression durch Salicylat zusätzlich erhöht waren. Diese Beobachtung konnte im entsprechenden Experiment an *E. coli* Zellen nicht gemacht werden. Desweiteren wurde beobachtet, dass die *ramA*-Überexpression sowie die Salicylatzugabe jeweils ungefähr den gleichen Effekt im Bezug auf die MHK-Steigerung in *C. freundii* hatten. Dagegen war der MHK-steigernde Effekt durch *ramA*-Überexpression in *E. coli* stärker als durch Salicylatzugabe. Hier hat also das heterologe Protein RamA einen stärkeren Effekt als das zelleigene MarA. Da in dem Experiment nicht gewährleistet war, dass die *ramA*- und die *marA*-Überexpression quantitativ vergleichbar war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das plasmidkodierte *ramA* in *E. coli* durch die Salicylatzugabe deutlich stärker exprimiert war als *marA*. Eine bessere Vergleichbarkeit könnte hier die Überexpression von *marA* auf einem Plasmid bringen.

Durch die Prüfung an den Mutanten *C. freundii* $\Delta ramR$ und *E. coli* $\Delta marA$ konnte bestätigt werden, dass der MDR-Phänotyp induzierende Effekt durch die Salicylat-Zugabe unabhängig vom *ramRA*-Regulatorsystem ist. Somit kann davon ausgegangen werden, dass tatsächlich *marA* und *ramA* gleichzeitig in den entsprechenden Zellen überexprimiert waren. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sich die Überexpression mehrerer Transkriptionsfaktoren der AraC/XylS-Familie abhängig vom Stamm additiv auf den MDR-Phänotyp auswirken kann. Dieses unterstreicht das Risiko einer Akkumulation mehrerer Mutationen in verschiedenen Regulatoren der AcrAB-TolC MDR-Effluxpumpe für die Antibiotikaresistenzentwicklung.

In jedem Fall hat das Experiment gezeigt, dass in *C. freundii* sowohl das *marRA*-Regulationssystem als auch das *ramRA*-Regulationssystem einen deutlichen Einfluss auf die Ausbildung eines MDR-Phänotypes hat. Dieses widerspricht einer mehrfach publizierten Aussage, wonach in Stämmen, in denen *ramA* und *marA* im Genom präsent sind, *ramA* einen weitaus stärkeren Einfluss auf die Ausprägung des MDR-Phänotyps haben soll als *marA* (Abouzeed, Baucheron, and Cloeckart 2008; Usui et al. 2013; E. Nikaido, Yamaguchi, and Nishino 2008; Zheng, Cui, and Meng 2009; T. Schneiders, Amyes, and Levy 2003; Feuerriegel and Heisig 2008).

IV.4 Analyse der DNA-Interaktion von RamA aus *Citrobacter koseri*

IV.4.1 Untersuchungen zur DNA-Interaktion im Strukturmodell *in silico*

Zur Zeit der Entstehung dieser Arbeit waren die Struktur sowie die detaillierte Funktionsweise des Transkriptionsfaktors RamA unbekannt. Deutliche Homologien in der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz von RamA zu dem Transkriptionsfaktor MarA wiesen jedoch auf eine analoge Funktionsweise hin (siehe I.4.2 und IV.2.2.8). Zum besseren Verständnis der strukturellen Interaktion von RamA mit der DNA wurde deshalb ein computergestütztes 3D-Modell des Transkriptionsfaktors auf Basis der Aminosäuresequenz erstellt.

Grundlage für die Modellierung war eine hohe Homologie der Aminosäuresequenzen der Template-Kristallstruktur von MarA aus *E. coli* (PDB-ID: 1BL0) und RamA aus *C. koseri* ATCC BAA-895 (NCBI Acc.nr.: CP000822, Region 2395300..2400500). Die Sequenzidentität betrug 44 % und die Sequenzähnlichkeit, also die Übereinstimmung von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften betrug 67 %. Beides unterstützte die Hypothese einer Homologie zwischen den Genen. Zum Vergleich: die Aminosäure-Sequenzähnlichkeit beträgt für GyrA zwischen beiden Spezies 95 %, wobei 90 % der Positionen identisch sind (Referenzwert für die Sequenzähnlichkeit des gleichen Gens in Stämmen verschiedener Spezies).

Die Modellierung wurde mit der Methode des Homology Modellings durchgeführt (Fiser and Sali 2003) (siehe II.2.4.2). Für die Berechnung wurde das Softwarepaket MODELLER der Version 9.10 verwendet. Die dafür notwendige Aminosäuresequenz wurde mit dem Programm *Vector NTI* Version 11.5 aus der DNA-Sequenz des *ramA*-Gens von *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (NCBI Acc.nr.: CP000822, Region: 2397642..2398022, locus_tag: CKO_02591) abgeleitet. Als Template diente die durch Rhee et al. (1998) publizierte Kristallstruktur von MarA aus einem *E. coli* Stamm, gebunden an ein 22 bp langes DNA-Fragment des *marRAB*-Operons aus *E. coli* mit MarA-Bindemotiv (PDB-ID: 1BL0). Da diese Kristallstruktur die C- sowie N-terminalen Bereiche der MarA-Aminosäuresequenz nicht vollständig abbildet, wurde auch für die Modellierung lediglich ein verkürzter MarA-homologer Sequenzbereich von RamA einer Länge von 109 aa verwendet, der um die ersten drei Aminosäuren Met1, Thr2 und Ile3 sowie die letzten zwei Aminosäuren Thr113 und His114 trunziert war. Die verkürzten Sequenzen von MarA im Kristall sowie RamA im Modell sind im Vergleich zu den jeweils vollständigen Aminosäuresequenzen in **Abbildung IV-13** dargestellt.

IV. Diskussion



Abbildung IV-13: Alignment der Aminosäuresequenzen von MarA aus *E. coli* und RamA aus *Citrobacter koseri*. Abgebildet sind jeweils die vollständige Sequenz sowie die verkürzte Sequenz aus der Kristallstruktur (MarA *E. coli* Kristall) bzw. des Modells (RamA *C. koseri* Modell). MarA (vollständig und Kristall): PDB-ID: 1BLO, RamA: NCBI GenBank Acc.nr.: CP000822, Region: 2397642..2398022. Gelb hinterlegt: identische Aminosäuren, blau hinterlegt: mindestens in 3 der 4 Sequenzen identische Aminosäure, grün: Aminosäure ähnlicher Eigenschaften, blaue Schrift: Aminosäuren mit schwach ähnlichen Eigenschaften.

Im Automodel-Routineprozess von MODELLER wurden 200 Strukturen für ein Modell von RamA gebunden an das 22 bp DNA-Fragment erzeugt. Aus diesen wurde über ein Bewertungssystem (siehe II.2.4.2) sowie unterstützend durch eine visuelle Begutachtung mit Hilfe des Programms VMD der Version 1.9.1 ein Modell für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Dieses bekam die Bezeichnung r159.

Bei der Modellierung wurden alle Aminosäuren von RamA in die 3D-Struktur des MarA-Templates gebracht. Dabei wurden für die Ausrichtung der Seitenketten lediglich lokale Energieminima berücksichtigt. Das Modell gab daher keine Auskunft darüber, ob die vorhergesagte Struktur auch einem globalem Energieminimum entgegenstrebt und in diesem stabil sein würde. Deshalb wurde im Anschluss an die Modellierung eine Simulation der Interaktionen sämtlicher Atome im Modell über einen Zeitraum von 14 ns berechnet. Anhand dieser Simulation wurden dann *in silico* Untersuchungen zur Integrität des Proteins als Ganzes sowie zur Stabilität einzelner Interaktionspunkte mit der DNA durchgeführt. Diese Dynamiksimulation wurde wie unter II.2.4.3 beschrieben mit dem Softwarepaket AMBER Version 11 unter Verwendung oktaedrischer Boxen berechnet. Die Visualisierung sowie alle weiteren Auswertungen wurden mit dem Programm VMD (*Visual Molecular Dynamics*) Version 1.9.1 durchgeführt. In der Moleküldynamiksimulation wurde der Zeitraum von 14 ns in 713 Bildern (*frames*) dargestellt.

Die Simulation der Moleküldynamik bestätigte, dass die berechnete Struktur unter Wechselwirkung sämtlicher Aminosäuren und Nucleinsäuren des Proteins und der DNA stabil in

ihrer Form blieben. Zur Darstellung dessen wurde hier ein RMSD (Root-Mean-Square-Deviation)-Plot aufgezeichnet, der den durchschnittlichen Abstand zwischen den Atomen des Proteinrückgrates in Ångström [Å] über einen Zeitverlauf angibt. Dafür wurden zunächst alle Frames der Moleküldynamik auf die Proteinstruktur aligniert. Anschließend wurde der RMSD-Plot für das Rückgrat des Proteins sowie für die DNA berechnet. Die Verläufe sind in **Abbildung IV-14** dargestellt und zeigen, dass sich nach einer kurzzeitigen Schwankung zu Beginn der Berechnung alle Backbone-Atome sowie die Atome der DNA stabil um lediglich 1 Å bzw. 2 Å bewegen, was der Braun'schen Molekularbewegung entspricht. Das RamA-DNA-Modell befand sich also über den berechneten Zeitraum stabil in einer dem globalen Energieminimum entsprechenden vorhergesagten Struktur.

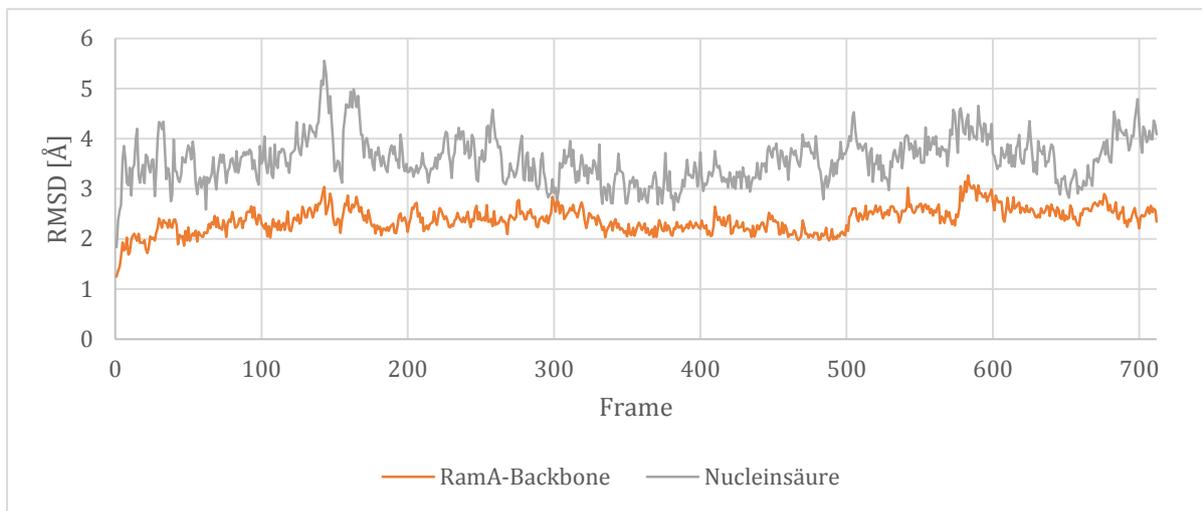


Abbildung IV-14: RMSD-Plot des RamA-Proteins und der DNA aus der Moleküldynamiksimulation des Modells r159. Die angegebenen Frames der Moleküldynamik entsprechen einem Zeitverlauf von 14 ns.

IV.4.2 Vergleich des RamA-Modells mit der Struktur von MarA

Das Modell r159 sagte für den Transkriptionsfaktor eine Struktur bestehend aus sieben α -Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) vorher (siehe **Abbildung IV-15**), von denen die Helices $\alpha 1$ - $\alpha 3$ ein N-terminales und die Helices $\alpha 5$ - $\alpha 7$ ein C-terminales Helix-Turn-Helix (HTH-) Motiv bildeten. Beide waren über $\alpha 4$ miteinander verbunden. Die DNA wurde durch die Bindung der HTH-Motive in zwei benachbarten großen Furchen in einer gekrümmten Lage gehalten und blieb über den Zeitraum von 14 ns der Moleküldynamiksimulation stabil an das Protein assoziiert (siehe **Abbildung IV-16**). Ein direkter Vergleich zwischen dem MarA-Template und dem Modell r159 am Ende des simulierten Zeitraumes zeigte außerdem, dass die relative Lage der α -Helices zueinander im Modell weitestgehend mit der im Template übereinstimmte (siehe **Abbildung IV-17**). Bezogen auf die Lage der Helices im Alignment der Aminosäuresequenzen, wichen lediglich $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 7$ um

maximal zwei Aminosäuren zwischen RamA und MarA voneinander ab (siehe **Abbildung IV-18**). Es ist zu beachten, dass es sich bei der für RamA vorhergesagten Struktur um die durch MarA vorgegebene Struktur handelte. Die Tatsache, dass sich das RamA Modell stabil in der vorgegebenen Struktur hält, ist ein Hinweis dafür, dass die vorhergesagte Struktur der tatsächlichen nahe kommt. Dafür existieren auch weitere Hinweise. Dazu zählen die hohe Homologie beider Aminosäuresequenzen, angezeigt durch eine Sequenzidentität von 44 % und einer Übereinstimmung durch strukturell ähnliche Aminosäuren von 67 % (siehe **Tabelle IV-8**), sowie die ähnliche Länge der Sequenzen von 129 as und 114 as für MarA bzw. RamA. Auch die nachgewiesene Bindung beider Proteine an die marbox (R. G. Martin et al. 1999; E. Nikaido, Yamaguchi, and Nishino 2008) deutet auf eine ähnliche Funktionsweise hin. Ebenso auch der gleichermaßen hohe Einfluss auf die Regulation der AcrAB-TolC Effluxpumpe, welche durch die Interaktion an der marbox reguliert wird (siehe I.4.2). Alle übereinstimmenden Eigenschaften zwischen MarA und RamA deuten daraufhin, dass auch die Strukturen beider Proteine ähnlich sind.

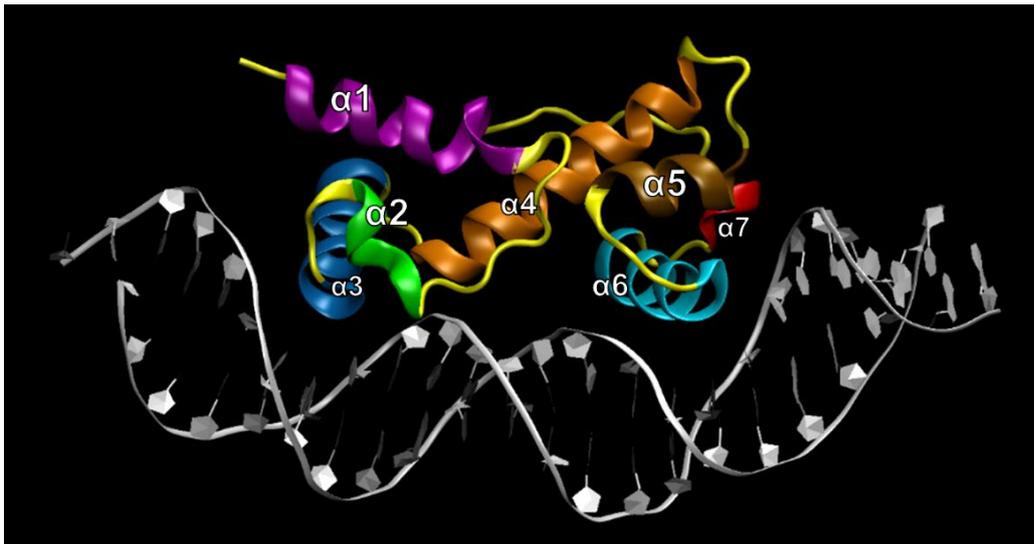


Abbildung IV-15: 3D-Strukturmodell r159 von RamA gebunden an ein 22 bp langes DNA-Fragment. Strukturinformationen für Protein und DNA entstammen der Kristallstruktur eines MarA-DNA-Komplexes (PDB-ID: 1bl0). Vorhergesagte α -Helices sind der Reihenfolge vom N-Terminus beginnend nummeriert und verschiedenfarbig markiert. Die Abbildungen wurden mit der Software *Visual Molecular Dynamics (VMD)* erzeugt.

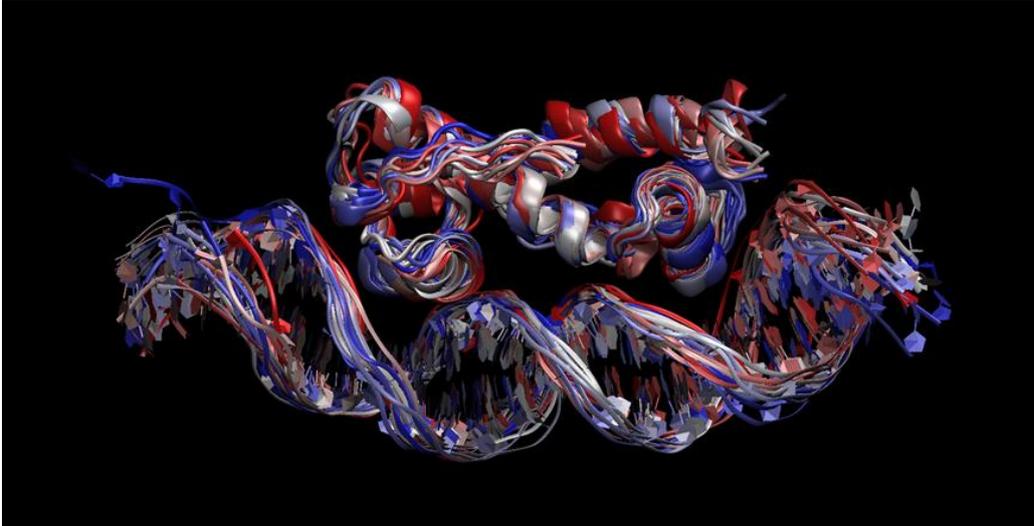


Abbildung IV-16: Positionsverlauf des RamA-Modells in der simulierten Moleküldynamik. Angezeigt ist jeder 50ste *frame* der Simulation im Farbverlauf von rot (*frame* 0) über weiß (*frame* 350) bis blau (*frame* 700) von insgesamt 713 *frames*. Die Abbildungen wurden mit der Software *Visual Molecular Dynamics* (VMD) erzeugt.

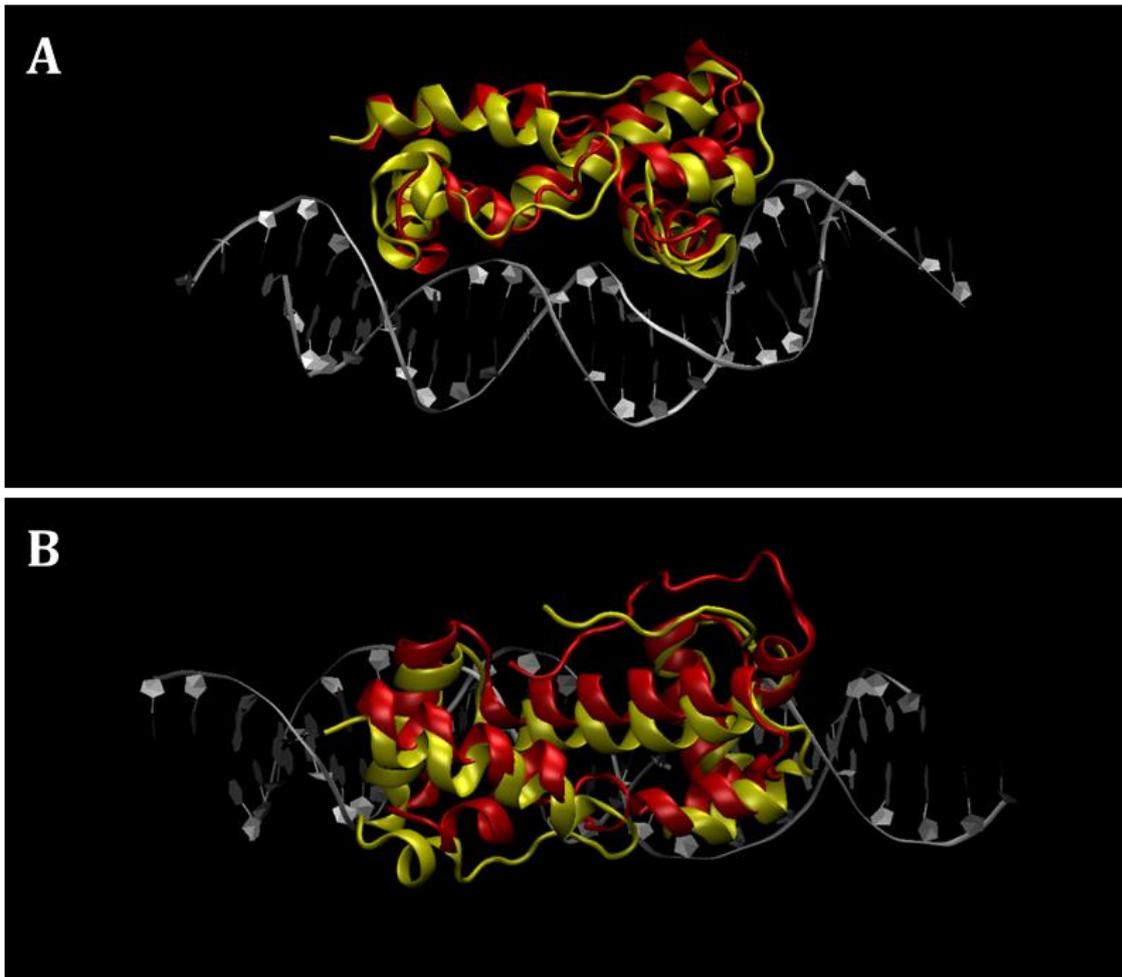


Abbildung IV-17: Strukturalignment des RamA-Modells r159 (gelb) mit dem MarA-Template (PDB Acc.nr.: 1bl0) in der Seitenansicht (A) und in der Aufsicht (B). Die hier gezeigte RamA-Struktur entspricht dem letzten Zustand in der Moleküldynamiksimulation nach 14 ns. Beide Strukturen wurden auf die Lage der DNA aligniert. Angezeigt ist hier lediglich die DNA aus dem MarA-Template 1bl0. Die Abbildungen wurden mit der Software *Visual Molecular Dynamics (VMD)* erzeugt.

IV.4.3 Vergleich der DNA-Interaktionen von MarA und RamA

Für den Vergleich zwischen MarA und RamA wurden sämtliche Interaktionspunkte zwischen dem Protein und der DNA im RamA-Modell untersucht. Im Programm *VMD* wurden dazu zunächst alle Aminosäuren analysiert, die sich in einem Abstand von bis zu 5 Ångström [Å] von Nukleinsäuren befanden. Diese Aminosäuren wurden dann einzeln auf Interaktionen mit Atomen der DNA untersucht. Als solche wurden Wasserstoff-Brückenbindungen (im Folgenden H-Brückenbindungen genannt) zwischen positivierten H-Atomen in R-NH oder R-OH Gruppen und freien Elektronenpaaren an schweren Atomen (N, O) oder π -Kationenbindungen definiert. Letztere sind Wechselwirkungen zwischen positivierten H-Atomen und delokalisierten π -Elektronensystemen, wie sie in den aromatischen Aminosäuren vorkommen. Als stabile Interaktionen wurden Bindungen bewertet, die über den Zeitverlauf der simulierten

Moleküldynamik in einem Abstand von maximal 3 Å vorlagen. Indirekte H-Brückenbindungen über Wassermoleküle wurden hier außer Acht gelassen, da diese nur sehr unsicher vorhersagbar waren. Als Van-der-Waals-Wechselwirkungen wurden solche Interaktionen eingestuft, bei der zwei unpolare H-Atome einen durchschnittlichen Abstand von 5 Å zueinander hatten. Bei der Bewertung der Interaktionen wurde außerdem unterschieden, ob es sich um eine Bindung zum Phosphat-Rückgrat der DNA und somit um eine sequenzunspezifische Interaktion handelte, oder um eine Wechselwirkung mit den Basen der einzelnen Nukleotide, was als sequenzspezifische DNA-Interaktion bewertet wurde.

Alle im RamA-Modell vorhergesagten DNA-Interaktionspunkte sind in **Tabelle IV-10** bezogen auf die DNA-Sequenz im Vergleich zu den durch Rhee et al. 1998 für MarA beschriebenen Wechselwirkungen dargestellt. In **Abbildung IV-18** sind die entsprechenden Interaktionspunkte bezogen auf die Aminosäuresequenzen im Vergleich zwischen MarA und RamA dargestellt. Wie die **Tabelle IV-10** zeigt, erstreckte sich die DNA-Interaktion bei MarA und RamA über 19 bp des DNA-Moleküls, wobei sich die meisten Interaktionspunkte im Bereich der Helix-Turn-Helix Motive befanden. Die Positionen der Wechselwirkungen waren alternierend über beide DNA-Stränge verteilt, was durch die Windung der DNA-Doppelhelix und somit der wechselseitigen Zuwendung der Stränge zur bindenden Seite des Proteins zustande kam. Weiter alternierten auch die sequenzspezifischen (blau) und sequenzunspezifischen (hellorange) Wechselwirkungen über das DNA-Molekül hinweg. Hierin wird deutlich, dass das jeweilige Protein mit seinen HTH-Motiven in die benachbarten großen Furchen der DNA-Doppelhelix hineinragte. Der Abgleich mit **Abbildung IV-18** zeigt, dass sämtliche Aminosäuren, die sich in einer sequenzspezifischen Wechselwirkung mit der DNA befanden zwischen RamA und MarA konserviert sind. Dieses waren Tryptophan 37 (W37) und Arginin 41 (R41) in RamA und W42 und R46 in MarA im N-terminalen HTH-Motiv sowie Glutamin 86 (Q86), Q87, Tyrosin 90 (T90) und R91 in RamA und Q91, Q92, T95 und R96 in MarA im C-terminalen HTH-Motiv. Von diesen wurde im RamA-Modell insbesondere W37 und R41 und Q87 und R91 als tief in die große Furche der DNA hineinragend und dadurch von besonderer Bedeutung für die Interaktion mit mehreren Basen bewertet (siehe **Abbildung III-17**).

Unterschiede zwischen beiden Proteinen ergaben sich in den sequenzunspezifischen Wechselwirkungen insbesondere an den C-Termini der Proteine. Es zeigte sich, dass MarA und RamA in denselben Bereichen der DNA wechselwirkten, die beteiligten Aminosäuren zum größten Teil jedoch nicht konserviert waren zwischen beiden Proteinen. Ein Unterschied in den sequenzspezifischen Interaktionen ergab sich für Q87 in RamA und Q92 in MarA. Hier wurde im Modell eine starke H-Brückenbindung zwischen den positivierten H-Atomen der endständigen Aminogruppe des Glutamins und dem O4-Atom der Pyrimidinbase des Nukleosids Thymidin 115

IV. Diskussion

festgestellt, welche für die publizierte Kristallstruktur von MarA nicht beschrieben war, sondern lediglich Van-der-Waals Interaktionen an der entsprechenden Position Q92 (Rhee et al. 1998). Die Lage der α -Helices war wie bereits zuvor beschrieben leicht versetzt.

Tabelle IV-10: Aminosäuren in Wechselwirkung mit der DNA im RamA-Modell r159 und der Kristallstruktur von MarA (PDB Acc.nr.: 1bl0). Die interagierenden Aminosäuren sind dem jeweiligen Nukleotid beider DNA-Helices zugeordnet. Aminosäuren in unspezifischen Wechselwirkungen mit dem Phosphat-Rückgrat der DNA sind hellorange hinterlegt. Solche in spezifischen Wechselwirkungen mit den Basen der Nukleotide sind hellblau hinterlegt. Aminosäuren in Van der Waals-Bindungen sind mit runden Klammern angegeben. Durch Rhee et al. (1998) für MarA beschriebene Aminosäuren in H₂O-Brückenbindungen (Wasserbrücken) sind in eckigen Klammern aufgeführt. W37 in RamA befand sich in einer π -stacking-Bindung und ist unterstrichen. Alle anderen Aminosäuren befanden sich über H-Brückenbindungen in Wechselwirkung mit der DNA. Die Helix-Turn-Helix (HTH-) Motive des N-Terminus bzw. des C-Terminus im RamA-Modell sind schematisch dargestellt. Die Positionsnummerierung (Pos.) der DNA-Basen entspricht der im Modell vergebenen Nummerierung.

MarA	RamA	Pos.	Base	Base	Pos.	RamA	MarA
		112	G	C	155		
		113	A	T	154		
		114	T	A	153		
		115	T	A	152		
		116	T	A	151	(Q87)	
		117	A	T	150		[T93]
		118	G	C	149		[T93]
		119	C	G	148	R91 (T88)	
		120	A	T	147	R56	R96
		121	A	T	146		(R96) T97
		122	A	T	145	R53	
		123	A	T	144		
		124	C	G	143		
		125	G	C	142		
		126	T	A	141		
		127	G	C	140	(W37)	
		128	G	C	139	W37	(W42)
		129	C	G	138	R41 S35	(W42) R46
		130	A	T	137	Y34 H38	R46 S40
		131	T	A	136		Y39 H43
		132	C	G	135		



IV. Diskussion

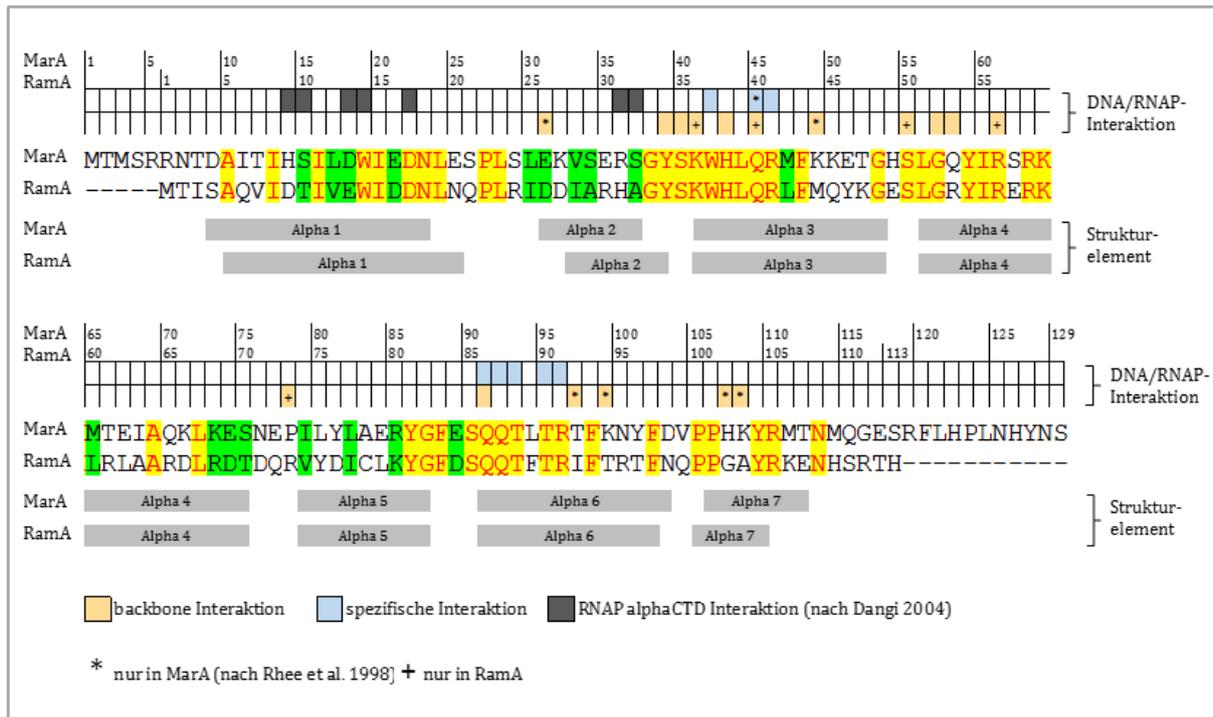


Abbildung IV-18: Vergleich der Aminosäuresequenzen von MarA aus *E. coli* und RamA aus *Citrobacter koseri* im Abgleich mit vorhergesagten Strukturelementen und Interaktionspunkten zwischen Protein und DNA sowie Protein und RNA-Polymerase (RNAP). Alle Angaben für MarA entsprechen der durch Rhee et al. (1998) publizierte Kristallstruktur (PDB Acc.nr.: 1bl0). Alle Angaben für RamA entsprechen dem Modell r159. Identische Positionen im Alignment sind gelb hinterlegt, Positionen mit strukturell ähnlichen Aminosäuren sind grün hinterlegt. Markierungen in der Leiste „DNA/RNAP-Interaktion“: RNAP-Interaktionspunkte wurden durch Dangi et al. (2004) vorhergesagt. Die entsprechenden Aminosäuren in MarA sind grau markiert. Aminosäuren in Interaktion mit dem DNA-Phosphat-Rückgrat sind hellorange markiert. Spezifische Interaktionen zwischen Aminosäuren und den Basen der DNA sind hellblau markiert. Abweichungen in den DNA-Interaktionspunkten sind entsprechend mit „+“ für nur im RamA-Modell bzw. mit „*“ für nur in MarA beschrieben markiert.

IV.4.4 Einfluss der Aminosäuren W37 und R41 in RamA auf die Aktivierung des *pacrA*-Promotors

Das Strukturmodell r159 von RamA zeigte in der Dynamiksimulation starke sequenzspezifische Wechselwirkungen mit der DNA an den Positionen W37 und R41 HTH-Motiv des C-Terminus und Q87 sowie R91 im HTH-Motiv des N-Terminus an. Die Seitenketten dieser Aminosäuren ragten besonders tief in die jeweilige große Furche der DNA hinein und formten über den gesamten Zeitraum der Moleküldynamiksimulation stabile Bindungen mit den Basen der Desoxyribonukleinsäuren (siehe **Abbildung III-17**). Die Positionen W37 und R41 wurden experimentell untersucht, um deren vorhergesagte Bedeutung für die DNA-Interaktion zu prüfen. R41 bildete im Modell stabile H-Brückenbindungen zwischen den positivierten H-Atomen des Guanidiniumrestes und den Sauerstoffen der DNA-Basen aus. W37 bildete dagegen eine stabile π -Kationenbindungen zur DNA, die sich zwischen dem delokalisierten π -Elektronensystem des

Indolrestes und einem positivierten H-Atom der Base eines Cytosins etablierte.

Im *in vitro* Testsystem wurden beide Aminosäuren in RamA durch ein Alanin ersetzt. Diese Varianten wurden W37A, R41A bzw. W37A+R41A in der Kombination genannt (siehe III.2.2). Es wurde ein Vergleich angestellt, bei dem die *pacrA*-Promotoraktivität bei gleichzeitiger Überexpression von Wildtyp RamA bzw. der mutierten Varianten bestimmt wurde. Desweiteren wurde die MHK der entsprechenden Stämme bestimmt.

Die Ergebnisse (siehe **Abbildung III-39** und **Tabelle III-11**) haben zunächst gezeigt, dass eine Überexpression von *ramA* aus *Citrobacter freundii* zu einer über 30fach erhöhten Aktivität am *pacrA*-Promotor aus *E. coli* führten und die MHK für CIP 8fach und für TET 16fach erhöht war. Dieses korreliert mit den zuvor beschriebenen Beobachtungen bei der heterologen Überexpression von *ramA* aus *C. freundii* in *E. coli*, die zur Ausbildung eines MDR-Phänotypes führte (siehe IV.3.1). Die bekannten Bindungsboxen für MarA aus *E. coli* und RamA aus *Salmonella* im *pacrA*-Promotor stimmen exakt überein und sind auch im *pacrA*-Promotor von *C. freundii* identisch vorhanden (siehe III.2.3 und **Abbildung III-35**). Deshalb ist anzunehmen, dass RamA seine transkriptionsaktivierende Wirkung auch in *E. coli* durch eine direkte Interaktion an der marbox im *pacrA*-Promotor etabliert. Einen eindeutigen Beweis dafür könnte eine Bindungsstudie mit aufgereinigtem RamA-Protein und dem entsprechenden DNA-Fragment bringen.

Die gemessene Aktivität am *pacrA*-Promotor bei gleichzeitiger Überexpression der R41A-Variante von *ramA* fiel deutlich geringer aus und war lediglich noch 4fach erhöht gegenüber der Kontrolle. Die MHK war sogar auf Kontrollniveau, die *ramA*-Überexpression hatte hier also keine Auswirkung mehr. Die Aminosäure R41 spielt demnach eine entscheidende Rolle bei der Etablierung der transkriptionsaktivierenden Wirkung von RamA, was die Vorhersagen am RamA-Modell r159 bestätigt. Auch die Überexpression der Variante W37A führte zu einer deutlich geringeren Promotoraktivität, die gegenüber der Kontrolle noch 19fach erhöht war. Die MHK für CIP und TET waren gegenüber der Kontrolle lediglich jeweils 4fach erhöht. Die Auswirkung der Alaninsubstitution fiel damit geringer aus als bei der R41A-Variante weshalb anzunehmen ist, dass W37 für die Bindungsaffinität des gesamten Proteins an die DNA im *pacrA*-Promotor weniger relevant ist als R41. Die Promotoraktivität und die MHK der Variante W37A+R41A waren mit denen der Variante R41A vergleichbar. R41 limitierte hier offenbar die Bindungsaffinität.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei Versuchen mit Alaninsubstitutionsvarianten an MarA und SoxS gemacht (Gillette, Martin, and Rosner 2000; Kevin L Griffith and Wolf 2002). In diesen sind beide Aminosäuren an ihren entsprechenden Positionen streng konserviert (MarA: W42 und R46, SoxS: W36 und R40, siehe auch **Abbildung IV-12**). Die Varianten MarA R46A SoxS R40A wiesen eine starke Reduktion der Aktivität an den getesteten Klasse I Promotoren der Gene *fpr* und *zwf* von >80 % auf. Die Alaninsubstitution des Tryptophans hatte bei SoxS eine Reduktion von 30-

55 % zur Folge und in MarA von >80 %.

IV.4.4.1 *In silico* Analyse der RamA-Substitutionsmutationsvarianten im Modell

Im *in vitro* Experiment wurde gezeigt, dass die Aminosäuren W37 und insbesondere R41 in der N-terminalen Domäne von RamA von Bedeutung sind für die Etablierung des transkriptionsaktivierenden Effektes des Proteins. Um weitere Informationen darüber zu erhalten, welche Auswirkungen die Alanin-Substitutionen auf die DNA-Interaktionen haben, wurden die entsprechenden Mutationsvarianten W37A, R41A und W37A+R41A auch in das bestehende RamA-DNA-Modell r159 eingefügt. Die Mutationsmodelle erhielten die Bezeichnungen r154 (W37A), r155 (R41A) und r156 (W37A+R41A). Anschließend wurden für jede Variante insgesamt vier Simulationen der Moleküldynamik über jeweils 14 ns durchgeführt. Diese erhielten die Bezeichnung r15x_v1-4.

In der visuellen Auswertung war deutlich zu erkennen, dass sich in je einer Simulation von r154 (W37A) und r156 (W37A+R41A) sowie in zwei Simulationen von r155 (R41A) die HTH-Struktur des N-Terminus deutlich vom DNA-Molekül entfernte. Die Doppelhelix relaxierte sich dabei aus der gekrümmten Form in eine lineare Ausrichtung. In **Abbildung IV-19** ist dieses beispielhaft für die Simulation r155_v2 dargestellt.

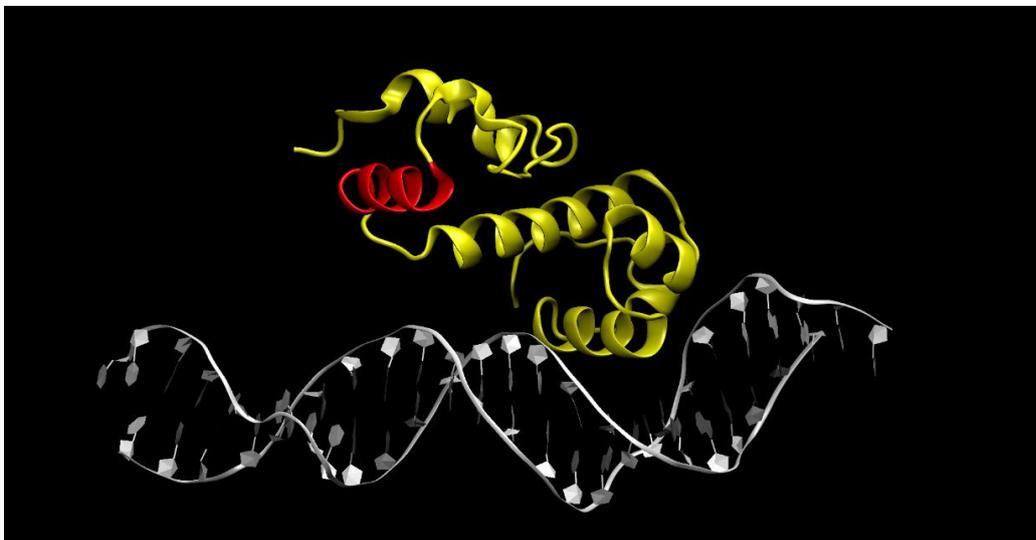


Abbildung IV-19: RamA Mutationsvariante r155_v2 (R41A) nach 14 ns simulierter Moleküldynamik. Die α -Helix 3 ist rot eingefärbt.

Um die DNA-Affinität der Mutationsvarianten vergleichen zu können, wurden in jeder Simulation die Abstände zwischen ausgewählten Atomen gemessen. Für die Aminosäureposition 37 wurde die Distanz zwischen dem C α -Atom von W37 bzw. A37 und dem N4-Atom in der Pyrimidinbase des Nukleotides C140 bestimmt. An der Position 41 wurde entsprechend der Abstand zwischen dem C α der Aminosäure R41 bzw. A41 und dem N7-Atom in der Purinbase des Nukleotides G127 über den Zeitverlauf gemessen. Diese Punkte sind beispielhaft für die Modellvariante r155 (R41A) in **Abbildung IV-20** abgebildet.

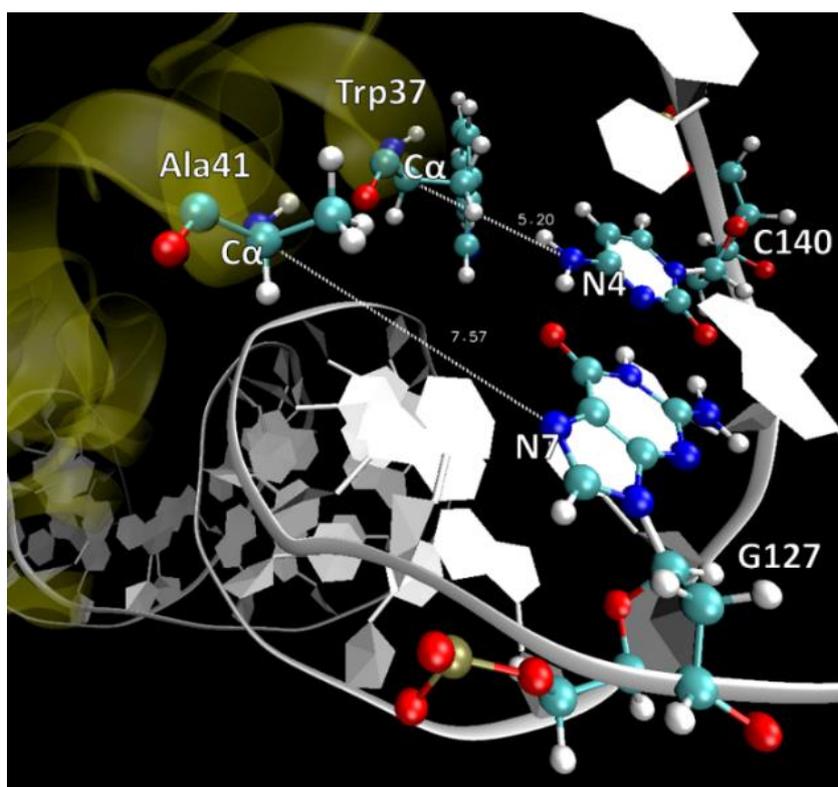


Abbildung IV-20: DNA-Interaktionspunkte in der N-terminalen Domäne von RamA beispielhaft in der Modellvariante r155 (W41A). Die Abbildung wurde mit der Software Visual Molecular Dynamics (VMD) erzeugt.

In **Abbildung IV-21** sind aus den Dynamiksimulationen die kalkulierten Abstände nach der jeweiligen Mutationsvariante dargestellt. Der Vergleich zeigt zunächst, dass sich die jeweiligen Varianten nicht in jeder Simulation gleich verhalten. Für alle Mutationsvarianten konnte in mindestens einer Simulation eine Vergrößerung des Abstandes zwischen N-Terminus und DNA-Molekül bei gleichzeitiger Relaxierung der DNA-Doppelhelix beobachtet werden.

Die Berechnungen unterstützen die Hypothese, dass die Aminosäuren an W37 und R41 einen erheblichen Anteil an der Aufrechterhaltung des RamA-DNA Komplexes haben und dass eine fehlende Interaktion an diesen Positionen nur z. T. durch die übrigen beschriebenen Bindungen

IV. Diskussion

zwischen Protein und DNA ausgeglichen werden kann. Es kam in den Simulationen nicht zu einer Destabilisierung des gesamten Proteins durch die Mutationen. Dieses deutet daraufhin, dass auch im *in vitro* Experiment die gemessenen Effekte auf eine defiziente DNA-Interaktion zurück zu führen sind und nicht auf eine Fehlfaltung als Folge der eingefügten Mutation.

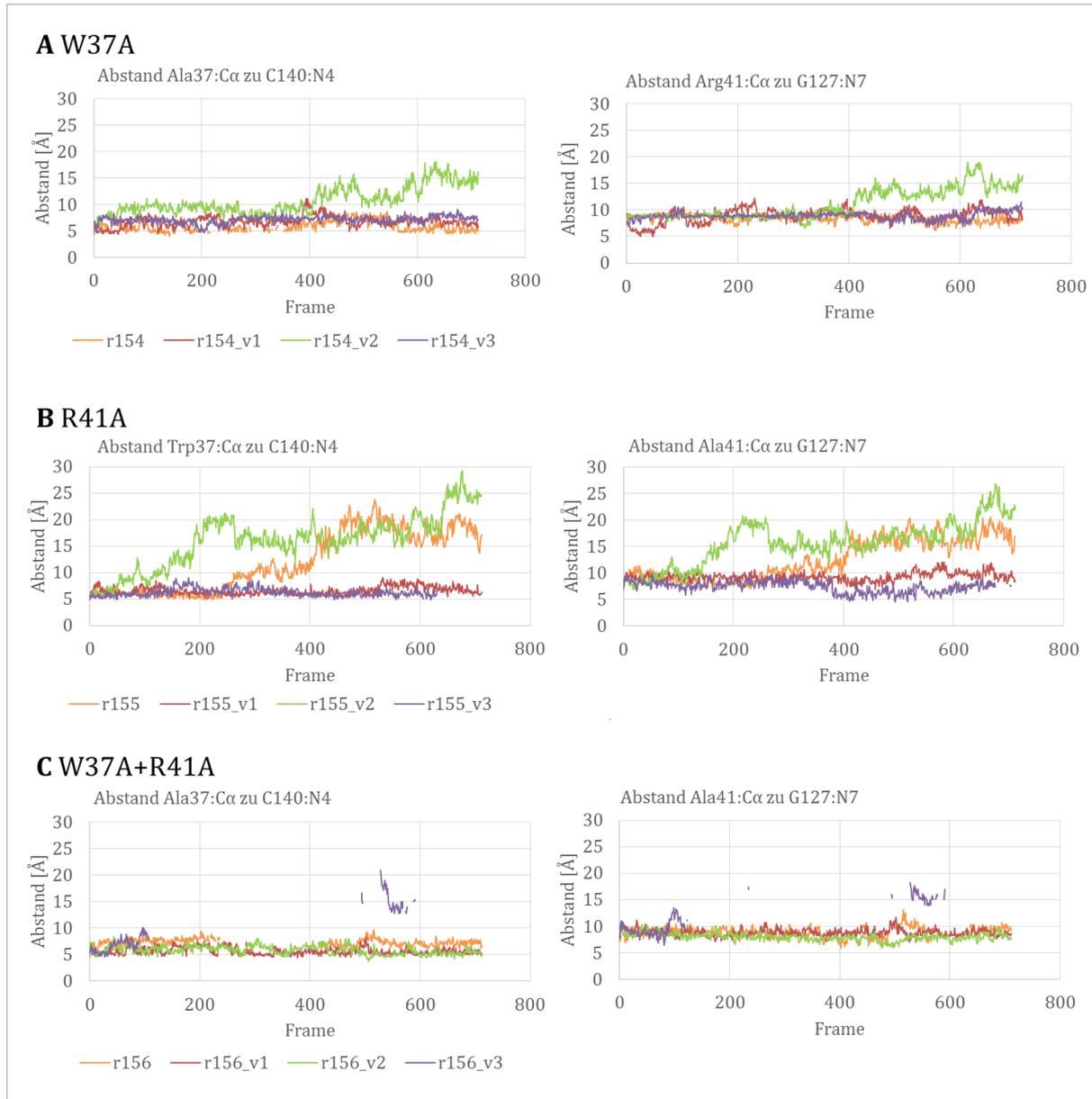


Abbildung IV-21: Kalkulation der Abstände in den RamA-Modellvarianten zwischen dem C α -Atom der Aminosäure an Position 37 bzw. 41 und dem N4-Atom des Cytosins 140 bzw. dem N7-Atom des Guanins 127 in der Simulation der Moleküldynamik. **A:** RamA W37A, Simulationsreplikate r154 bis r154_v3, **B:** RamA R41A, Simulationsreplikate r155 bis r155_v3, **C:** RamA W37A+R41A, Simulationsreplikate r156 bis r156_v3. Bei der Simulation wurden 712 Bilder (*frames*) erzeugt, die einem Zeitintervall von 14 ns entsprechen. Teilweise unterbrochene Graphen resultierten aus einem Artefakt bei der Darstellung der Modelle, bei der die DNA-Helix aus einer oktaedrischen Box in die angrenzende überging. Die Messung wurde mit der Software *Visual Molecular Dynamics (VMD)* durchgeführt.

IV. Diskussion

Deshalb wurde eine Fehlfaltung als unwahrscheinlich eingeschätzt, da die Seitenketten von W47 und R41 im RamA-Modell r159 keine erkennbaren Wechselwirkungen mit anderen Aminosäuren eingingen und in die Peripherie des Proteins ragten. Diese Beobachtung deckt sich mit der Ausrichtung der entsprechenden Aminosäuren W42 und R46 in der Kristallstruktur von MarA (PDB-ID: 1bl0) und wurde in der entsprechenden Publikation auch so beschrieben (Rhee et al. 1998).

Die *in vitro* und *in silico* Untersuchungen mit den Alaninsubstitutionsvarianten haben also gezeigt, dass einzelne Aminosäuren von ausschlaggebender Bedeutung für die transkriptionsaktivierende Wirkung von RamA an unterschiedlichen Promotoren sind.

IV.5 Ausblick

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des Transkriptionsfaktors RamA in *Citrobacter* hinsichtlich seiner Verbreitung innerhalb des Genus *Citrobacter*, seiner genetischen Organisation im *ramRA*-Operon, seines Einflusses bei der Antibiotikaresistenzbildung sowie seiner möglichen Struktur und den daraus resultierenden Bindungseigenschaften bei der DNA-Interaktion an der *marbox*. Dabei wurden neue Erkenntnisse über die molekularbiologischen Grundlagen einer durch erhöhten Efflux vermittelten multiplen Antibiotikaresistenz erhalten, die zum Verständnis der Entstehung von Antibiotikaresistenzen beitragen. Diese Erkenntnisse lieferten gleichzeitig Ansätze neuer Fragestellungen, die in nachfolgenden Untersuchungen fokussiert werden sollten. Die Analyse des *ramRA*-Operons in verschiedenen *Citrobacter* Spezies hat gezeigt, dass die Gene in unterschiedlicher Topologie organisiert sind. So wurde in *Citrobacter rodentium* im Unterschied zu den übrigen untersuchten Spezies das Fehlen des Genes *romA* festgestellt. Ob dieses für die ganze Spezies zutrifft ist unbekannt und sollte anhand weiterer unabhängiger Stämme untersucht werden. Die Tatsache, dass *ramA* in allen untersuchten Stämmen der verschiedenen *Citrobacter* Spezies anwesend war, lässt vermuten, dass auch in den übrigen Spezies, die hier nicht untersucht worden sind, *ramA* im Genom konserviert ist. Eine klare Bestätigung kann nur der experimentelle Nachweis erbringen. Dieser wäre über ein PCR-Experiment mit entsprechenden Referenzstämmen der jeweiligen Spezies realisierbar und durch eine anschließende Sequenzierung auch zu bekräftigen.

Nach wie vor sind die *ramRA*-Gene nur in einer überschaubaren Anzahl an Genera verbreitet. Die fortschreitende Entwicklung der kostengünstigen Sequenzierung ganzer Genome und die daraus resultierende Anzahl zur Verfügung stehender DNA-Sequenzen wird es in Zukunft einfacher machen die generelle Verbreitung der *ramRA*-Gene zu überwachen. Durch eine größere Anzahl genetischer Informationen wird es auch möglich sein, die Abstammung und Verbreitung von *ramA* in den Enterobakterien besser zu beschreiben und genauer zu verstehen. Erste Ansätze dazu wurden in dieser Arbeit durch den Zugewinn neuer Sequenzinformationen gebracht.

Aus diesen Sequenzinformationen wurden über eine computerbasierte Modellierung erste Vermutungen zum Aufbau und zur DNA-Interaktion des Transkriptionsfaktors abgeleitet. Aus dem daraus aufbauenden Experiment zur Transkriptionsaktivierung durch veränderte RamA-Varianten konnte der Schluss gezogen werden, dass einzelne Aminosäuren für die Funktion von RamA als Transkriptionsfaktor essentiell sind. Dieses waren Tryptophan 37 und insbesondere Arginin 41. Da beide in der Peripherie des berechneten RamA-Strukturmodells lokalisiert waren und im Modell in einer sequenzspezifischen Interaktion mit der DNA standen, ist zu vermuten, dass beide Aminosäuren entscheidend sind für die DNA-Interaktion an der *marbox*, die Affinität des Proteins zur DNA sowie für die Selektivität der transkriptionsaktivierenden Wirkung von

RamA. Ein Beweis dafür kann letztlich nur die Aufklärung der tatsächlichen Proteinstruktur bringen. Experimentell ist dieses durch eine kristallographische Darstellung des Proteins möglich, wie sie schon für den nah verwandten Transkriptionsfaktor MarA besteht, auf dessen Struktur das hier erzeugte Modell basiert. Dazu ist es nötig das Protein durch eine gezielte Überexpression anzureichern, zu extrahieren und aufzukonzentrieren. Mit dem erhaltenen Protein sind auch Bindungsstudien an der DNA möglich: mit Hilfe eines EMSAs (*electrophoretic mobility shift assay*). Nur über eine solche Analyse ist es überhaupt möglich die bisher nur postulierte direkte DNA-Interaktion von RamA in *Citrobacter* zu bestätigen. Sofern dieser Beweis erbracht werden sollte, wäre es möglich den genauen Bindungsmodus experimentell zu untersuchen mit der Fragestellung danach, welche Aminosäuren tatsächlich für eine sequenzspezifische Interaktion zwischen RamA und der DNA relevant sind und wie durch diese die Sequenzspezifität gesteuert wird. Experimentell ist es möglich im EMSA das RamA-Protein mit einem DNA-Fragment verschiedener Varianten der marBox binden zu lassen. Das hier erzeugte Modell kann dabei unterstützen die Positionen einer Interaktion abzubilden.

Ist die direkte DNA-Interaktion bestätigt, ist es auch möglich in dem hier erstellten Reportergensystem auf dem Plasmid pHPAR177-01.1 die Sequenzspezifität der Interaktion zu untersuchen. Sinnvoll ist es hier verschiedene marboxen, die aus den regulatorischen Bereichen unterschiedlicher Gene wie *tolC*, *micF* und *marRAB* stammen, mit dem Reporter gen auf dem Plasmid zu fusionieren. Gleichzeitig kann *ramA* mit Hilfe des hier erzeugten Plasmides pHPAR19-01.3 überexprimiert werden. Auf diese Weise könnte geklärt werden, ob RamA unterschiedliche Promotoren mit verschiedenen marboxen auch unterschiedlich stark reguliert. Mit einem weiteren Fusionsprodukt von Reporter gen und dem Promotorbereich von *ramA* auf einem Plasmid wäre auch die Untersuchung einer Autoregulation des Transkriptionsfaktors möglich.

Mit Hilfe eines Plasmides zur Überexpression von *marA*, analog zu dem Plasmid pHPAR19-01.3 zur Überexpression von *ramA*, könnte auch ein Vergleich zwischen beiden Transkriptionsfaktoren MarA und RamA gemacht werden. Nach dem bisherigen Kenntnisstand ist ungeklärt, warum in einigen Enterobakterien mit MarA und RamA zwei Transkriptionsfaktoren mit scheinbar demselben DNA-Bindungsmotiv existieren. Das vorgeschlagene Vergleichsexperiment könnte Aufschluss darüber bringen, ob abhängig von einzelnen Aminosäuren in den Proteinen oder einzelner Basen in der Bindungsbox eine Diskriminierung zwischen den Regulons der beiden Transkriptionsfaktoren möglich ist.

Mit einem Plasmid zur Überexpression von *marA* wäre auch eine weitere Fragestellung adressierbar: die nach der Gewichtung von *marA* und *ramA* für die Resistenzbildung bei Spezies, in denen beide Gene vorkommen, wie z. B. *Salmonella enterica*. So wurde bis heute von zahlreichen Mutationen in der Regulation von *ramA* und einer damit korrelierenden erhöhten

Resistenz berichtet, was für *marA* nicht der Fall ist. Über ein Vergleichsexperiment wäre prüfbar, ob *marA* in *Citrobacter* überhaupt das Potential besitzt einen erhöhten Efflux und damit eine erhöhte Antibiotikaresistenz zu verursachen. Erste Hinweise darauf, dass dies so ist, lieferte das hier durchgeführte Experiment der MHK-Bestimmung bei gleichzeitiger Salicylat-Induktion, die in *E. coli* Stämmen eine *marA*-Überexpression zur Folge hat. Hier konnte ebenfalls eine erhöhte Resistenz beobachtet werden. Um einen direkten Vergleich machen zu können, ist es jedoch wichtig beide Gene auf dieselbe Art überzuexprimieren.

Neben diesen grundlegenden molekularbiologischen Fragestellungen zur Organisation der *ramRA*-Gene, der Regulation und der Funktionsweise des Transkriptionsfaktors RamA ist es ebenso von Interesse den Einfluss einer *ramA*-Überexpression auf die Entstehung klinisch relevanter Resistenzen zu betrachten. In einem mehrstufigen Selektionsversuch, bei dem beispielsweise gegen immer höhere Konzentrationen von Ciprofloxacin resistente Mutanten selektiert werden, könnte untersucht werden, ob Mutationen im *ramRA*-Operon auftauchen und ob solche Mutationen die Bildung klinischer Resistenzen begünstigen. In einem ähnlichen Experiment ließe sich das auch im Vergleich zweier *Citrobacter*-Stämme realisieren, von denen einer das Plasmid pHPAR1-01.3 zur *ramA*-Überexpression trägt und einer, der das Kontrollplasmid pHPAR19-01.1 enthält. Auf diese Weise könnten weitere Schlüsse zur Bedeutung der Überexpression von *ramA* und der damit verbundenen erhöhten Antibiotikatoleranz für die Entstehung klinisch relevanter Resistenzen gezogen werden.

Die aus den vorgeschlagenen Experimenten gewonnenen Erkenntnisse würden so zu einem besseren Verständnis der mechanistischen Grundlagen der Resistenzentwicklung führen. Dieses wird in Zukunft immer wichtiger werden, um Maßnahmen gegen die wachsende Bedrohung durch die zunehmende Antibiotikaresistenzentwicklung ergreifen zu können. Speziell im Fall der multiplen Antibiotikaresistenzen, die sich durch einen erhöhten Efflux manifestieren, wird man in Zukunft wahrscheinlich effektiver mit Hilfe entsprechenden Efflux-Inhibitoren gegen die Resistenzbildung vorgehen können. Die Voraussetzung dazu schafft ein breiter Kenntnisstand zu den Mechanismen der Resistenzbildung, zu dem diese Arbeit ihren Beitrag leisten sollte.

V. Zusammenfassung

Die Häufung von Antibiotikaresistenzen unter Erregern von Infektionskrankheiten stellt heute eine immer größer werdende Bedrohung für den Menschen dar. Dabei sind die zugrundeliegenden Mechanismen der Resistenzbildung häufig das Ergebnis eines mehrstufigen Prozesses, bei dem es zu einer Akkumulation von Resistenzfaktoren kommt. Einer davon kann ein erhöhter Efflux in den Bakterienzellen sein. Dieser erhöhte Efflux wird meist durch eine Veränderung in der Regulation solcher Gene verursacht, die den Efflux steuern. Eines davon ist *ramA*, welches in den Enterobakterien der Gattung *Citrobacter* im Fokus dieser Arbeit stand.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das *ramR-romA-ramA* Operon spezieübergreifend im Genus *Citrobacter* beschrieben. Über eine DNA-Sequenzierung konnten die entsprechenden DNA-Bereiche in Stämmen der Spezies *C. farmeri*, *C. sedlaakii* und *C. werkmanii* eindeutig als homolog zu den für *Salmonella*, *Klebsiella* und *Enterobacter* beschriebenen Genen *ramR*, *romA* und *ramA* identifiziert werden. Über multiple Sequenzvergleiche mit den Sequenzen von *C. freundii*, *C. koseri* und *C. rodentium*, die bereits vor dieser Arbeit publizierten waren, konnte festgestellt werden, dass in allen *Citrobacter* Stämmen die Gene *ramR* und *ramA* hoch konserviert sind, jedoch nicht *romA*, welches einzig in der Spezies *C. rodentium* nicht vorhanden zu sein schien. Dieses konnte über eine Sequenzierung für einen Laborstamm bestätigt werden. Durch die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von RamA konnte außerdem eine hohe Homologie mit den Efflux-induzierenden Transkriptionsfaktoren SoxS und Rob sowie insbesondere MarA bestätigt werden.

Weiter wurde untersucht, inwiefern sich durch die Überexpression von *ramA* aus *Citrobacter freundii* ein multiple drug resistance (MDR)-Phänotyp induzieren lässt. Diese Untersuchung wurde analog zu den Beschreibungen des *ramA* Gens in *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* und *Salmonella enterica* durchgeführt, wobei das *ramA* Gen auf einem *multicopy* Plasmid in die zu untersuchenden Zellen eingebracht wurde. Dadurch konnte ein MDR-induzierender Effekt für *ramA* aus *C. freundii* bestätigt werden. Weiter konnte über die Verwendung eines Effluxpumpenhemmers gezeigt werden, dass dieser Effekt vom Efflux abhängig ist. Außerdem ließ sich der Effekt durch eine heterologe Expression in andere Enterobakterien-Stämme verschiedener Arten und Gattungen übertragen. Mit den Versuchen wurde, zusammen mit den DNA-Sequenzvergleichen, die Homologie des *ramA*-Gens in *Citrobacter* und denen in *Salmonella*, *Klebsiella* und *Enterobacter* abschließend bestätigt.

Um eine erste Vorstellung für eine räumliche Struktur des RamA Proteins zu bekommen, wurde dieses *in silico* auf Grundlage der publizierten Kristallstruktur von MarA, gebunden an ein 22 bp langes DNA-Fragment, dreidimensional modelliert. Das erzeugte Modell zeigte in der Simulation

der Moleküldynamik eine stabile räumliche Struktur in der Interaktion mit der DNA, die über einen Zeitraum von 14 ns erhalten blieb. Somit konnte das Strukturmodell als wahrscheinlich realitätsnah bewertet werden. Die Analyse der Protein-DNA Interaktionen im Modell wies auf eine Beteiligung von lediglich zwei Aminosäuren im N-Terminus und drei Aminosäuren im C-Terminus hin, die jeweils in einem Helix-Turn-Helix-Motiv lokalisiert waren und basenspezifische Wechselwirkungen mit der DNA eingingen. Um eine Wechselwirkung exemplarisch an den N-terminalen Positionen zu prüfen, wurde ein Reporter-gen-Assay entwickelt, der auf der bekannten aktivierenden Wirkung von RamA auf den *pacrAB*-Promotor basierte. Letzterer wurde auf einem Plasmid an ein Luziferase-Reporter-gen gekoppelt und die Promotoraktivität bei gleichzeitiger Überexpression von RamA auf einem Plasmid in *Citrobacter freundii* gemessen. Dabei wurde die Wildtyp Form mit RamA-Varianten verglichen, die Alanin-Substitutionen an den Positionen Tryptophan 37 und Arginin 41 kodierten. Beide Substitutionsvarianten zeigten eine deutlich verminderte Promotoraktivität im Vergleich zum Wildtyp, womit bestätigt werden konnte, dass beide Aminosäuren wie im Modell vorhergesagt, bedeutsam sind für die Funktion des RamA-Proteins als Transkriptionsaktivator. In entsprechenden Modellvarianten konnte dieses in der Simulation der Moleküldynamik insbesondere für die Position Arginin 41 bestätigt werden. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von RamA, MarA und SoxS zeigte, dass diese Positionen in der Familie der AraC/XylS Transkriptionsfaktoren hoch konserviert sind, was die Hypothese der essentiellen Bedeutung dieser Aminosäurepositionen für die Etablierung der Funktion als Transkriptionsfaktor weiter untermauerte. In diesen Untersuchungen wurde ebenfalls die hohe Homologie der beiden Transkriptionsfaktoren RamA und MarA deutlich.

VI. Summary

Antibiotic resistance is a growing threat to humans and the medical treatment of infectious diseases. Pathogens often become resistant through a stepwise process in which different mechanisms accumulate in the genome of one bacterium. A common mechanism is the increased efflux leading to a lowered concentration of antibiotic drugs within the cell. The cells efflux is regulated via a set of genes. The gene *ramA* encodes the regulator RamA in enterobacteria of the genus *Citrobacter*.

In this thesis, the set of genes *ramR-romA-ramA* has been described in species of the genus *Citrobacter*. Via DNA-sequencing, these genes could be identified in *Citrobacter farmeri*, *C. sedlaakii* and *C. werkmanii* and were shown to be homologues to the genes that had been described in *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Salmonella* before. Multiple sequence alignments revealed *ramR* and *romA* to be conserved within the named *Citrobacter* species and also *C. koseri*, *C. freundii* and *C. rodentium*, for which genetic information was already published. The gene *romA* was present in all analysed strains, but not in *C. rodentium*. In this study, this was confirmed via DNA-sequencing in a *C. rodentium* strain. The amino acid sequence of RamA derived from the DNA-sequence of *ramA* also showed a strong homology with the transcription factors SoxS and Rob, but particularly with MarA, which all three also having an impact on the regulation of the efflux in the cell.

Further the mechanisms with which overexpression of *ramA* from *Citrobacter freundii* was capable to induce a multiple drug resistance (mdr)-phenotype were analysed. Analogous to studies that have been published for *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* and *Salmonella enterica*, the *ramA* gene was inserted into the cells on a multi copy plasmid. Thus, it could be shown that overexpression of *ramA* from *C. freundii* was associated with the development of a mdr-phenotype in the *C. freundii* strain. Also strains of further *Citrobacter* species and other enterobacteria developed the mdr-phenotype under heterologous expression. Under usage of an efflux pump inhibitor no mdr-phenotype could be observed, that is indicated by the efflux dependency.

Taken together the results from the DNA-sequence analyses and the *ramA*-overexpression demonstrated the homology of the *ramRA* genes in *Citrobacter* with those described for *Klebsiella*, *Salmonella* and *Enterobacter*.

To gain a first impression of the structure of RamA a three-dimensional model of the transcription factor bound to a 22 bp DNA-fragment was set up in a computational approach. The structure of the model was based on the crystallographic structure information of MarA bound to the DNA-fragment. Molecular dynamics were simulated over a 14 ns time period. The RamA model retained

VI. Summary

structural integrity throughout the simulation, indicating the model to be close to the actual structure of the protein. The *in silico* analysis of the protein-DNA-interaction showed two amino acid positions in the N-terminal and three positions in the C-terminal helix-turn-helix domain to be involved in interaction with the DNAs base pairs. To examine the amino acids of the N-terminus *in vitro*, a reporter gene assay was set up based on the activating effect of RamA on transcription at the *pacrAB*-promotor. This promotor was linked to the reporter gene luciferase, and its activity was measured during simultaneous plasmid mediated over-expression of *ramA* in *Citrobacter freundii*. The wild type form of *ramA* was compared with variants encoding alanine-substitutions for tryptophan 37 and arginine 41. Both variants showed a considerable reduction of transcription activation at the *pacrAB*-promotor. This confirmed both amino acids to be critical in establishing the transcription activating properties of the protein. In addition, the simulation of the molecular dynamics of both variants showed a reduced affinity of the N-terminus to the DNA-fragment, which confirmed the experimental observations. A comparison of the amino acid sequences of the transcriptions factors RamA, MarA and SoxS showed that these positions were strictly conserved within these members of the AraC/XylS-transcription factor family. Finally, these findings underlined the close relation of the two transcription factors RamA and MarA.

VII. Literaturverzeichnis

- Abouzeed, Yousef M, Sylvie Baucheron, and Axel Cloeckaert. 2008. "ramR Mutations Involved in Efflux-Mediated Multidrug Resistance in Salmonella Enterica Serovar Typhimurium." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (7): 2428–34. doi:10.1128/AAC.00084-08.
- "Action at EU Level - European Commission." 2016. Accessed March 12. http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/amr/action_eu/index_en.htm.
- Alekshun, M N, and S B Levy. 1997. "Regulation of Chromosomally Mediated Multiple Antibiotic Resistance: The Mar Regulon." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (10): 2067–75.
- Alekshun, Michael N., and Stuart B. Levy. 1999. "Alteration of the Repressor Activity of MarR, the Negative Regulator of the Escherichia Coli marRAB Locus, by Multiple Chemicals In Vitro." *Journal of Bacteriology* 181 (15): 4669–72.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool." *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403–10. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Andersson, Monique I, and Alasdair P. MacGowan. 2003. "Development of the Quinolones." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 Suppl 1 (May): 1–11. doi:10.1093/jac/dkg212.
- Appelbaum, P. C., and P. A. Hunter. 2000. "The Fluoroquinolone Antibacterials: Past, Present and Future Perspectives." *International Journal of Antimicrobial Agents* 16 (1): 5–15.
- Appleyard, R. K. 1954. "Segregation of New Lysogenic Types during Growth of a Doubly Lysogenic Strain Derived from Escherichia Coli K12." *Genetics* 39 (4): 440–52.
- Ariza, R. R., Z. Li, N. Ringstad, and B. Demple. 1995. "Activation of Multiple Antibiotic Resistance and Binding of Stress-Inducible Promoters by Escherichia Coli Rob Protein." *Journal of Bacteriology* 177 (7): 1655–61.
- Baba, Tomoya, Takeshi Ara, Miki Hasegawa, Yuki Takai, Yoshiko Okumura, Miki Baba, Kirill A Datsenko, Masaru Tomita, Barry L Wanner, and Hirotada Mori. 2006. "Construction of Escherichia Coli K-12 in-Frame, Single-Gene Knockout Mutants: The Keio Collection." *Molecular Systems Biology* 2: 2006.0008. doi:10.1038/msb4100050.
- Bailey, Andrew M., Al Ivens, Rob Kingsley, Jennifer L. Cottell, John Wain, and Laura J. V. Piddock. 2010. "RamA, a Member of the AraC/XylS Family, Influences Both Virulence and Efflux in Salmonella Enterica Serovar Typhimurium." *Journal of Bacteriology* 192 (6): 1607–16. doi:10.1128/JB.01517-09.
- Bailey, Andrew M., Ian T. Paulsen, and Laura J. V. Piddock. 2008. "RamA Confers Multidrug Resistance in Salmonella Enterica via Increased Expression of acrB, Which Is Inhibited by Chlorpromazine." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (10): 3604–11. doi:10.1128/AAC.00661-08.
- Barbara Zechini, Ilaria Versace. 2009. "Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria." *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* 4 (1): 37–50. doi:10.2174/157489109787236256.
- Baucheron, Sylvie, Franck Coste, Sylvie Canepa, Marie-Christine Maurel, Etienne Giraud, Françoise Culard, Bertrand Castaing, Alain Roussel, and Axel Cloeckaert. 2012. "Binding of the RamR Repressor to Wild-Type and Mutated Promoters of the ramA Gene Involved in Efflux-Mediated Multidrug Resistance in Salmonella Enterica Serovar Typhimurium." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (2): 942–48. doi:10.1128/AAC.05444-11.
- Baucheron, Sylvie, Hein Imberechts, Elisabeth Chaslus-Dancla, and Axel Cloeckaert. 2002. "The AcrB Multidrug Transporter Plays a Major Role in High-Level Fluoroquinolone Resistance in Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Phage Type DT204." *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 8 (4): 281–89. doi:10.1089/10766290260469543.
- Baucheron, Sylvie, Kunihiko Nishino, Isabelle Monchaux, Sylvie Canepa, Marie-Christine Maurel, Franck Coste, Alain Roussel, Axel Cloeckaert, and Etienne Giraud. 2014. "Bile-Mediated

- Activation of the *acrAB* and *tolC* Multidrug Efflux Genes Occurs Mainly through Transcriptional Derepression of *ramA* in *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, May, dku140. doi:10.1093/jac/dku140.
- Bavro, Vassiliy N., Zbigniew Pietras, Nicholas Furnham, Laura Pérez-Cano, Juan Fernández-Recio, Xue Yuan Pei, Rajeev Misra, and Ben Luisi. 2008. "Assembly and Channel Opening in a Bacterial Drug Efflux Machine." *Molecular Cell* 30 (1): 114–21. doi:10.1016/j.molcel.2008.02.015.
- Beckman Coulter Inc. 2012. "User Manual: Genome Lab GeXP Genetic Analysis System."
- Bellon, Steven, Jonathan D. Parsons, Yunyi Wei, Koto Hayakawa, Lora L. Swenson, Paul S. Charifson, Judith A. Lippke, Robert Aldape, and Christian H. Gross. 2004. "Crystal Structures of *Escherichia Coli* Topoisomerase IV ParE Subunit (24 and 43 Kilodaltons): A Single Residue Dictates Differences in Novobiocin Potency against Topoisomerase IV and DNA Gyrase." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (5): 1856–64.
- Blondeau, Joseph M. 2000. "A Review of Clinical Trials with Fluoroquinolones with an Emphasis on New Agents." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 9 (2): 383–413. doi:10.1517/13543784.9.2.383.
- Blondeau, 2004. "Fluoroquinolones: Mechanism of Action, Classification, and Development of Resistance." *Survey of Ophthalmology* 49 Suppl 2 (March): S73-78. doi:10.1016/j.survophthal.2004.01.005.
- Blower, Tim R., Benjamin H. Williamson, Robert J. Kerns, and James M. Berger. 2016. "Crystal Structure and Stability of Gyrase-Fluoroquinolone Cleaved Complexes from *Mycobacterium Tuberculosis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (7): 1706–13. doi:10.1073/pnas.1525047113.
- BMG. 2016. "DART 2020." Accessed March 12. <http://www.bmg.bund.de/ministerium/meldungen/2015/dart-2020.html>.
- Brenner, D J, P A Grimont, A G Steigerwalt, G R Fanning, E Ageron, and C F Riddle. 1993. "Classification of *Citrobacteria* by DNA Hybridization: Designation of *Citrobacter Farmeri* Sp. Nov., *Citrobacter Youngae* Sp. Nov., *Citrobacter Braakii* Sp. Nov., *Citrobacter Werkmanii* Sp. Nov., *Citrobacter Sedlakii* Sp. Nov., and Three Unnamed *Citrobacter* Genomospecies." *International Journal of Systematic Bacteriology* 43 (4): 645–58.
- Brenner, D. J., C. M. O'Hara, P. A. Grimont, J. M. Janda, E. Falsen, E. Aldova, E. Ageron, J. Schindler, S. L. Abbott, and A. G. Steigerwalt. 1999. "Biochemical Identification of *Citrobacter* Species Defined by DNA Hybridization and Description of *Citrobacter Gillenii* Sp. Nov. (Formerly *Citrobacter* Genomospecies 10) and *Citrobacter Murliniae* Sp. Nov. (Formerly *Citrobacter* Genomospecies 11)." *Journal of Clinical Microbiology* 37 (8): 2619–24.
- "BSAC - The British Society for Antimicrobial Chemotherapy." 2015. Accessed May 18. <http://bsac.org.uk/>.
- Case, D.A., V. Babin, J.T. Berryman, and R.M. Betz, Q. Cai, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, H. Gohlke, A.W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M. Merz, F. Paesani, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C.L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu and P.A. Kollman. 2014. "AMBER Software Package." University of California, San Francisco.
- Case, Rebecca J., Yan Boucher, Ingela Dahllöf, Carola Holmström, W. Ford Doolittle, and Staffan Kjelleberg. 2007. "Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies." *Applied and Environmental Microbiology* 73 (1): 278–88. doi:10.1128/AEM.01177-06.
- Chang, A C, and S N Cohen. 1978. "Construction and Characterization of Amplifiable Multicopy DNA Cloning Vehicles Derived from the P15A Cryptic Miniplasmid." *Journal of Bacteriology* 134 (3): 1141–56.
- Cheng, Guyue, Haihong Hao, Menghong Dai, Zhenli Liu, and Zonghui Yuan. 2013. "Antibacterial Action of Quinolones: From Target to Network." *European Journal of Medicinal Chemistry* 66 (August): 555–62. doi:10.1016/j.ejmech.2013.01.057.

- Chollet, Renaud, Jacqueline Chevalier, Claude Bollet, Jean-Marie Pages, and Anne Davin-Regli. 2004. "RamA Is an Alternate Activator of the Multidrug Resistance Cascade in *Enterobacter Aerogenes*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (7): 2518–23. doi:10.1128/AAC.48.7.2518-2523.2004.
- Chubiz, Lon M, George D Glekas, and Christopher V Rao. 2012. "Transcriptional Cross Talk within the Mar-Sox-Rob Regulon in *Escherichia Coli* Is Limited to the Rob and marRAB Operons." *Journal of Bacteriology* 194 (18): 4867–75. doi:10.1128/JB.00680-12.
- Chubiz, Lon M., and Christopher V. Rao. 2010. "Aromatic Acid Metabolites of *Escherichia Coli* K-12 Can Induce the marRAB Operon." *Journal of Bacteriology* 192 (18): 4786–89. doi:10.1128/JB.00371-10.
- Clermont, Dominique, Laurence Motreff, Virginie Passet, José-Carlos Fernandez, Chantal Bizet, and Sylvain Brisse. 2015. "Multilocus Sequence Analysis of the Genus *Citrobacter* and Description of *Citrobacter Pasteurii* Sp. Nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, February. doi:10.1099/ijs.0.000122.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition; M07-A9 Vol. 32 No. 2*. 32nd ed. Vol. 2. Wayne, PA, USA. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/03-CLSI-M07-A9-2012.pdf>.
- Cohen, S. P., S. B. Levy, J. Foulds, and J. L. Rosner. 1993. "Salicylate Induction of Antibiotic Resistance in *Escherichia Coli*: Activation of the Mar Operon and a Mar-Independent Pathway." *Journal of Bacteriology* 175 (24): 7856–62.
- Cohen, S P, W Yan, and S B Levy. 1993. "A Multidrug Resistance Regulatory Chromosomal Locus Is Widespread among Enteric Bacteria." *The Journal of Infectious Diseases* 168 (2): 484–88.
- Dangi, B., P. Pelupessey, R. G. Martin, J. L. Rosner, J. M. Louis, and A. M. Gronenborn. 2001. "Structure and Dynamics of MarA-DNA Complexes: An NMR Investigation." *Journal of Molecular Biology* 314 (1): 113–27. doi:10.1006/jmbi.2001.5106.
- Dangi, Bindi, Angela M. Gronenborn, Judah L. Rosner, and Robert G. Martin. 2004. "Versatility of the Carboxy-Terminal Domain of the Alpha Subunit of RNA Polymerase in Transcriptional Activation: Use of the DNA Contact Site as a Protein Contact Site for MarA." *Molecular Microbiology* 54 (1): 45–59. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04250.x.
- Dauga, Catherine. 2002. "Evolution of the gyrB Gene and the Molecular Phylogeny of Enterobacteriaceae: A Model Molecule for Molecular Systematic Studies." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (Pt 2): 531–47.
- Davies, Julian, and Dorothy Davies. 2010. "Origins and Evolution of Antibiotic Resistance." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 74 (3): 417–33. doi:10.1128/MMBR.00016-10.
- Davin-Regli, Anne, Jean-Michel Bolla, Chloë E. James, Jean-Philippe Lavigne, Jacqueline Chevalier, Eric Garnotel, Alexander Molitor, and Jean-Marie Pagès. 2008. "Membrane Permeability and Regulation of Drug 'influx and Efflux' in Enterobacterial Pathogens." *Current Drug Targets* 9 (9): 750–59.
- Davison, J. 1984. "Mechanism of Control of DNA Replication and Incompatibility in ColE1-Type Plasmids--a Review." *Gene* 28 (1): 1–15.
- Delmar, Jared A, Chih-Chia Su, and Edward W. Yu. 2014. "Bacterial Multidrug Efflux Transporters." *Annual Review of Biophysics* 43: 93–117. doi:10.1146/annurev-biophys-051013-022855.
- Delmas, Julien, Franck Breyse, Gregory Devulder, Jean-Pierre Flandrois, and Monique Chomarat. 2006. "Rapid Identification of Enterobacteriaceae by Sequencing DNA Gyrase Subunit B Encoding Gene." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 55 (4): 263–68. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.02.003.
- Dereeper, A., V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J.-F. Dufayard, et al. 2008. "Phylogeny.fr: Robust Phylogenetic Analysis for the Non-Specialist." *Nucleic Acids Research* 36 (Web Server issue): W465-469. doi:10.1093/nar/gkn180.
- Domagk, Gerhard. 1935. "Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen." *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* 61 (07): 250–53. doi:10.1055/s-0028-1129486.

- Domain, Francis, and Stuart B. Levy. 2011. "GyrA Interacts with MarR To Reduce Repression of the marRAB Operon in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 193 (10): 2674. doi:10.1128/JB.00312-11.
- Dong, Tao, Brian K. Coombes, and Herb E. Schellhorn. 2009. "Role of RpoS in the Virulence of Citrobacter Rodentium." *Infection and Immunity* 77 (1): 501–7. doi:10.1128/IAI.00850-08.
- Doran, T. I. 1999. "The Role of Citrobacter in Clinical Disease of Children: Review." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 28 (2): 384–94. doi:10.1086/515106.
- "DSMZ." 2015. Accessed November 2. <https://www.dsmz.de/de/start.html>.
- Du, Dijun, Zhao Wang, Nathan R. James, Jarrod E. Voss, Ewa Klimont, Thelma Ohene-Agyei, Henrietta Venter, Wah Chiu, and Ben F. Luisi. 2014. "Structure of the AcrAB-TolC Multidrug Efflux Pump." *Nature* 509 (7501): 512–15. doi:10.1038/nature13205.
- Duggar, B. M. 1948. "Aureomycin; a Product of the Continuing Search for New Antibiotics." *Annals of the New York Academy of Sciences* 51 (Art. 2): 177–81.
- Duval, Valérie, and Ida M. Lister. 2013. "MarA, SoxS and Rob of Escherichia Coli - Global Regulators of Multidrug Resistance, Virulence and Stress Response." *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* 2 (3): 101–24. doi:10.6000/1927-3037.2013.02.03.2.
- Duval, Valérie, Laura M. McMurry, Kimberly Foster, James F. Head, and Stuart B. Levy. 2013. "Mutational Analysis of the Multiple-Antibiotic Resistance Regulator MarR Reveals a Ligand Binding Pocket at the Interface between the Dimerization and DNA Binding Domains." *Journal of Bacteriology* 195 (15): 3341–51. doi:10.1128/JB.02224-12.
- Dworkin, Martin, and Stanley Falkow. 2006. *The Prokaryotes: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*. Springer Science & Business Media.
- Elkins, Christopher A., and Hiroshi Nikaido. 2002. "Substrate Specificity of the RND-Type Multidrug Efflux Pumps AcrB and AcrD of Escherichia Coli Is Determined Predominantly by Two Large Periplasmic Loops." *Journal of Bacteriology* 184 (23): 6490–98.
- Emmerson, A. M., and A. M. Jones. 2003. "The Quinolones: Decades of Development and Use." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 (suppl 1): 13–20. doi:10.1093/jac/dkg208.
- "EUCAST: EUCAST." 2015. Accessed May 18. <http://www.eucast.org/>.
- Feuerriegel, Silke, and Peter Heisig. 2008. "Role of Global Regulator Rma for Multidrug Efflux-Mediated Fluoroquinolone Resistance in Salmonella." *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)* 14 (4): 259–63. doi:10.1089/mdr.2008.0846.
- Fiser, András, and Andrej Sali. 2003. "Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models." *Methods in Enzymology* 374: 461–91. doi:10.1016/S0076-6879(03)74020-8.
- Fleming, Alexander. 1929. "On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to Their Use in the Isolation of B. Influenzæ." *British Journal of Experimental Pathology* 10 (3): 226–36.
- Fukushima, Masao, Kenichi Kakinuma, and Ryuji Kawaguchi. 2002. "Phylogenetic Analysis of Salmonella, Shigella, and Escherichia Coli Strains on the Basis of the gyrB Gene Sequence." *Journal of Clinical Microbiology* 40 (8): 2779–85.
- Gallegos, M. T., R. Schleif, A. Bairoch, K. Hofmann, and J. L. Ramos. 1997. "Arac/XylS Family of Transcriptional Regulators." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 61 (4): 393–410.
- Gellert, M., K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, T. Itoh, and J. I. Tomizawa. 1977. "Nalidixic Acid Resistance: A Second Genetic Character Involved in DNA Gyrase Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (11): 4772–76.
- George, A M, R M Hall, and H W Stokes. 1995. "Multidrug Resistance in Klebsiella Pneumoniae: A Novel Gene, ramA, Confers a Multidrug Resistance Phenotype in Escherichia Coli." *Microbiology (Reading, England)* 141 (Pt 8) (August): 1909–20.
- Gillette, W. K., R. G. Martin, and J. L. Rosner. 2000. "Probing the Escherichia Coli Transcriptional

- Activator MarA Using Alanine-Scanning Mutagenesis: Residues Important for DNA Binding and Activation." *Journal of Molecular Biology* 299 (5): 1245–55. doi:10.1006/jmbi.2000.3827.
- Graw, Jochen. 2006. *Genetik*. Springer DE.
- Griffith, K. L., and R. E. Wolf. 2001. "Systematic Mutagenesis of the DNA Binding Sites for SoxS in the Escherichia Coli Zwf and Fpr Promoters: Identifying Nucleotides Required for DNA Binding and Transcription Activation." *Molecular Microbiology* 40 (5): 1141–54.
- Griffith, Kevin L., M. Megan Fitzpatrick, Edward F. Keen III, and Richard E. Wolf Jr. 2009. "Two Functions of the C-Terminal Domain of Escherichia Coli Rob: Mediating 'Sequestration–Dispersal' as a Novel Off–On Switch for Regulating Rob's Activity as a Transcription Activator and Preventing Degradation of Rob by Lon Protease." *Journal of Molecular Biology* 388 (3): 415–30. doi:10.1016/j.jmb.2009.03.023.
- Griffith, Kevin L., Ishita M. Shah, and Richard E. Wolf. 2004. "Proteolytic Degradation of Escherichia Coli Transcription Activators SoxS and MarA as the Mechanism for Reversing the Induction of the Superoxide (SoxRS) and Multiple Antibiotic Resistance (Mar) Regulons." *Molecular Microbiology* 51 (6): 1801–16.
- Griffith, Kevin L, and Richard E Wolf Jr. 2002. "A Comprehensive Alanine Scanning Mutagenesis of the Escherichia Coli Transcriptional Activator SoxS: Identifying Amino Acids Important for DNA Binding and Transcription Activation." *Journal of Molecular Biology* 322 (2): 237–57.
- Grkovic, Steve, Melissa H. Brown, and Ronald A. Skurray. 2002. "Regulation of Bacterial Drug Export Systems." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 66 (4): 671–701, table of contents.
- Gu, Mianzhi, and James A. Imlay. 2011. "The SoxRS Response of Escherichia Coli Is Directly Activated by Redox-Cycling Drugs rather than by Superoxide." *Molecular Microbiology* 79 (5): 1136–50. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07520.x.
- Guillier, Maude, Susan Gottesman, and Gisela Storz. 2006. "Modulating the Outer Membrane with Small RNAs." *Genes & Development* 20 (17): 2338–48. doi:10.1101/gad.1457506.
- Gupta, Neha, Camilla Rodrigues, and Rajeev Soman. 2015. "Pioneers in Antimicrobial Chemotherapy." *The Journal of the Association of Physicians of India* 63 (9): 90–91.
- Hachler, H, S P Cohen, and S B Levy. 1991. "marA, a Regulated Locus Which Controls Expression of Chromosomal Multiple Antibiotic Resistance in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 173 (17): 5532–38.
- Hanahan, D. 1983. "Studies on Transformation of Escherichia Coli with Plasmids." *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557–80.
- Hao, Ziyang, Hubing Lou, Rongfeng Zhu, Jiuhe Zhu, Dianmu Zhang, Boxuan Simen Zhao, Shizhe Zeng, et al. 2014. "The Multiple Antibiotic Resistance Regulator MarR Is a Copper Sensor in Escherichia Coli." *Nature Chemical Biology* 10 (1): 21–28. doi:10.1038/nchembio.1380.
- He, Xiao, Paul Szewczyk, Andrey Karyakin, Mariah Evin, Wen-Xu Hong, Qinghai Zhang, and Geoffrey Chang. 2010. "Structure of a Cation-Bound Multidrug and Toxic Compound Extrusion Transporter." *Nature* 467 (7318): 991–94. doi:10.1038/nature09408.
- Heisig, P. 1996. "Genetic Evidence for a Role of parC Mutations in Development of High-Level Fluoroquinolone Resistance in Escherichia Coli." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40 (4): 879–85.
- Heisig, P., and R. Tschorny. 1994. "Characterization of Fluoroquinolone-Resistant Mutants of Escherichia Coli Selected in Vitro." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38 (6): 1284–91.
- Heisig, Peter. 2009. "Type II Topoisomerases--Inhibitors, Repair Mechanisms and Mutations." *Mutagenesis* 24 (6): 465–69. doi:10.1093/mutage/gep035.
- Hentschke, M, M Wolters, I Sobottka, H Rohde, and M Aepfelbacher. 2010. "ramR Mutations in Clinical Isolates of Klebsiella Pneumoniae with Reduced Susceptibility to Tigecycline." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (6): 2720–23. doi:10.1128/AAC.00085-10.
- Higgins, Christopher F. 2007. "Multiple Molecular Mechanisms for Multidrug Resistance Transporters." *Nature* 446 (7137): 749–57. doi:10.1038/nature05630.

- Hirakawa, Hidetada, Asuka Takumi-Kobayashi, Ulrike Theisen, Takahiro Hirata, Kunihiko Nishino, and Akihito Yamaguchi. 2008. "AcrS/EnvR Represses Expression of the acrAB Multidrug Efflux Genes in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 190 (18): 6276–79. doi:10.1128/JB.00190-08.
- Hobbs, Errett C., Xuefeng Yin, Brian J. Paul, Jillian L. Astarita, and Gisela Storz. 2012. "Conserved Small Protein Associates with the Multidrug Efflux Pump AcrB and Differentially Affects Antibiotic Resistance." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (41): 16696–701. doi:10.1073/pnas.1210093109.
- "HOME - Combating Antibiotic Resistance: New Drugs 4 Bad Bugs (ND4BB)." 2016. Accessed March 12. <http://www.nd4bb.eu/>.
- "Home Page - CLSI." 2015. Accessed May 18. <http://clsi.org/>.
- Hooper, David C. 1999. "Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance." *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 2 (1): 38–55. doi:10.1054/drup.1998.0068.
- Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten. 1996. "VMD: Visual Molecular Dynamics." *Journal of Molecular Graphics* 14 (1): 33–38, 27–28.
- Ibarra, J. Antonio, Ernesto Pérez-Rueda, Lorenzo Segovia, and J. Luis Puente. 2008. "The DNA-Binding Domain as a Functional Indicator: The Case of the AraC/XylS Family of Transcription Factors." *Genetica* 133 (1): 65–76. doi:10.1007/s10709-007-9185-y.
- Ishihama, A. 1992. "Role of the RNA Polymerase Alpha Subunit in Transcription Activation." *Molecular Microbiology* 6 (22): 3283–88.
- Jacoby, George A. 2005. "Mechanisms of Resistance to Quinolones." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 41 Suppl 2 (July): S120–126. doi:10.1086/428052.
- Jacoby, George A., Caitlin M. Griffin, and David C. Hooper. 2011. "Citrobacter Spp. as a Source of qnrB Alleles." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (11): 4979–84. doi:10.1128/AAC.05187-11.
- Jacoby, George A., Jacob Strahilevitz, and David C. Hooper. 2014. "Plasmid-Mediated Quinolone Resistance." *Microbiology Spectrum* 2 (2). doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013.
- Jair, Kam-Wing, William P. Fawcett, Nobuyuki Fujita, Akira Ishihama, and Jr. Wolf Richard E. 1996. "Ambidextrous Transcriptional Activation by SoxS: Requirement for the C-Terminal Domain of the RNA Polymerase Alpha Subunit in a Subset of Escherichia Coli Superoxide-Inducible Genes." *Molecular Microbiology* 19 (2): 307–17. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.368893.x.
- Janganan, Thamarai K., Vassiliy N. Bavro, Li Zhang, Maria Inês Borges-Walmsley, and Adrian R. Walmsley. 2013. "Tripartite Efflux Pumps: Energy Is Required for Dissociation, but Not Assembly or Opening of the Outer Membrane Channel of the Pump." *Molecular Microbiology* 88 (3): 590–602. doi:10.1111/mmi.12211.
- Janganan, Thamarai K., Vassiliy N. Bavro, Li Zhang, Dijana Matak-Vinkovic, Nelson P. Barrera, Catherine Venien-Bryan, Carol V. Robinson, Maria Inês Borges-Walmsley, and Adrian R. Walmsley. 2011. "Evidence for the Assembly of a Bacterial Tripartite Multidrug Pump with a Stoichiometry of 3:6:3." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (30): 26900–912. doi:10.1074/jbc.M111.246595.
- Jones, D H, and B H Howard. 1991. "A Rapid Method for Recombination and Site-Specific Mutagenesis by Placing Homologous Ends on DNA Using Polymerase Chain Reaction." *BioTechniques* 10 (1): 62–66.
- Kaase, Martin, and Anja Hauri. 2014. "Epidemiologisches Bulletin - Häufung von KPC-2 Produzierenden Stämmen Verschiedener Enterobacteriaceae-Spezies in Hessen." Robert Koch Institut.
- Kayser, Fritz H., Erik C. Böttger, Rolf M. Zinkernagel, Otto Haller, Johannes Eckert, and Peter Deplazes. 2005. *Medizinische Mikrobiologie*. Vol. 11. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kern, W. V., M. Oethinger, A. S. Jellen-Ritter, and S. B. Levy. 2000. "Non-Target Gene Mutations in the Development of Fluoroquinolone Resistance in Escherichia Coli." *Antimicrobial Agents*

- and Chemotherapy* 44 (4): 814–20.
- Ko, Kwan Soo, Ji-Young Choi, Joo Kim, and Myoung Kyu Park. 2015. "Citrobacter Bitternis Sp. Nov. Isolated from Bitterns." *Current Microbiology* 70 (6): 894–97. doi:10.1007/s00284-015-0810-1.
- Kohanski, Michael A., Daniel J. Dwyer, Boris Hayete, Carolyn A. Lawrence, and James J. Collins. 2007. "A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics." *Cell* 130 (5): 797–810. doi:10.1016/j.cell.2007.06.049.
- Kolínská, Renáta, Petra Spanělová, Michal Dřevínek, Jaroslav Hrabák, and Helena Zemličková. 2015. "Species Identification of Strains Belonging to Genus Citrobacter Using the Biochemical Method and MALDI-TOF Mass Spectrometry." *Folia Microbiologica* 60 (1): 53–59. doi:10.1007/s12223-014-0340-4.
- Komatsu, T, M Ohta, N Kido, Y Arakawa, H Ito, and N Kato. 1991. "Increased Resistance to Multiple Drugs by Introduction of the Enterobacter Cloacae romA Gene into OmpF Porin-Deficient Mutants of Escherichia Coli K-12." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35 (10): 2155–58.
- Komatsu, T., M. Ohta, N. Kido, Y. Arakawa, H. Ito, T. Mizuno, and N. Kato. 1990. "Molecular Characterization of an Enterobacter Cloacae Gene (romA) Which Pleiotropically Inhibits the Expression of Escherichia Coli Outer Membrane Proteins." *Journal of Bacteriology* 172 (7): 4082–89.
- Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, and C. Hughes. 2000. "Crystal Structure of the Bacterial Membrane Protein TolC Central to Multidrug Efflux and Protein Export." *Nature* 405 (6789): 914–19. doi:10.1038/35016007.
- Kruggel, Sebastian, and Thomas Lemcke. 2009. "Generation and Evaluation of a Homology Model of PfGSK-3." *Archiv Der Pharmazie* 342 (6): 327–332. doi:10.1002/ardp.200800158.
- Kwon, H J, M H Bennik, B Demple, and T Ellenberger. 2000. "Crystal Structure of the Escherichia Coli Rob Transcription Factor in Complex with DNA." *Nature Structural Biology* 7 (5): 424–30. doi:10.1038/75213.
- Lamers, Ryan P., Joseph F. Cavallari, and Lori L. Burrows. 2013. "The Efflux Inhibitor Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PAβN) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria." *PLoS ONE* 8 (3): e60666. doi:10.1371/journal.pone.0060666.
- Laponogov, Ivan, Xiao-Su Pan, Dennis A. Veselkov, Katherine E. McAuley, L. Mark Fisher, and Mark R. Sanderson. 2010. "Structural Basis of Gate-DNA Breakage and Resealing by Type II Topoisomerases." *PloS One* 5 (6): e11338. doi:10.1371/journal.pone.0011338.
- Laponogov, Ivan, Maninder K. Sohi, Dennis A. Veselkov, Xiao-Su Pan, Ritica Sawhney, Andrew W. Thompson, Katherine E. McAuley, L. Mark Fisher, and Mark R. Sanderson. 2009. "Structural Insight into the quinolone–DNA Cleavage Complex of Type IIA Topoisomerases." *Nature Structural & Molecular Biology* 16 (6): 667–69. doi:10.1038/nsmb.1604.
- Lau, Sze Yi, and Helen I. Zgurskaya. 2005. "Cell Division Defects in Escherichia Coli Deficient in the Multidrug Efflux Transporter AcrEF-TolC." *Journal of Bacteriology* 187 (22): 7815–25. doi:10.1128/JB.187.22.7815-7825.2005.
- Lavigne, J.-P., C. Defez, N. Bouziges, A. Mahamat, and A. Sotto. 2007. "Clinical and Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant Citrobacter Spp. Infections in a French University Hospital." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 26 (6): 439–41. doi:10.1007/s10096-007-0315-3.
- Lawler, A. J., V. Ricci, S. J. W. Busby, and L. J. V. Piddock. 2013. "Genetic Inactivation of acrAB or Inhibition of Efflux Induces Expression of ramA." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, March. doi:10.1093/jac/dkt069.
- Leshner, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey, and R. P. Brundage. 1962. "1,8-NAPHTHYRIDINE DERIVATIVES. A NEW CLASS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS." *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* 91 (September): 1063–65.
- Lewis, Kim. 2013. "Platforms for Antibiotic Discovery." *Nature Reviews Drug Discovery* 12 (5):

- 371–87. doi:10.1038/nrd3975.
- Li, Xian-Zhi, and Hiroshi Nikaido. 2004. "Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria." *Drugs* 64 (2): 159–204.
- Lin-Chao, S, W T Chen, and T T Wong. 1992. "High Copy Number of the pUC Plasmid Results from a Rom/Rop-Suppressible Point Mutation in RNA II." *Molecular Microbiology* 6 (22): 3385–93.
- Lindorff-Larsen, Kresten, Stefano Piana, Kim Palmo, Paul Maragakis, John L. Klepeis, Ron O. Dror, and David E. Shaw. 2010. "Improved Side-Chain Torsion Potentials for the Amber ff99SB Protein Force Field." *Proteins* 78 (8): 1950–58. doi:10.1002/prot.22711.
- Lipsky, Benjamin A., Edward W. Hook III, Arlene A. Smith, and James J. Plorde. 1980. "Citrobacter Infections in Humans: Experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a Review of the Literature." *Reviews of Infectious Diseases* 2 (5): 746–60.
- Lloyd, Nicholas C., Hugh W. Morgan, Brian K. Nicholson, and Ron S. Ronimus. 2005. "The Composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a Century-Old Debate." *Angewandte Chemie International Edition* 44 (6): 941–44. doi:10.1002/anie.200461471.
- Long, Feng, Chih-Chia Su, Michael T. Zimmermann, Scott E. Boyken, Kanagalaghatta R. Rajashankar, Robert L. Jernigan, and Edward W. Yu. 2010. "Crystal Structures of the CusA Efflux Pump Suggest Methionine-Mediated Metal Transport." *Nature* 467 (7314): 484–88. doi:10.1038/nature09395.
- Ma, D., M. Alberti, C. Lynch, H. Nikaido, and J. E. Hearst. 1996. "The Local Repressor AcrR Plays a Modulating Role in the Regulation of *acrAB* Genes of *Escherichia Coli* by Global Stress Signals." *Molecular Microbiology* 19 (1): 101–12.
- Ma, D, D N Cook, M Alberti, N G Pon, H Nikaido, and J E Hearst. 1993. "Molecular Cloning and Characterization of *acrA* and *acrE* Genes of *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 175 (19): 6299–6313.
- Madigan, Michael T., and John M. Martinko. 2006. *Brock Mikrobiologie*. Vol. 11. Pearson Studium.
- Magiorakos, A.-P., A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, et al. 2012. "Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance." *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (3): 268–81. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Malys, Naglis. 2012. "Shine-Dalgarno Sequence of Bacteriophage T4: GAGG Prevails in Early Genes." *Molecular Biology Reports* 39 (1): 33–39. doi:10.1007/s11033-011-0707-4.
- Martin, R. G., W. K. Gillette, S. Rhee, and J. L. Rosner. 1999. "Structural Requirements for Marbox Function in Transcriptional Activation of Mar/Sox/Rob Regulon Promoters in *Escherichia Coli*: Sequence, Orientation and Spatial Relationship to the Core Promoter." *Molecular Microbiology* 34 (3): 431–41.
- Martin, R. G., W. K. Gillette, and J. L. Rosner. 2000. "Promoter Discrimination by the Related Transcriptional Activators MarA and SoxS: Differential Regulation by Differential Binding." *Molecular Microbiology* 35 (3): 623–34.
- Martin, R G, and J L Rosner. 1995. "Binding of Purified Multiple Antibiotic-Resistance Repressor Protein (MarR) to Mar Operator Sequences." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (12): 5456–60.
- Martin, Robert G., William K. Gillette, Nicholas I. Martin, and Judah L. Rosner. 2002. "Complex Formation between Activator and RNA Polymerase as the Basis for Transcriptional Activation by MarA and SoxS in *Escherichia Coli*." *Molecular Microbiology* 43 (2): 355–70.
- Martin, Robert G, and Judah L Rosner. 2001. "The AraC Transcriptional Activators." *Current Opinion in Microbiology* 4 (2): 132–37. doi:10.1016/S1369-5274(00)00178-8.
- Martin, Robert G., and Judah L. Rosner. 2011. "Promoter Discrimination at Class I MarA Regulon Promoters Mediated by Glutamic Acid 89 of the MarA Transcriptional Activator of *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 193 (2): 506–15. doi:10.1128/JB.00360-10.
- Martinez, Eduardo, Borja Bartolomé, and Fernando de la Cruz. 1988. "pACYC184-Derived Cloning

- Vectors Containing the Multiple Cloning Site and lacZ α Reporter Gene of pUC8/9 and pUC18/19 Plasmids." *Gene* 68 (1): 159–62. doi:10.1016/0378-1119(88)90608-7.
- Matthiessen, Nina. 2007. "Die Rolle Der Expression Und Regulation Der AcrAB/- Und AcrEF/TolC-Effluxpumpe Bei Der Entwicklung Der Fluorchinolonresistenz in Escherichia Coli." Universität Hamburg.
- McDermott, Patrick F., Laura M. McMurry, Isabelle Podglajen, JoAnn L. Dzink-Fox, Thamarai Schneiders, Michael P. Draper, and Stuart B. Levy. 2008. "The marC Gene of Escherichia Coli Is Not Involved in Multiple Antibiotic Resistance." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (1): 382–83. doi:10.1128/AAC.00930-07.
- Merker, Matthias, Camille Blin, Stefano Mona, Nicolas Duforet-Freboung, Sophie Lecher, Eve Willery, Michael G. B. Blum, et al. 2015. "Evolutionary History and Global Spread of the Mycobacterium Tuberculosis Beijing Lineage." *Nature Genetics* 47 (3): 242–49. doi:10.1038/ng.3195.
- Mikolosko, Jonathan, Kostyantyn Bobyk, Helen I. Zgurskaya, and Partho Ghosh. 2006. "Conformational Flexibility in the Multidrug Efflux System Protein AcrA." *Structure (London, England: 1993)* 14 (3): 577–87. doi:10.1016/j.str.2005.11.015.
- Morar, Mariya, and Gerard D. Wright. 2010. "The Genomic Enzymology of Antibiotic Resistance." *Annual Review of Genetics* 44: 25–51. doi:10.1146/annurev-genet-102209-163517.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. "Specific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 Pt 1: 263–73.
- Murakami, Satoshi, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita, Takashi Matsumoto, and Akihito Yamaguchi. 2006. "Crystal Structures of a Multidrug Transporter Reveal a Functionally Rotating Mechanism." *Nature* 443 (7108): 173–79. doi:10.1038/nature05076.
- Murakami, Satoshi, Ryosuke Nakashima, Eiki Yamashita, and Akihito Yamaguchi. 2002. "Crystal Structure of Bacterial Multidrug Efflux Transporter AcrB." *Nature* 419 (6907): 587–93. doi:10.1038/nature01050.
- Mutschler, Ernst, Gerd Geisslinger, Heyo K. Kroemer, and Monika Schäfer-Korting. 2001. *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. Vol. 8. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mgH Stuttgart.
- Naas, Thierry, Daniel Aubert, Nicolas Fortineau, and Patrice Nordmann. 2002. "Cloning and Sequencing of the β -Lactamase Gene and Surrounding DNA Sequences of Citrobacter Braakii, Citrobacter Murlinae, Citrobacter Werkmanii, Escherichia Fergusonii and Enterobacter Cancerogenus." *FEMS Microbiology Letters* 215 (1): 81–87. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11374.x.
- Naber, K. G., and D. Adam. 1998. "Classification of Fluoroquinolones." *International Journal of Antimicrobial Agents* 10 (4): 255–57.
- Nakamura, H. 1965. "Gene-Controlled Resistance to Acriflavine and Other Basic Dyes in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 90 (1): 8–14.
- Nakamura. 1968. "Genetic Determination of Resistance to Acriflavine, Phenethyl Alcohol, and Sodium Dodecyl Sulfate in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 96 (4): 987–96.
- "National Center for Biotechnology Information." 2014. Accessed November 24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Newton, C. R., A. Graham, L. E. Heptinstall, S. J. Powell, C. Summers, N. Kalsheker, J. C. Smith, and A. F. Markham. 1989. "Analysis of Any Point Mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS)." *Nucleic Acids Research* 17 (7): 2503–16.
- Nikaido, Eiji, Etienne Giraud, Sylvie Baucheron, Suguru Yamasaki, Agnès Wiedemann, Kousuke Okamoto, Tatsuya Takagi, Akihito Yamaguchi, Axel Cloeckert, and Kunihiro Nishino. 2012. "Effects of Indole on Drug Resistance and Virulence of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Revealed by Genome-Wide Analyses." *Gut Pathogens* 4 (1): 5. doi:10.1186/1757-4749-4-5.
- Nikaido, Eiji, Akihito Yamaguchi, and Kunihiro Nishino. 2008. "AcrAB Multidrug Efflux Pump Regulation in Salmonella Enterica Serovar Typhimurium by RamA in Response to Environmental Signals." *Journal of Biological Chemistry* 283 (35): 24245–53.

- doi:10.1074/jbc.M804544200.
- Nikaido, Hiroshi, and Jean-Marie Pagès. 2012. "Broad-Specificity Efflux Pumps and Their Role in Multidrug Resistance of Gram-Negative Bacteria." *FEMS Microbiology Reviews* 36 (2): 340–63. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00290.x.
- Nishino, Kunihiko, Eiji Nikaido, and Akihito Yamaguchi. 2009. "Regulation and Physiological Function of Multidrug Efflux Pumps in Escherichia Coli and Salmonella." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1794 (5): 834–43. doi:10.1016/j.bbapap.2009.02.002.
- Nishino, Kunihiko, and Akihito Yamaguchi. 2004. "Role of Histone-like Protein H-NS in Multidrug Resistance of Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 186 (5): 1423–29.
- Oberto, Jacques. 2013. "SyntTax: A Web Server Linking Synteny to Prokaryotic Taxonomy." *BMC Bioinformatics* 14: 4. doi:10.1186/1471-2105-14-4.
- Oethinger, M., W. V. Kern, A. S. Jellen-Ritter, L. M. McMurry, and S. B. Levy. 2000. "Ineffectiveness of Topoisomerase Mutations in Mediating Clinically Significant Fluoroquinolone Resistance in Escherichia Coli in the Absence of the AcrAB Efflux Pump." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (1): 10–13.
- Oethinger, M., I. Podglajen, W. V. Kern, and S. B. Levy. 1998. "Overexpression of the marA or soxS Regulatory Gene in Clinical Topoisomerase Mutants of Escherichia Coli." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42 (8): 2089–94.
- Oliphant, Catherine M., and Gary M. Green. 2002. "Quinolones: A Comprehensive Review." *American Family Physician* 65 (3): 455–64.
- Olliver, Anne, Michel Vallé, Elisabeth Chaslus-Dancla, and Axel Cloeckaert. 2004. "Role of an acrR Mutation in Multidrug Resistance of in Vitro-Selected Fluoroquinolone-Resistant Mutants of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium." *FEMS Microbiology Letters* 238 (1): 267–72. doi:10.1016/j.femsle.2004.07.046.
- O'Regan, Edel, Teresa Quinn, Jean-Marie Pagès, Matthew McCusker, Laura Piddock, and Séamus Fanning. 2009. "Multiple Regulatory Pathways Associated with High-Level Ciprofloxacin and Multidrug Resistance in Salmonella Enterica Serovar Enteritidis: Involvement of RamA and Other Global Regulators." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (3): 1080–87. doi:10.1128/AAC.01005-08.
- Pankey, G. A., and L. D. Sabath. 2004. "Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections." *Clinical Infectious Diseases* 38 (6): 864–70. doi:10.1086/381972.
- Pérez, Astrid, Margarita Poza, Jesús Aranda, Cristina Latasa, Francisco Javier Medrano, María Tomás, Antonio Romero, Iñigo Lasa, and Germán Bou. 2012. "Effect of Transcriptional Activators SoxS, RobA, and RamA on Expression of Multidrug Efflux Pump AcrAB-TolC in Enterobacter Cloacae." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (12): 6256–66. doi:10.1128/AAC.01085-12.
- Petrella, Stephanie, Dominique Clermont, Isabelle Casin, Vincent Jarlier, and Wladimir Sougakoff. 2001. "Novel Class A β -Lactamase Sed-1 from Citrobacter Sedlakii: Genetic Diversity of β -Lactamases within the Citrobacter Genus." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (8): 2287–98. doi:10.1128/AAC.45.8.2287-2298.2001.
- Petrella, Stephanie, Murielle Renard, Nathalie Ziental-Gelus, Dominique Clermont, Vincent Jarlier, and Wladimir Sougakoff. 2006. "Characterization of the Chromosomal Class A Beta-Lactamase CKO from Citrobacter Koseri." *FEMS Microbiology Letters* 254 (2): 285–92. doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00028.x.
- Piddock, Laura J. V. 2006a. "Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria." *Clinical Microbiology Reviews* 19 (2): 382–402. doi:10.1128/CMR.19.2.382-402.2006.
- . 2006b. "Multidrug-Resistance Efflux Pumps ? Not Just for Resistance." *Nature Reviews Microbiology* 4 (8): 629–36. doi:10.1038/nrmicro1464.
- Pomposiello, P. J., M. H. Bennik, and B. Demple. 2001. "Genome-Wide Transcriptional Profiling of the Escherichia Coli Responses to Superoxide Stress and Sodium Salicylate." *Journal of Bacteriology* 183 (13): 3890–3902. doi:10.1128/JB.183.13.3890-3902.2001.

- Pomposiello, P. J., and B. Dimple. 2001. "Redox-Operated Genetic Switches: The SoxR and OxyR Transcription Factors." *Trends in Biotechnology* 19 (3): 109–14.
- Pos, Klaas M. 2009. "Drug Transport Mechanism of the AcrB Efflux Pump." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, Mechanisms of Drug Efflux and Strategies to Combat Them, 1794 (5): 782–93. doi:10.1016/j.bbapap.2008.12.015.
- Pott, Franziska. 2011. "Molekulare Grundlagen Der ramRA-Vermittelten Regulation Der Multidrug Resistance-Effluxpumpe AcrAB-TolC Bei Salmonella Und Citrobacter Freundii." Universität Hamburg. <http://www.shaker.de/de/content/catalogue/index.asp?lang=de&ID=8&ISBN=978-3-8440-0521-9>.
- Pott, Franziska, Anke Heisig, and Peter Heisig. 2011. "Role of the Transcriptional Regulator RamR in Efflux-Mediated Resistance in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of Citrobacter Freundii." DPHG Doktoranden-Tagung, Heringsdorf, Poster 7B, Kurzvortrag.
- Pradel, Elizabeth, and Jean-Marie Pagès. 2002. "The AcrAB-TolC Efflux Pump Contributes to Multidrug Resistance in the Nosocomial Pathogen Enterobacter Aerogenes." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (8): 2640–43.
- Rahmati, Sonia, Shirley Yang, Amy L. Davidson, and E. Lynn Zechiedrich. 2002. "Control of the AcrAB Multidrug Efflux Pump by Quorum-Sensing Regulator SdiA." *Molecular Microbiology* 43 (3): 677–85.
- Rhee, Sangkee, Robert G. Martin, Judah L. Rosner, and David R. Davies. 1998. "A Novel DNA-Binding Motif in MarA: The First Structure for an AraC Family Transcriptional Activator." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (18): 10413–18.
- Ricci, Vito, Jessica M A Blair, and Laura J V Piddock. 2013. "RamA, Which Controls Expression of the MDR Efflux Pump AcrAB-TolC, Is Regulated by the Lon Protease." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, October. doi:10.1093/jac/dkt432.
- Rodríguez-Martínez, José Manuel, María Eliecer Cano, Carmen Velasco, Luis Martínez-Martínez, and Álvaro Pascual. 2010. "Plasmid-Mediated Quinolone Resistance: An Update." *Journal of Infection and Chemotherapy* 17 (2): 149–82. doi:10.1007/s10156-010-0120-2.
- Rosenberg, Emiko Y, Dan Bertenthal, Matthew L Nilles, Kevin P Bertrand, and Hiroshi Nikaido. 2003. "Bile Salts and Fatty Acids Induce the Expression of Escherichia Coli AcrAB Multidrug Efflux Pump through Their Interaction with Rob Regulatory Protein." *Molecular Microbiology* 48 (6): 1609–19.
- Rosenblum, R., E. Khan, G. Gonzalez, R. Hasan, and T. Schneiders. 2011. "Genetic Regulation of the ramA Locus and Its Expression in Clinical Isolates of Klebsiella Pneumoniae." *International Journal of Antimicrobial Agents* 38 (1): 39–45. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.02.012.
- Rosner, Judah L., Bindi Dangi, Angela M. Gronenborn, and Robert G. Martin. 2002. "Posttranscriptional Activation of the Transcriptional Activator Rob by Dipyrindyl in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 184 (5): 1407–16. doi:10.1128/JB.184.5.1407-1416.2002.
- "Rote Liste." 2016. Accessed March 12. <http://online.rote-liste.de/suche/hauptgruppe/10>.
- Routh, Mathew D., Chih-Chia Su, Qijing Zhang, and Edward W. Yu. 2009. "Structures of AcrR and CmeR: Insight into the Mechanisms of Transcriptional Repression and Multi-Drug Recognition in the TetR Family of Regulators." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1794 (5): 844–51. doi:10.1016/j.bbapap.2008.12.001.
- Ruiz, Cristian, and Stuart B Levy. 2013. "Regulation of acrAB Expression by Cellular Metabolites in Escherichia Coli." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, September. doi:10.1093/jac/dkt352.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. "The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees." *Molecular Biology and Evolution* 4 (4): 406–25.
- Sali, A., and T. L. Blundell. 1993. "Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints." *Journal of Molecular Biology* 234 (3): 779–815. doi:10.1006/jmbi.1993.1626.
- Sambrook, Joseph, and David W. Russel. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed.

- Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samonis, G., D. E. Karageorgopoulos, D. P. Kofteridis, D. K. Matthaiou, V. Sidiropoulou, S. Maraki, and M. E. Falagas. 2009. "Citrobacter Infections in a General Hospital: Characteristics and Outcomes." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 28 (1): 61–68. doi:10.1007/s10096-008-0598-z.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. "DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12): 5463–67.
- Schatz, Albert, Elizabeth Bugle, and Selman A. Waksman. 1944. "Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*†." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 55 (1): 66–69. doi:10.3181/00379727-55-14461.
- Schauer, D. B., B. A. Zabel, I. F. Pedraza, C. M. O'Hara, A. G. Steigerwalt, and D. J. Brenner. 1995. "Genetic and Biochemical Characterization of *Citrobacter Rodentium* Sp. Nov." *Journal of Clinical Microbiology* 33 (8): 2064–68.
- Schaumann, Reiner, Nicolas Knoop, Gelimer H. Genzel, Kevin Losensky, Christiane Rosenkranz, Catalina S. Stingu, Wolfgang Schellenberger, Arne C. Rodloff, and Klaus Eschrich. 2013. "Discrimination of Enterobacteriaceae and Non-Fermenting Gram Negative Bacilli by MALDI-TOF Mass Spectrometry." *The Open Microbiology Journal* 7: 118–22. doi:10.2174/1874285801307010118.
- Schneiders, T., S. G. B. Amyes, and S. B. Levy. 2003. "Role of AcrR and RamA in Fluoroquinolone Resistance in Clinical *Klebsiella Pneumoniae* Isolates from Singapore." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (9): 2831–37. doi:10.1128/AAC.47.9.2831-2837.2003.
- Schneiders, Thamarai, and Stuart B. Levy. 2006. "MarA-Mediated Transcriptional Repression of the Rob Promoter." *Journal of Biological Chemistry* 281 (15): 10049–55. doi:10.1074/jbc.M512097200.
- Seeger, Markus A., Kay Diederichs, Thomas Eicher, Lorenz Brandstätter, André Schiefner, François Verrey, and Klaas M. Pos. 2008. "The AcrB Efflux Pump: Conformational Cycling and Peristalsis Lead to Multidrug Resistance." *Current Drug Targets* 9 (9): 729–49.
- Seeger, Markus A., André Schiefner, Thomas Eicher, François Verrey, Kay Diederichs, and Klaas M. Pos. 2006. "Structural Asymmetry of AcrB Trimer Suggests a Peristaltic Pump Mechanism." *Science (New York, N.Y.)* 313 (5791): 1295–98. doi:10.1126/science.1131542.
- Sennhauser, Gaby, Patrick Amstutz, Christophe Briand, Otso Storchenegger, and Markus G. Grütter. 2007. "Drug Export Pathway of Multidrug Exporter AcrB Revealed by DARPin Inhibitors." *PLoS Biology* 5 (1): e7. doi:10.1371/journal.pbio.0050007.
- Seoane, A. S., and S. B. Levy. 1995. "Characterization of MarR, the Repressor of the Multiple Antibiotic Resistance (Mar) Operon in *Escherichia Coli*." *Journal of Bacteriology* 177 (12): 3414–19.
- Shah, Ishita M., and Richard E. Wolf. 2006. "Sequence Requirements for Lon-Dependent Degradation of the *Escherichia Coli* Transcription Activator SoxS: Identification of the SoxS Residues Critical to Proteolysis and Specific Inhibition of in Vitro Degradation by a Peptide Comprised of the N-Terminal 21 Amino Acid Residues." *Journal of Molecular Biology* 357 (3): 718–31. doi:10.1016/j.jmb.2005.12.088.
- Shousha, Amira, Nattakarn Aawaiwanont, Dmitrij Sofka, Frans J. M. Smulders, Peter Paulsen, Michael P. Szostak, Tom Humphrey, and Friederike Hilbert. 2015. "Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes." *Applied and Environmental Microbiology* 81 (14): 4600–4606. doi:10.1128/AEM.00872-15.
- Sitnikov, D. M., J. B. Schineller, and T. O. Baldwin. 1996. "Control of Cell Division in *Escherichia Coli*: Regulation of Transcription of *ftsQA* Involves Both *rpoS* and *SdiA*-Mediated Autoinduction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America* 93 (1): 336–41.
- Skarstad, K., B. Thöny, D. S. Hwang, and A. Kornberg. 1993. “A Novel Binding Protein of the Origin of the Escherichia Coli Chromosome.” *The Journal of Biological Chemistry* 268 (8): 5365–70.
- Stark, Michael J. R. 1987. “Multicopy Expression Vectors Carrying the Lac Represser Gene for Regulated High-Level Expression of Genes in Escherichia Coli.” *Gene* 51 (2–3): 255–67. doi:10.1016/0378-1119(87)90314-3.
- Straaten, Tahar van der, Riny Janssen, Dik J. Mevius, and Jaap T. van Dissel. 2004. “Salmonella Gene Rma (ramA) and Multiple-Drug-Resistant Salmonella Enterica Serovar Typhimurium.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 (6): 2292–94. doi:10.1128/AAC.48.6.2292-2294.2004.
- Stuber, D, and H Bujard. 1981. “Organization of Transcriptional Signals in Plasmids pBR322 and pACYC184.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (1): 167–71.
- Su, Chih-Chia, Hiroshi Nikaido, and Edward W. Yu. 2007. “Ligand-Transporter Interaction in the AcrB Multidrug Efflux Pump Determined by Fluorescence Polarization Assay.” *FEBS Letters* 581 (25): 4972–76. doi:10.1016/j.febslet.2007.09.035.
- Su, Chih-Chia, Denae J. Rutherford, and Edward W. Yu. 2007. “Characterization of the Multidrug Efflux Regulator AcrR from Escherichia Coli.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361 (1): 85–90. doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.175.
- Sulavik, Mark C., Chad Houseweart, Christina Cramer, Nilofer Jiwani, Nicholas Murgolo, Jonathan Greene, Beth DiDomenico, et al. 2001. “Antibiotic Susceptibility Profiles of Escherichia Coli Strains Lacking Multidrug Efflux Pump Genes.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (4): 1126–36. doi:10.1128/AAC.45.4.1126-1136.2001.
- Swick, Michelle C., Sonia K. Morgan-Linnell, Kimberly M. Carlson, and Lynn Zechiedrich. 2011. “Expression of Multidrug Efflux Pump Genes acrAB-tolC, mdfA, and norE in Escherichia Coli Clinical Isolates as a Function of Fluoroquinolone and Multidrug Resistance.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (2): 921–24. doi:10.1128/AAC.00996-10.
- Tamura, Norihisa, Satoshi Murakami, Yoshiaki Oyama, Masaji Ishiguro, and Akihito Yamaguchi. 2005. “Direct Interaction of Multidrug Efflux Transporter AcrB and Outer Membrane Channel TolC Detected via Site-Directed Disulfide Cross-Linking.” *Biochemistry* 44 (33): 11115–21. doi:10.1021/bi050452u.
- Tavío, María M., Virginia D. Aquili, José B. Poveda, Nuno T. Antunes, Javier Sánchez-Céspedes, and Jordi Vila. 2010. “Quorum-Sensing Regulator sdiA and marA Overexpression Is Involved in in Vitro-Selected Multidrug Resistance of Escherichia Coli.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (6): 1178–86. doi:10.1093/jac/dkq112.
- Tenover, Fred C. 2006. “Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria.” *American Journal of Infection Control* 34 (5 Suppl 1): S3-10-73. doi:10.1016/j.ajic.2006.05.219.
- Thanassi, D. G., L. W. Cheng, and H. Nikaido. 1997. “Active Efflux of Bile Salts by Escherichia Coli.” *Journal of Bacteriology* 179 (8): 2512–18.
- Tikhonova, Elena B., Yoichi Yamada, and Helen I. Zgurskaya. 2011. “Sequential Mechanism of Assembly of Multidrug Efflux Pump AcrAB-TolC.” *Chemistry & Biology* 18 (4): 454–63. doi:10.1016/j.chembiol.2011.02.011.
- Tikhonova, Elena B., and Helen I. Zgurskaya. 2004. “AcrA, AcrB, and TolC of Escherichia Coli Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex.” *The Journal of Biological Chemistry* 279 (31): 32116–24. doi:10.1074/jbc.M402230200.
- Townsend, Stacy M., Harvey A. Pollack, Ignacio Gonzalez-Gomez, Hiroyuki Shimada, and Julie L. Badger. 2003. “Citrobacter Koseri Brain Abscess in the Neonatal Rat: Survival and Replication within Human and Rat Macrophages.” *Infection and Immunity* 71 (10): 5871–80.
- Usui, Masaru, Hidetaka Nagai, Mototaka Hiki, Yutaka Tamura, and Tetsuo Asai. 2013. “Effect of Antimicrobial Exposure on AcrAB Expression in Salmonella Enterica Subspecies Enterica Serovar Choleraesuis.” *Frontiers in Microbiology* 4: 53. doi:10.3389/fmicb.2013.00053.

- Vaccaro, Loredana, Kathryn A. Scott, and Mark S. P. Sansom. 2008. "Gating at Both Ends and Breathing in the Middle: Conformational Dynamics of TolC." *Biophysical Journal* 95 (12): 5681–91. doi:10.1529/biophysj.108.136028.
- Van Boeckel, Thomas P., Sumanth Gandra, Ashvin Ashok, Quentin Caudron, Bryan T. Grenfell, Simon A. Levin, and Ramanan Laxminarayan. 2014. "Global Antibiotic Consumption 2000 to 2010: An Analysis of National Pharmaceutical Sales Data." *The Lancet. Infectious Diseases* 14 (8): 742–50. doi:10.1016/S1473-3099(14)70780-7.
- Veen, S. Q. van, E. C. J. Claas, and Ed J. Kuijper. 2010. "High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories." *Journal of Clinical Microbiology* 48 (3): 900–907. doi:10.1128/JCM.02071-09.
- Wang, X D, P A de Boer, and L I Rothfield. 1991. "A Factor That Positively Regulates Cell Division by Activating Transcription of the Major Cluster of Essential Cell Division Genes of Escherichia Coli." *The EMBO Journal* 10 (11): 3363–72.
- Webber, Mark A, Andrew M Bailey, Jessica M A Blair, Eirwen Morgan, Mark P Stevens, Jay C D Hinton, Al Ivens, John Wain, and Laura J V Piddock. 2009. "The Global Consequence of Disruption of the AcrAB-TolC Efflux Pump in Salmonella Enterica Includes Reduced Expression of SPI-1 and Other Attributes Required to Infect the Host." *Journal of Bacteriology* 191 (13): 4276–85. doi:10.1128/JB.00363-09.
- Werkman, C. H., and G. F. Gillen. 1932. "Bacteria Producing Trimethylene Glycol." *Journal of Bacteriology* 23 (2): 167–82.
- Werle, E., C. Schneider, M. Renner, M. Völker, and W. Fiehn. 1994. "Convenient Single-Step, One Tube Purification of PCR Products for Direct Sequencing." *Nucleic Acids Research* 22 (20): 4354–55.
- Yamasaki, Suguru, Eiji Nikaido, Ryosuke Nakashima, Keisuke Sakurai, Daisuke Fujiwara, Ikuo Fujii, and Kunihiro Nishino. 2013. "The Crystal Structure of Multidrug-Resistance Regulator RamR with Multiple Drugs." *Nature Communications* 4 (June). doi:10.1038/ncomms3078.
- Yang, Shirley, Christopher R. Lopez, and E. Lynn Zechiedrich. 2006. "Quorum Sensing and Multidrug Transporters in Escherichia Coli." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (7): 2386–91. doi:10.1073/pnas.0502890102.
- Yassien, Mahmoud A, Hosam E Ewis, Chung-Dar Lu, and Ahmed T Abdelal. 2002. "Molecular Cloning and Characterization of the Salmonella Enterica Serovar Paratyphi B Rma Gene, Which Confers Multiple Drug Resistance in Escherichia Coli." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (2): 360–66.
- Yim, Grace, Waldan Kwong, Julian Davies, and Vivian Miao. 2013. "Complex Integrons Containing qnrB4-ampC (bla(DHA-1)) in Plasmids of Multidrug-Resistant Citrobacter Freundii from Wastewater." *Canadian Journal of Microbiology* 59 (2): 110–16. doi:10.1139/cjm-2012-0576.
- Yu, Edward W., Julio R. Aires, Gerry McDermott, and Hiroshi Nikaido. 2005. "A Periplasmic Drug-Binding Site of the AcrB Multidrug Efflux Pump: A Crystallographic and Site-Directed Mutagenesis Study." *Journal of Bacteriology* 187 (19): 6804–15. doi:10.1128/JB.187.19.6804-6815.2005.
- Zhang, Rong, Lijiang Yang, Jia Chang Cai, Hong Wei Zhou, and Gong-Xiang Chen. 2008. "High-Level Carbapenem Resistance in a Citrobacter Freundii Clinical Isolate Is due to a Combination of KPC-2 Production and Decreased Porin Expression." *Journal of Medical Microbiology* 57 (3): 332–37. doi:10.1099/jmm.0.47576-0.
- Zheng, Jie, Shenghui Cui, and Jianghong Meng. 2009. "Effect of Transcriptional Activators RamA and SoxS on Expression of Multidrug Efflux Pumps AcrAB and AcrEF in Fluoroquinolone-Resistant Salmonella Typhimurium." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63 (1): 95–102. doi:10.1093/jac/dkn448.
- Zheng, Jie, Fei Tian, Shenghui Cui, Jiuzhou Song, Shaohua Zhao, Eric W Brown, and Jianghong Meng. 2011. "Differential Gene Expression by RamA in Ciprofloxacin-Resistant Salmonella

- Typhimurium." *PloS One* 6 (7): e22161. doi:10.1371/journal.pone.0022161.
- Zipperer, Alexander, Martin C. Konnerth, Claudia Laux, Anne Berscheid, Daniela Janek, Christopher Weidenmaier, Marc Burian, et al. 2016. "Human Commensals Producing a Novel Antibiotic Impair Pathogen Colonization." *Nature* 535 (7613): 511–16. doi:10.1038/nature18634.

Internetquellen:

- "Action at EU Level - European Commission." 2016. Accessed March 12. http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/amr/action_eu/index_en.htm.
- "BSAC - The British Society for Antimicrobial Chemotherapy." 2015. Accessed May 18. <http://bsac.org.uk/>.
- "DSMZ." 2015. Accessed November 2. <https://www.dsmz.de/de/start.html>.
- "HOME - Combating Antibiotic Resistance: New Drugs 4 Bad Bugs (ND4BB)." 2016. Accessed March 12. <http://www.nd4bb.eu/>.
- "Home Page - CLSI." 2015. Accessed May 18. <http://clsi.org/>.
- "National Center for Biotechnology Information." 2014. Accessed November 24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- "Rote Liste." 2016. Accessed March 12. <http://online.rote-liste.de/suche/hauptgruppe/10>.
- BMG. 2016. "DART 2020." Accessed March 12. <http://www.bmg.bund.de/ministerium/meldungen/2015/dart-2020.html>.
- EUCAST: EUCAST. 2015. Accessed May 18. <http://www.eucast.org/>.

VIII. Anhang

VIII.1 Ergänzende Sequenzdaten zur vorliegenden Arbeit

VIII.1.1 Sequenzierung von *ramRA* in den *Citrobacter* Spezies:

Im Folgenden sind die vollständigen DNA-Sequenzen der drei Stämme *Citrobacter farmeri* (GK2519), *C. sedlakii* (GK2552) und *C. werkmanii* (GK708) aufgeführt jeweils unter Angabe der eingesetzten Primer in den einzelnen *reads* der Sequenzierungen.

VIII.1.1.1 Contig-Sequenz des *ramRA*-Operons in *Citrobacter farmeri* GK2519

gelb: *ramR*, türkis: *ramA*, unterstrichen: *romA*

CAGCGTTTTTCGTCCA **TTATGCTTCCTCACGGGTGAGGGCGGCCACATCGCTTCAAAGCCCAGGGAGATAAATTCGCTGGCGCAGTTCGGTTC**
GCGAGCGGCAAATTCATCGTCGTTTTCTGCCAGCGTTAAAAACAGCGCATCGCCGAAGGCGCGATACTCATCGGACATAAAGACTGGCAGTACC
GAACGGTGACAGAGATCGCGTAGCTCGGGAAACAGATCGTCGGCTTTCTGTCCGCTCTTTTGGTGATTTTTTCGCTGACTGCTAACTGGCGAA
TGGCGCGATGTCCTGCGTATGGTTGAGACCCCACTGATATAGTTGCTCCAGATGTAAGGTCAGCACTTTGTTATCCGTCAGTGAACGATC
GAGGTTTTCGATCAGCGACTGGCAAAGATCCTGTTAAGATGAAGATAAAGTTGCTTGATTAACTCGTCTTTTGTGCGGAAATAGCGAAACAA
GTTCTTCCCGCACGCTGCGTTACGGGCTATCACAGCGGTAGATGCCGCGATCCCGGATTGCGCAATAGCTGTGGTTGCAGCCTCCAGTAATGC
CTGTTTTTTGTCTTACTCTTCGGACGAGCCACTACACTTTACCCTTAAGATTGTCTAAAAAGGTGATTGAAACACGGCCTTTCAGCGCCGCAA
CGGTGAATGTCAAAGATTGAAAAATCATCTTGACGCGAAACTTCGGATTCTATAATGAGTGCTTACTCACTCATAATCAAGAGTCAGTCGCGCA
AACCATCGGACTGGAGCGCGTTTTACAGGTCAGGATATGAAGCCTCTCTCCGTTTGTGTGGTGGTTATTATGCTCATTGCCAGTGCAGCAACGTT
ACCGTTTTGTCTCAATGCGGGCTTCGGCCAGGCACCGCAGGGTCTGAGCTTAGTCAGGTAGAGCAATCTGCGAACTACCGTGACGGGCAATTTT
ATAATCAGGTGCCAACGCCGGGTATACCGGAAACAAAAGTATGCTCGCGCATGGTGGGAGTTTCTGGTCGCGAAGCGTGAAAAATGCGCGACC
AGCCAGCCATTACCCCTGGTTGCCACCGATCTTGCCAGCCTGCCGTTGAGCAGAATACCTGATCTGGCTGGGGCACTCCTCGTGGTACCTGC
AACTGGGCGGCAAACGTATTCTGATCGACCCGTTTTTCAGCAGTTACGCCCGCGCTTTTCGTTCTCAACAAAGCGTTTCGCGGGGAGTATCCG
TGGACAGCACAGGCGATGCCGGAGATCGACCTGCTGATCGTTTTCGCACGATCACTATGACCATCTGGATTACGCCACCATCACCGCATTAATGCC
GAAGGTGAAGCGGTGCTTACGCCGCTTGGCGTCGGCTCGCATCTGCGTTACTGGGGAATGAATGGCGACATTATTGAAGAGCGTGACTGGAAT
CAGTCCGTCAGAGTCGATGATTCGCTGATGATCCAGTCTGCCCGCACGACATTTTTCCGGGCGTGGCATCAAGCGCAACCAGACGCTGTGGGC
CAGTTTTCTGTTCGAAACACCGGAACAGAAGATTTATTACAGCGGTGACTCGGGCTATGGCCCGCATTTTCAGGGCGATTGGCGAACAGTTTGGC
GGCATCGATCTTGCCATTATGGAGAACGGCCAATATGACCAGGACTGGAAGTATATTACATGATGCCGGAAGAGACCGCGCAGGCCGCTCTGG
ATTTGCGGGCAAAGCGATTTTGCCCGTCTATGCCGGACGCTTTGTGCTGGCAAAGCATAGCTGGGATGACCTTACAAACGACTGGCACTGGCC
AGTCGAAATAAAGCGTACCGCTGCTCACCCCGATGCAGGGTGAACCGGTGAAGCTGGACGATTCAGCGCAACGGTTTTACCACATGGTGGGATC
AGGCAACATATTTGCAGGAGAGGAGTCCCGA **ATGACCATTCTGCTCAGTTATCGACAGCATTGTCGAGTGGATAGATGATAATTGAATCAG**
CCGCTCGTATTGACGAGATCGCACGCCATGCGGGTTATTCCAAATGGCACTTGCAGCGCTGTTTTGTCAGTACAAAGGGGAGAGCCTGGGGC
GCTACATTCGCGAGCGCAAACCTGCTGCTGGCGGCGGGATCTGCGCGAATCCGACGCAAAAGTGTATGACATTTGTCTGCGCTACGGTTTTGAC
TCCCAGCAGACCTTACCCTGTTTTTACCCTACGTTTAAACCAGCGCGGGTGCTACCGTAAAGAAAATCACAGTCGGGCGCACTGATCCTT
TCCTGGTAGCGAGAGCTATCAGGAACGGTTTTCCCTGTCTTAGCGTCTCTGCAATTGCCTAAATATTATTGCAAATAATTCACATTTACATTAGCG
TGCTAACAAATTCATAAGGAATGGTTGGCCAATGAAGATGGCGTGGAGTGGTTTTGCTTCTTGGGCTGGG

VIII. Anhang

Tabelle VIII-1: Auflistung der Reads der Sequenzierung des *ramRA*-Operons in *Citrobacter farmeri* GK2519 mit den dafür jeweils eingesetzten Primern.

Read	Primer Seq	Primer PCR
A8 15_02_12 ramA fw 2519	A8(2519)	A8(2519)/downA2
downA2 10_02_12 ramA rv 2519	downA2	A8(2519)/downA2
A7 21_12_11 ramA rv 2519	A7	ro4(2519)/A7
ro4 21_12_11 romAramA fw 2519	ro4(2519)	ro4(2519)/A7
ro4 30_11_11 romAramA fw 2519	ro4(2519)	ro4(2519)/A3
A3 06_09_11 ramA rv 2519	A3	R5/A3
ro3 23_11_11 romA rv 2519	ro3(1189+2519)	ro2(2519)/ro3(1189+2519)
ro2 23_11_11 romA fw 2519	ro2(2519)	ro2(2519)/ro3(1189+2519)
R5 06_09_11 ramR fw 2519	R5	R5/A3
ro1 30_11_11 romAramR rv 2519	ro1(1189+2519)	R5/ro1(1189+2519)
R2 23_02_12 ramR rv 2519	R2	R3/R2
R2 19_07_11 ramR rv 2519	R2	R1/R2
R4 15_02_12 ramR rv 2519	R4	downR1/R4
downR1 10_02_12 ramR fw 2519	downR1	downR1/R4
ro6_c 10_05_12 romA fw 2519	ro6 c	ro6 c/ro7 c
ro7_c 10_05_12 romA rev 2519	ro7 c	ro6 c/ro7 c

VIII.1.1.2 Contig-Sequenz des *ramRA*-Operons in *Citrobacter sedlakii* GK2552

gelb: *ramR*, türkis: *ramA*, unterstrichen: *romA*

CAGCGTTTTATCATTCA**T**CAGAAT**T**CTCGCGGGT**G**AGGGCGCGCCACATCGCTTCAA**A**ACCGAGAGAGATAAACTCACTGGCGCGAGCCGGTT**C**
CCGAGTGGCAA**A**CTCCATGGTGGTT**C**CGCCAGAGT**T**AAAAACAGCGCGT**C**CGCGAAGGCGCGATAT**T**CGTCTGACATAAAAGACCGGCAGGACC
GCACGGTGGCAAAGATCGTGCAGCTCAGGAAACATGGCGT**C**CGGCTTT**T**GGTCTGTCTCTTTGGT**G**ATTTCTCGCTGACCGCCAGTTGGCGTAT
CCGCGGGTGC**C**CGTCTGT**T**CCAGCCCCAGCGGATATAGCTGCTCCAGATATAAAAGGTCATCGCTTTGGCATCGGTCAGCGAACGATCCA
GCTGGCGATCATTGACTGACACAGGCTGTGCTTAAGATGGAGGTAAAGTT**C**GGTAA**T**AACTCGTCTTTGGT**C**CGGAAATAGCGAAACAATGT
TCTTCCGCCACGCTGCATTGCGGGCAATCACGGCGGTAGAACCCGCGATCCCGACTGCGCGATTGCCGTGGT**T**GCTGCCTCCAGTAATGCCA
GTTTTTTGTCT**T**CACTCT**T**CGGACGAGCCAC**T**ACATTTTACCCTTATCAGTCTAAAACCGAATTGAAACACGGCCTTTGCAGCGCCGCAACGGG
GAATGTCAAAGATGAAAAACGCTTTGACGCGAAATTTCCGATTTCTATAATGAGTGCTTACTCACTCATAATCAAGAGTCAGCCGCGCAGACT
ACCGGACGGGAGCGGTTTTCAGGTCAGGATATGAAGCGTCTCACAGTTTGTGTGGTTTATGATGATCATTGCCAGTCCCGCAACGTTACCG
TTTGTCTCAATGCTGGCTTCGGTCAGGCGCCGCAAGGGGCTCAGCTCAGCCAGTTTGAACAGTCCGTC**A**ATTATCGTGATGGGCAAT**T**CCATAA
TCAGGTGCCAGGGCCGGGCTATACCGGAAATAAAAGTCTGCTGGCGGCTGGTGGGAATTCTGGT**C**CGAAAGCGAGAGAAACCGCGCTCCGGCC
CAGCCGTTACCGCTGGTAGCGACCGATATTGCAGCTCTGCCCGGACAGGGACACGCTGATCTGGCTCGGCCACTCGTCTGGTATTTGCAGCT
CGGCGGAAACGCATTTCTGATCGACCGGCTTTCAGCCGTTATGCGGCGCGTTTTCTTTTCTCAACAAAGCGTTTGT**C**GGCGATTACCCCTGGA
CCGCCAGGCAATGCCGGCGATCGATCTGCTGATCATTCTCACGATCATTATGACCATCTGGATTACGCCACCATCAAGGCGTTGATGCCAAAA
GTGAAGCGGGTGATTACGCCGCTCGGCGTCCGTTTCGATTTGCGGTA**T**GCGGTA**T**GAGGAGCGTGACTGGCACCAGT
CTGTGCGGGTGGATGACGGGCTTTATATTCAGTACTGCCCGCCGCATTTTCCGGACGCGGCATCAAGCGTAACCAGACGCTGTGGCCAGT
TTTCTGTTTGAACGCCGGAACAGAAAATTTACTACAGCGCGACTCTGGCTACGGCCCGCACTTTCCGGCGATTGGCGAACAGTTTGGCGCGA
TCGACCTGGCGATCATGAAAACGGTCA**G**TACGACCCGGACTGGAAATACATCCACATGATGCCGGAGGAAACCGCTCAGCGGCACAGGATCT
CGGCGCAGAGCCATCTACC**G**GGCATGCCGACGTTTGTGCTGGCGAAACACACCTGGGATGATCCTTATAAGCGGCTGGCGCTGGCCAGCC
GTGATAAACCTACCGCTGCTCACTCCGACGCTGGGCGAACCGGTGAAGCTCGACGATCCGGCGCAACAGTTCACGGCATGGTGGGAGAACAG
AGCAATTTGCAGGAGAGGAGTGCTGA**ATG**ACCATT**T**CTGCTCAGTAATCGACACCATTGT**C**GAA**T**GGATTGATGAAAATTTGAATCAACCGTT
CGGTATTGACGATATCGCCCGCACGCGGGTATTCCAAGTGGCATTTGCAGCGCTTTTTTATG**C**AGTACAAAGGGGAGAGTCTCGGACGCTAC

VIII. Anhang

ATCCGCGAGCGTAAGCTGCTGCTGGCGGCGCGGGATTGCGCGAATCCGACGAAAAAGTATACGATATCTGTTTGGCGCTACGGTTTTGATTTCG
 AGCAGACGTTTACCCGCATCTTTACCCGCACGTTTAATCAGCCGCCGGCGCTACCGCAAAGAGAACCACAGCCGGACACACCCGGCATAGTGT
 TATCAGGCCGCGACAGGCAGAGTAACATTCCGCTTACAAATCTTATTGCAAATCATTTCCATTTACATTAGCGTGGCTAACACATTTCTTCAGG
 AACGGTTAGCCAATGAAAATGGCGTGGAGTGGTTTGTCTCTGGGGCTGGGAACCTGTGGCTCAGGGGATGCCCTGTTCGACTCCCTCGCTCTA
 CGGCGAGCAGCAGGAAAATTTGATGCCAGCGGCAAGTCTGTTTTGTCTTCTCCGCTAAACGAAAACATATGTTCCGCAACGCTGTCCGGCG
 TCAC

Tabelle VIII-2: Auflistung der *reads* der Sequenzierung des *ramRA*-Operons in *Citrobacter sedlakii* GK2552 mit den dafür jeweils eingesetzten Primern.

Read	Primer Seq	Primer PCR
A2 17_05_11 ramA rv 2552	A2	A1/A2
A7 21_12_11 ramA rv 2552	A7	ro4(2552)/A7
ro4 21_12_11 romA fw 2552	ro4(2552)	ro4(2552)/A7
ro4 30_11_11 romA fw 2552	ro4(2552)	ro4(2552)/A3
A3 06_09_11 romA rv 2552	A3	R5/A3
ro3 23_11_11 romA rev 2552	ro3(2552)	ro2(2552)/ro3(2552)
ro2 23_11_11 romA fw 2552	ro2(2552)	ro2(2552)/ro3(2552)
R5 06_09_11 romA fw 2552	R5	R5/A3
R5 21_12_11 ramR fw 2552	R5	R5/ro1(2552)
ro1 30_11_11 romA rv 2552	ro1(2552)	R5/ro1(2552)
ro1 21_12_11 romA rv 2552	ro1(2552)	R5/ro1(2552)
R4 15_02_12 ramR rv 2552	R4	downR1/R4
R4 23_02_12 ramR rv 2552	R4	downR1/R4
R1 19_07_11 ramR fw 2552	R1	R1/R2
R2 19_07_11 ramR rv 2552	R2	R1/R2
downR1 23_02_12 ramR fw 2552	downR1	downR1/R4
A8 10_05_12 ramA fw 2552	A8(2552)	A8(2552)/downA3
downA3 10_05_12 ramA rv 2552	downA3	A8(2552)/downA3
R5 10_05_12 romA fw 2552	R5	R5/ro3
ro3 10_05_12 romA rev 2552	ro3	R5/ro3
2552-ramA-rev R4	R4	downR1/R4
2552-ramR-fw dR1	downR1	downR1/R4

VIII.1.1.3 Contig-Sequenz des *ramRA*-Operons in *Citrobacter werkmanii* GK708

gelb: *ramR*, türkis: *ramA*, unterstrichen: *romA*

CGCAAGGCGCTTCGCGCAGACATGCAGTGTCTTCCATCCA **TATTTTTCTCGCGGGTCAGGGCGCGCCACATGGCTTCAAACCCCAACGAAAT**
GTATTCAGTCGCGCGGGCAGGGTTGCGGGCAGCGAATTCATGGTTGTTTCTGCAAGTGTCAAAAAAAGTCCGTCGCCGAAGCGCGATACTCG
TCCGACATAAATTCAGGTCGCACGGAGCGATGACAAAGATCGCGCAGTTCGGGAACATATCGTCAGCCTGCTGTTTCTTTGCTGATTTT
CTCGCTGACGGCCAACGACGAATGGTGCATGTCCGAGGTATGATTCAGACCCAGCTAATGTAGCTGTTCCAGATGTAGTGAGTCATGGTT
TTGGCATCGGTCACTGAACGGTCCAGATTGGCCATCATCGACTGGCAGAGATCGTGTTTAAAAAGAGGTAAAGCTCGTTGATCAGATCATCTT
TGGTCGCGAAATAGCGAAACAACGTTCCCTCCGCAACCCCTGCATTGCGCGCGATTACGGCTGTTGAGGCCCAATACCTGATGTGCAAAATGCT
GTGGTTGCAGCTTCCAGTAATGCCAGTTTTTTGTCTTCACTCTTCGGACGAGCCAC TACACTTTACCCTTAAGTCTGTAAAAAACATGATTGAAT
CACGGCCTTTGCAGCACCGCAACGGAGAATGTCAAAGATTGAAAAATCATCTTGACGGCGAACTTTCGATTTCTATAATGAGTGCTTACTCACTC
ATAATCAAGAGTCAGTCGCGCAAACCAGCGGAAAGGAGCGCGTTAAGGTCAGGATATGAAGCGTCTCAGAGTTTGTGTGGTTGTTATTATGC
TTATTGCCGCTGCTACAAGTTTACCGTTTGTACTCAATGCCGATTGTTGCCAGGGCGCGCAAGGGGCACAACCTGAGTCAGGTTGAACAGTCGCCA
CACTATCGTGATGGACAGTTTATAATCAGGTGCCAACACCGGGCTATACCGTAACAAAGGTATGCTGGCGGCTGGTGGGAGTTTCTGGTCCG
CTAAGCGTGAATAATGCGCGGCCAGCGCAGCCGTTACCGCTGGTGGCGAGCGATCTCGCGGGTTACCGCCGAGCAGGATACTCTGGTCTGGCTG
GGCCACTCCTCATGGTATTTGCAACTGGCGGTCAACGCATCTGATTGATCCGGTTCAGCAACTATGCCGCGCGTTCATTCTGAACAA
AGCCTTTGCCGGGATATCCGTGGACCGCGCAGACGATGCCGGAGATCGATCTGCTCATCTCGCAGCATATTATGACCATCTGGATCTCG
CCACCATCAAGGGTTAATGCCGAAGATTAACGGGTGATTACGCCGCTGGGTGTGGGGTCGCATCTGCGTTATTGGGGAATGCCGAGCGAGAT
AATCGACGAACGTGACTGGAATCAGTCCGTGAGAGTACGGATTCACTGATTGTTTCATGTTCTGCCAGCCCGCATTTTCGGGGCGAGGCATT
AAGCGTAATCAGACGCTGTGGCCAGCTTTATGTTTGAATGCCGGGGCAGAACGTTTATTACAGCGGGATTCCGGCTACGGGCCGATTTTA
AAGCCATTGGCGAGCAGTTTGGCTCGGTTGATTGGCGATTATGGAGAACGGTCAGTATGACCAGGACTGGAAGTTTATTACATGATGCCGGA
AGAGACGGCTCAGGCCGGCGGATCTGCATGCGAAAGCCGTTTGGCCGGTCACGCAGGTCGTTTGTCTGGCGAAACATACCTGGGATGATC
CGTACAAAGACTGGCGCTTGCAGCCGCCAACAAGATTACCGACTGCTGACGCCGATGCTGGGTGAACCGGTCATACTGTCCGAACCGGACCAA
ACGTTTACGGCCTGGTGGCAGCAGGCGAATCAATGAACACAGGGGAGAGCATG **ATGACGATTTCTGCTCAGGTAATTGATACGATTGTTGAATG**
GATTGATGATAATTTGAATCAACCATTTGCGCATTGATGATTTGCCCGCATGCGGGTTATTCAAATGGCACCTACAGCGCTTTTTATGCAG
TACAAAGGCGAGAGCCTGGGGCGTTACATCCGTGAGCGTAAACTGCTGCTGGCGGCGCGATCTGCCGATACCGATCAGAAAGTGTACGACA
TCTGTTTGAAGTACGGATTCGATTCACAGCAGACTTTTACGCGTATTTTACCCGTACGTTTGTAGTCAACCGCGGGCGCTTATCGCAAAGAAAA
TCATAGCCGAACGCATTAACGGTACCGGTTCTCGCGGT

VIII. Anhang

Tabelle VIII-3: Auflistung der Reads der Sequenzierung des *ramRA*-Operons in *Citrobacter werkmanii* GK708 mit den dafür jeweils eingesetzten Primern.

Read	Primer Seq	Primer PCR
A8 15_02_12 ramA fw 708	A8(708)	A8(708)/downA1
downA1 10_02_12 ramA rv 708	downA1	A8(708)/downA1
ro4 21_12_11 romA fw 708	ro4(708)	ro4(708)/A7
A7 21_12_11 ramA rv 708	A7	ro4(708)/A7
A3 21_12_11 ramA rv 708	A3	ro4(708)/A3
ro3 17_02_12 romA rv 708	ro3(708)	ro2(708)/ro3(708)
A3 06_09_11 romA rv 708	A3	R5/A3
ro3 23_11_11 romA rv 708	ro3(708)	ro2(708)/ro3(708)
ro2 23_11_11 romA fw 708	ro2(708)	ro2(708)/ro3(708)
R5 06_09_11 romA fw 708	R5	R5/A3
ro1 30_11_11 romA rv 708	ro1(708)	R5/ro1(708)
R4 23_02_12 ramR rv 708	R4	downR1/R4
R1 19_07_11 ramR fw 708 (na)	R1	R1/R2
R2 19_07_11 ramR rv 708	R2	R1/R2
downR1 10_02_12 ramR fw 708	downR1	downR1/R4
708-ramR-rev R4	R4	downR1/R4
708-ramR-fw dR1	downR1	downR1/R4

VIII.1.1.4 Partielle Sequenz des *ramRA*-Operons in *Citrobacter rodentium* GK1253

gelb: *ramR*, türkis: *ramA*

ATAGCGAAACAACGTCCTTCCGCCACGCTGCGCTGCGGGCGATCGCGCGGTAGAGGCCGCGAGCCCGGATTGCGCAACTGCTGCGGTTGCTGCTCCAGTAATGCCTGTTTTTGTCTTCACTTTTCGGACGAGCCACTACGCTTTACCCTTAAATCAGTCTGAAAATGCGATTGAAACACGGCCTTAAGCGTGTGCAACGGTGAATGTCAAAGATTGAAATTCATCTTGACGGGAAACCTCCGATTTCTATAATGAGTGTACTCACTCATAATCAAGAGTCAATCGCGCAGTCTGGATGGCGCTTATAAAGGTCTGTGCGGGTCACTCGTCTAAAAACACCCCTTTGGGGCAGGGGTGGGATAAGACGGCTACTTTGCGGGAGAGGAGTTCTGAATGACCATTCTGCA

VIII.1.1.5 Analyierte DNA-Sequenz im Vektor pHPAR19-01.3

ACCGCCTTTGAGTGAGCTGATNCCGCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCA AACCGCCTCTCCCGCGCTTGGCCGATTTCATTAATGCAGCTGGCAGCAGAGGTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAAT GTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTACAC AGGAAACAGCTATGACGATTTCTGCTCAGGTAATTGATACGATTGTTGAATGGATTGATGATAATTTGAATCAACATTGCGCATTGATGATAT TGCACGCCATGCGGGATATTCAAATGGCACCTGCAGCGTCTTTTTATGCAGTATAAAGGCGAAAGCCTCGGGCGTTACATTCGGGAACGCAAG CTGCTACTGCGCCGCGGATCTACGCGATACCGACCAGAAAGTGTACGACATCTGTTTGAATACGGATTGCGATTGCGCAGCAGACCTTTACGCG TATTTTACCCGTACGTTACGCCAGCCCGGGCGCTTATCGCAAAGAAAATCATAGCCGAACGCATTAACAGCTCATATGGTGCCTCTCAGTA CAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACCCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTT ACAG

VIII.1.2 Alignments

In den folgenden DNA- und Aminosäure-Alignments wurde einheitlich derselbe Farcode für Übereinstimmungen angewendet: Identische Positionen sind gelb hinterlegt, konservierte aber nicht zu 100 % identische Positionen, sind blau hinterlegt und blockweise durch ähnliche Aminosäuren besetzte Positionen bzw. Positionen, die die bei der Hälfte der DNA-Sequenzen identisch sind, sind grün hinterlegt. Alle Alignments wurden mit der Software *Vector NTI* Version 11.5 durchgeführt.

VIII.1.2.1 *gyrA*-Alignment

197

	(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
partial <i>gyrA</i> <i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA895	(1)	T	C	C	T	C	A	T	G	G	T	G	A	T	T	C	C	G	G	T	G	T	A	C	G	A	C	A	T	C	G	T	C	C	G	T	A	T	G	G	G	C	A	G	C	C	T	T	C	T	G	C	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G	G	A	T	G	G	T	C	A	G	G	G	C	A	A	C	T	T	G	G	T	T	C	G	G	T	A	C	A	T	G	C	T	G	G	T	G

VIII. Anhang

Fortsetzung *gyrA* Alignment

	100	110	120	130	140	156	160	170	187
partial <i>gyrA</i> <i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA895	TATCGACGGCGACTCTGCGCGGGCAATGCGTTATACGGAAATCCGTC	TGCGCGAAGAT	TGCCCATGAAC	TGATGGCCGATCTCGAAAAA					
partial <i>gyrA</i> GK1189 1189- <i>gyrA</i> -rev [<i>gyrA</i> 3-1] na (c)	TATCGACGGCGACTCTGCGCGGGCAATGCGTTATACGGAAATCCGTC	TGCGCGAAGAT	TGCCCATGAAC	TGATGGCCGATCTCGAAAAA					
partial <i>gyrA</i> GK100 100- <i>gyrA</i> -rev [<i>gyrA</i> 3-1] na (c)	TGTCGATGGCGACTCCGCAGCGGGCGATGCGTTATACGGAAATCCGTA	TGTCGAAAAT	CGCCCATGAGCT	TGATGGCTGACCTCGAAAAA					
partial <i>gyrA</i> GK708 708- <i>gyrA</i> -rev [<i>gyrA</i> 3-1] (c)	TGTCGATGGCGACTCCGCAGCGGGCGATGCGTTATACGGAAATCCGTA	TGTCGAAAAT	CGCCCATGAGCT	TGATGGCTGACCTCGAAAAA					
partial <i>gyrA</i> <i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	CATCGACGGCGACTCTGCTGCGGGCGATGCGTTATACGGAAATCCGTC	TGCGCGAAGAT	TGCCCATGAGCT	TGATGGCCGATCTCGAAAAA					
partial <i>gyrA</i> GK2519 2519- <i>gyrA</i> -rev [<i>gyrA</i> 3-1] na (c)	CATTGATGGCGACTCCGCAGCGGGCAATGCGTTATACGGAAATCCGTC	TGCGTAAGAT	TGCCCATGAGCT	TGATGGCCGATCTCGAAAAA					
partial <i>gyrA</i> <i>Salmonella Typhimurium</i> str LT2	TATTGACGGCGACTCCGCAGCGGGCAATGCGTTATACGGAAATCCGTC	TGCGCGAAGAT	CGCCCATGAAC	TGATGGCCGATCTCGAAAAA					
partial <i>gyrA</i> GK4039 4039- <i>gyrA</i> -rev [<i>gyrA</i> -GA2] na (c)	CATCGATGGCGATTCCGCAGCGGGCGATGCGTTATACGGAAATCCGTC	TGCGCGAAGAT	TGCCCATGAGCT	TGATGGCCGATCTCGAAAAA					
partial <i>gyrA</i> GK1263 1263- <i>gyrA</i> -rev [<i>gyrA</i> -GA2] na (c)	CATCGATGGCGATTCCGCAGCGGGCGATGCGTTATACGGAAATCCGTC	TGCGCGAAGAT	TGCCCATGAGCT	TGATGGCCGATCTCGAAAAA					
partial <i>gyrA</i> GK2552 2552- <i>gyrA</i> -rev [GA-2] na (c)	TATCGACGGCGACTCTGCTGCGGGCGATGCGTTATACGGAAATCCGTC	TGCGCGAAGAT	TGCCCATGAAC	TGATGGCCGATCTCGAAAAA					
partial <i>gyrA</i> <i>E. coli</i> K12 rc	TATCGACGGCGACTCTGCTGCGGGCGATGCGTTATACGGAAATCCGTC	TGCGCGAAGAT	TGCCCATGAAC	TGATGGCCGATCTCGAAAAA					
partial <i>gyrA</i> <i>Citrobacter freundii</i> str Q15 partial Seq	TGTCGATGGCGACTCCGCAGCGGGCGATGCGTTATACGGAAATCCGTA	TGTCGAAAAT	CGCCCATGAGCT	TGATGGCTGACCTCGAAAAA					

198

VIII.1.2.2 *gyrB*-Alignment

	(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
Cit01 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	(1)	AAAGTG	TCCGGCGGT	TGCACGGCGT	TGGTGT	TCCGTT	GTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT
partial <i>gyrB</i> GK1189 from genomic	(1)	AAAGTG	TCCGGCGGT	TGCACGGCGT	TGGTGT	TCCGTT	GTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT
Cit02 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	(1)	AAAGTG	TCCGGCGGT	TGCACGGCGT	TGGTGT	TCCGTT	GTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT
partial <i>gyrB</i> 2552 rc	(1)	AAAGTG	TCCGGCGGT	TGCACGGCGT	TGGTGT	TCCGTT	GTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT
Cit05 <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter amalonaticus</i> ATCC 2...	(1)	AAAGTG	TCCGGCGGT	TGCACGGTGT	TGGTGT	TCCGTT	GTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT
partial <i>gyrB</i> 2519 rc	(1)	AAAGTG	TCCGGTGGT	TGCACGGTGT	TGGTGT	TCCGTT	AGTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT
Sal05 partial <i>gyrB</i> <i>Salmonella Typhimurium</i> LT2 rc	(1)	AAAGTG	TCCGGCGGT	TGCACGGCGT	TGGTGT	TCCGTT	AGTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT
Eco01 partial <i>gyrB</i> <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. M...	(1)	AAAGTG	TCCGGCGGT	TGCACGGCGT	TGGTGT	TCCGTT	AGTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT
Cit03 partial <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter braakii</i> DSM 17...	(1)	AAAGTT	TCCGGTGGT	TGCACGGCGT	TGGTGT	TCCGTT	AGTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT
Cit04 partial <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter freundii</i> CIP 57...	(1)	AAAGTT	TCCGGTGGT	TGCACGGCGT	TGGTGT	TCCGTT	AGTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT
partial <i>gyrB</i> 100 rc	(1)	AAAGTT	TCCGGCGGT	TGCACGGTGT	TGGTGT	TCCGTT	AGTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT
partial <i>gyrB</i> GK4089	(1)	AAAGTT	TCCGGTGGT	TGCACGGCGT	TGGTGT	TCCGTT	AGTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT
Cit06 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29220 rc	(1)	AAAGTT	TCCGGCGGT	TGCACGGCGT	TGGTGT	TCCGTT	AGTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT
partial <i>gyrB</i> GK708 rc	(1)	AAAGTT	TCCGGTGGT	TGCACGGCGT	TGGTGT	TCCGTT	AGTTAACGC	CCTGTCC	CAGAACTGGA	ACTGGTTAT	CCAGCGGAT	AAATAAAATCCACCGT

VIII. Anhang

Fortsetzung *gyrB* Alignment

199

	100	110	120	130	140	156	157	170	180
Cit01 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895 partial <i>gyrB</i> GK1189 from genomic	CAGATCTATGAGCATGGCGTACCGCAGGC	CCCGCTGGCGGTGACTGGCGAAACTGAT	AAAACCGGTACGATGGTCCGTTTCTGGCCGAGC						
Cit02 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter rodentium</i> ICC168 partial <i>gyrB</i> 2552 rc	CAGATCTACGTGCATGGCGTCCCGCAGGC	CCCGCTGGCCGTAAACGGCGACACC	GAC AAGACCGGTACGATGGTCCGTTTCTGGCCGAGC						
Cit05 <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter amalonaticus</i> ATCC 2... partial <i>gyrB</i> 2519 rc	CAGATCTACGACACCGCGTCCCGCAGGC	CCCGCTGGCAGTCACTGGCGATACCGAT	AAAACCGGTACGATGGTCCGTTTCTGGCCGAGC						
Sal05 partial <i>gyrB</i> <i>Salmonella Typhimurium</i> LT2 rc	CAGATCTACGACACCGCGTCCCGCAGGC	ACCCTGGCCGTCACTGGCGATACCGAT	AAAACGGCACGATGGTACGTTTCTGGCCGAGC						
Eco01 partial <i>gyrB</i> <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. M...	CAGATCTACGACACCGTGTACCGCAGGC	CCCGCTGGCGGTACCGCGAGACTGAA	AAAACGGCACATGGTCCGTTTCTGGCCAGC						
Cit03 partial <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter braakii</i> DSM 17...	CAAACTTACGTGCACGGTGTGCCGAGGC	CCCGCTGGCGGTAAACGGCGAAACAGAA	GCGACGGGTACTCAGGTACGTTTCTGGCCGAGC						
Cit04 partial <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter freundii</i> CIP 57... partial <i>gyrB</i> 100 rc partial <i>gyrB</i> GK4089	CAAACTTTCGTGCACGGTGTGCCGAGGC	CCCGCTGGCAGTAACTGGCGAAACAGAA	ATGACGGGACTCAGGTCCGTTTCTGGCCGAGC						
Cit06 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29220 rc partial <i>gyrB</i> GK708 rc	CAACGTACGTGCACGGTGTGCCGAGGC	CCCGCTGGCGGTAAACGGCGAAACGAA	GTAACGGGTACTCAGGTCCGTTTCTGGCCGAGC						

	190	200	210	220	230	240	250	260	270
Cit01 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895 partial <i>gyrB</i> GK1189 from genomic	CTGGAACCTTACCAAAGTCACTGAAATTTGAATAAGAAATTTCTGGCTAAGCGTCTGCGT	GAGCTGTCC	TTCTGAACTCCGGCGTCTCT						
Cit02 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter rodentium</i> ICC168 partial <i>gyrB</i> 2552 rc	CTGGAACCTTACCAAAGTCACTGAAATTTGAATAAGAAATTTCTGGCTAAGCGTCTGCGT	GAGCTGTCC	TTCTGAACTCCGGCGTCTCT						
Cit05 <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter amalonaticus</i> ATCC 2... partial <i>gyrB</i> 2519 rc	CTGGAACCTTACCAAAGTCACTGAAATTTGAATAAGAAATTTCTGGCTAAGCGTCTGCGT	GAGCTGTCC	TTCTGAACTCCGGCGTCTCT						
Sal05 partial <i>gyrB</i> <i>Salmonella Typhimurium</i> LT2 rc	CACGAAACCTTACTAAAGTCACTGAGTTTGAATAAGAAATTTCTGGCTAAGCGTCTGCGT	GAGCTGTCC	TTCTGAACTCCGGCGTCTCT						
Eco01 partial <i>gyrB</i> <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. M...	CTCGAAACCTTACCAAAGTCACTGAGTTTGAATAAGAAATTTCTGGCTAAGCGTCTGCGT	GAGCTGTCC	TTCTGAACTCCGGCGTCTCT						
Cit03 partial <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter braakii</i> DSM 17...	CACGAAACCTTACTAAAGTCACTGAGTTTGAATAAGAAATTTCTGGCTAAGCGTCTGCGT	GAGCTGTCC	TTCTGAACTCCGGCGTCTCT						
Cit04 partial <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter freundii</i> CIP 57... partial <i>gyrB</i> 100 rc partial <i>gyrB</i> GK4089	CACGAAACCTTACTAAAGTCACTGAGTTTGAATAAGAAATTTCTGGCTAAGCGTCTGCGT	GAGCTGTCC	TTCTGAACTCCGGCGTCTCT						
Cit06 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29220 rc partial <i>gyrB</i> GK708 rc	CATGAAACCTTACTAAAGTCACTGAGTTTGAATAAGAAATTTCTGGCTAAGCGTCTGCGT	GAGCTGTCC	TTCTGAACTCCGGCGTCTCT						

VIII. Anhang

Fortsetzung *gyrB* Alignment

	280	290	300	312	313	320	330	340	350	360	370																
Cit01 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	ATT	CGT	CTG	AAA	GACA	AAGCG	CGAC	GGCAA	AGAA	GAT	CAT	TTCCA	TAC	GAAGG	CGGCAT	CAA	AGCGTT	GTT	GAG	TAC	CTCA	ACA	AGAA	CAAA	ACG	CCGA	
partial <i>gyrB</i> GK1189 from genomic	ATT	CGT	CTG	AAA	GACA	AAGCG	CGAC	GGCAA	AGAA	GAT	CAT	TTCCA	TAC	GAAGG	CGGCAT	CAA	AGCGTT	GTT	GAG	TAC	CTCA	ACA	AGAA	CAAA	ACG	CCGA	
Cit02 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	ATC	CGT	CTT	TAA	GACA	AAGCG	CGAC	GGTAA	AGAA	GAT	CAT	TTCCA	TAC	GAAGG	CGGCAT	CAA	AGCGTT	CGT	TGAG	TAT	CTGA	ACA	AGAA	CAAA	ACG	CCGA	
partial <i>gyrB</i> 2552 rc	ATC	CGT	CTT	TAA	GACA	AAGCG	CGAC	GGTAA	AGAA	GAT	CAT	TTCCA	TAC	GAAGG	CGGCAT	CAA	AGCGTT	CGT	TGAG	TAT	CTGA	ACA	AGAA	CAAA	ACG	CCGA	
Cit05 <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter amalonaticus</i> ATCC 2...	ATT	CGC	CTG	AAA	GACA	AAGCG	CGAT	GGTAA	AGAA	GAT	CAT	TTCCA	TAT	GAAGG	TGG	CATCA	AGG	CGTT	CGT	TGAG	TAT	CTGA	ACA	AGAA	CAAA	ACG	CCAA
partial <i>gyrB</i> 2519 rc	ATT	CGC	CTG	AAA	GACA	AAGCG	CGAT	GGTAA	AGAA	GAT	CAT	TTCCA	TAT	GAAGG	TGG	CATCA	AGG	CGTT	CGT	TGAG	TAT	CTGA	ATA	AGAA	CAAA	ACG	CCGA
Sal05 partial <i>gyrB</i> <i>Salmonella Typhimurium</i> LT2 rc	ATC	CGC	TG	CGG	GACA	AAGCG	CGAT	GGCAA	AGAA	GAT	CAT	TTCCA	TAC	GAAGG	CGGCAT	CAA	AGCGTT	GTT	GAA	TAT	CTGA	ACA	AGAA	CAAA	ACG	CCGA	
Eco01 partial <i>gyrB</i> <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. M...	ATT	CGT	CTG	CGG	GACA	AAGCG	CGAC	GGCAA	AGAA	GAC	CAT	TTCCA	TAT	GAAGG	CGGCAT	CAA	AGCGTT	CGT	TGAA	TAT	CTGA	ACA	AGAA	CAAA	ACG	CCGA	
Cit03 partial <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter braakii</i> DSM 17...	ATT	CGT	CTG	CGG	GACA	AAGCG	CGAC	GGTAA	AGAA	GAC	CAT	TTCCA	TAC	GAAGG	CGGCAT	CAA	AGCGTT	GTT	GAA	TAC	CTCA	ACA	AGAA	CAAA	ACG	CCGA	
Cit04 partial <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter freundii</i> CIP 57...	ATT	CGT	CTG	CGG	GACA	AAGCG	CGAC	GGCAA	AGAA	GAT	CAT	TTCCA	TAC	GAAGG	CGGCAT	CAA	AGCGTT	GTT	GAA	TAC	CTCA	ACA	AGAA	CAAA	ACG	CCGA	
partial <i>gyrB</i> 100 rc	ATT	CGT	CTG	CGG	GACA	AAGCG	CGAC	GGCAA	AGAA	GAT	CAT	TTCCA	TAC	GAAGG	CGGCAT	CAA	AGCGTT	GTT	GAA	TAC	CTCA	ACA	AGAA	CAAA	ACG	CCGA	
partial <i>gyrB</i> GK4089	ATT	CGT	CTG	CGG	GACA	AAGCG	TGAC	GGCAA	AGAA	GAT	CAT	TTCCA	TAC	GAAGG	CGGCAT	CAA	AGCGTT	GTT	GAA	TAT	CTCA	ACA	AGAA	CAAA	ACG	CCGA	
Cit06 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29220 rc	ATT	CGT	CTG	CGG	GACA	AAGCG	CGAC	GGCAA	AGAA	GAT	CAT	TTCCA	TAC	GAAGG	CGGCAT	CAA	AGCGTT	GTT	GAA	TAT	CTCA	ACA	AGAA	CAAA	ACG	CCGA	
partial <i>gyrB</i> GK708 rc	ATT	CGT	CTG	CGG	GACA	AAGCG	CGAC	GGCAA	AGAA	GAT	CAT	TTCCA	TAC	GAAGG	CGGCAT	CAA	AGCGTT	GTT	GAA	TAT	CTCA	ACA	AGAA	CAAA	ACG	CCGA	

VIII. Anhang

	380	390	400	410	420	430	440	450	468				
Cit01 partial gyrB <i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	TC	CACCCGAAT	TACTTTCTA	CTTCTCCACC	GAAAAGACGGTAT	GGCGTGAAGT	GGCAT	TGCAGT	TGGAACGAC	GGT	TTCCAGGAAAA	C	
partial gyrB GK1189 from genomic	TT	CACCCGAAT	TACTTTCTA	CTTCTCCACC	GAAAAGACGGTAT	GGCGTGAAGT	GGCAT	TGCAGT	TGGAACGAC	GGT	TTCCAGGAAAA	C	
Cit02 partial gyrB <i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	TC	CACCCGAAC	TACTTTCTA	CTTCTCCACC	GAAAAGACGGTAT	GGCGTGAAGT	GGCAT	TGCAGT	TGGAACGAT	GGT	TTCCAGGAAAA	C	
partial gyrB 2552 rc	TT	CACCCGAAT	TACTTTCTA	TTTTCTC	TACAGAAAAGACGGTAT	GGCGTGAAGT	GGCAT	TGCAGT	TGGAACGAC	GGT	TTCCAGGAAAA	C	
Cit05 gyrB part_seq <i>Citrobacter amalonaticus</i> ATCC 2...	TC	CACCCGAAT	TACTTTCTA	TTTTCTCCACC	GAAAAGACGGTAT	GGCGTGAAGT	TGCA	TGCA	TGGAACGAC	GGC	TTCCAGGAAAA	C	
partial gyrB 2519 rc	TC	CACCCGAAT	TACTTTCTA	TTCTCGACC	GAAAAGACGGTAT	GGCGTGAAGT	GGCA	TGCAGT	TGGAACGAC	GGT	TTCCAGGAAAA	C	
Sal05 partial gyrB <i>Salmonella Typhimurium</i> LT2 rc	TC	CACCCGAAT	TACTTTCTA	TTCTCCACC	GAAAAGACGGTAT	GGCGTGAAGT	AGCCT	TGCAGT	TGGAACGAT	GGT	TTCCAGGAAAA	C	
Eco01 partial gyrB <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. M...	TC	CACCCGAAT	TACTTTCTA	CTTCTCCACT	GAAAAGACGGTAT	TGGCGT	GAAGT	GGC	TGCAGT	TGGAACGAT	GGC	TTCCAGGAAAA	C
Cit03 partial gyrB part_seq <i>Citrobacter braakii</i> DSM 17...	TC	CACCCGAAT	TACTTTCTA	CTTCTCCACC	GAAAAGACGGTAT	TGGCGT	GAAGT	TGCGT	TGCAGT	TGGAACGAT	GGT	TTCCAGGAAAA	C
Cit04 partial gyrB part_seq <i>Citrobacter freundii</i> CIP 57...	TC	CACCCGAAT	TACTTTCTA	CTTCTCCACT	GAAAAGACGGTAT	TGGCGT	GAAGT	TGCGT	TGCAGT	TGGAACGAT	GGT	TTCCAGGAAAA	C
partial gyrB 100 rc	TC	CACCCGAAT	TACTTTCTA	CTTCTCCACC	GAAAAGACGGTAT	TGGCGT	GAAGT	TGCGT	TGCAGT	TGGAACGAT	GGT	TTCCAGGAAAA	C
partial gyrB GK4089	TC	CACCCGAAT	TACTTTCTA	CTTCTCCACC	GAAAAGACGGTAT	TGGCGT	GAAGT	GGCGT	TGCAGT	TGGAACGAC	GGT	TTCCAGGAAAA	C
Cit06 partial gyrB <i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29220 rc	TC	CACCCGAAT	TACTTTCTA	CTTCTCCACC	GAAAAGACGGTAT	TGGCGT	GAAGT	GGCGT	TGCAGT	TGGAACGAC	GGC	TTCCAGGAAAA	C
partial gyrB GK708 rc	TC	CACCCGAAT	TACTTTCTA	CTTCTCCACC	GAAAAGACGGTAT	TGGCGT	GAAGT	TGCGT	TGCAGT	TGGAACGAC	GGC	TTCCAGGAAAA	T

VIII. Anhang

Fortsetzung *gyrB* Alignment

	(351)	470	480	490	506
Cit01 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895(351)	ATCTACTGCTT	ACCAACAAC	ATTCCGCAGCGT	GACGG	
partial <i>gyrB</i> GK1189 from genomic(351)	ATCTACTGCTT	ACCAACAAC	ATTCCGCAGCGT	GACGG	
Cit02 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter rodentium</i> ICC168(351)	ATCTACTGCTT	ACCAACAAC	ATTCCGCAGCGT	GACGG	
partial <i>gyrB</i> 2552 rc(351)	ATCTACTGCTT	ACCAACAAT	ATTCCGCAGCGT	GACGG	
Cit05 <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter amalonaticus</i> ATCC 2...(351)	ATCTACTGCTT	ACTAACAAC	ATTCCGCAGCGT	GACGG	
partial <i>gyrB</i> 2519 rc(351)	ATCTACTGCTT	ACCAACAAC	ATTCCGCAGCGT	GATGG	
Sal05 partial <i>gyrB</i> <i>Salmonella Typhimurium</i> LT2 rc(351)	ATCTACTGCTT	ACCAACAAC	ATTCCGCAGCGC	GACGG	
Eco01 partial <i>gyrB</i> <i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. M...(351)	ATCTACTGCTT	ACCAACAAC	ATTCCGCAGCGT	GACGG	
Cit03 partial <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter braakii</i> DSM 17...(351)	ATCTACTGCTT	CACCAACAAC	ATTCCGCAGCGT	GACGG	
Cit04 partial <i>gyrB</i> part_seq <i>Citrobacter freundii</i> CIP 57...(351)	ATCTACTGCTT	CACCAACAAC	ATTCCGCAGCGT	GACGG	
partial <i>gyrB</i> 100 rc(351)	ATCTACTGCTT	CACCAACAAC	ATTCCGCAGCGT	GACGG	
partial <i>gyrB</i> GK4089(351)	ATCTACTGCTT	CACCAACAAC	ATTCCGCAGCGT	GACGG	
Cit06 partial <i>gyrB</i> <i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29220 rc(351)	ATCTACTGCTT	CACCAACAAC	ATTCCGCAGCGT	GACGG	
partial <i>gyrB</i> GK708 rc(351)	ATCTACTGCTT	ACCAACAAC	ATTCCGCAGCGT	GACGG	

VIII.1.2.3 Alignment der DNA-Sequenzen des *ramRA*-Operons in *Citrobacter spec.*

		Section 1																												
		1	10	20	30	40	50	60	70	80									99											
C. fameri GK2519	(1)	TTATGCTTCCTCA	CGGGT	GAGG	CGCGCCACAT	CGCTTCAA	AGCC	AGGAGAT	AAAT	TCGCT	GGCGG	AGT	CGGT	TCGG	AG	CGGCAA	AT	TCCAT	CGT											
C. sedlakii GK2552	(1)	TCAGAAATTCCTC	CGGGT	GAGG	CGCGCCACAT	CGCTTCAA	ACC	GAGAGAGAT	AAAT	TCAGT	GGCGG	AGT	CGGT	TCGG	AG	CGGCAA	AT	TCCAT	CGT											
C. werkmanii GK708	(1)	TTATTTTCCTC	CGGGT	CAGG	CGCGCCACAT	GCTTCAA	CCC	CAACGAAAT	GTAT	TCAGT	GGCGG	AGT	CGGT	TCGG	AG	CGGCAA	AT	TCCAT	CGT											
C. freundii GK100	(1)	TTATTTTCCTC	CGGGT	AGT	GCGCGCCACAT	CGCTTCAA	TCC	ATCGATAT	GTAT	TCCT	GGCC	CGGG	CAGAGT	CT	CGGG	CAGCAA	TCCAT	CGT												
C. rodentium Cit02	(1)	TTACGATTCCTCA	CGGGT	GAGG	CGCGCCACAT	GCTTCAA	AGCC	AGAGAGAT	AAAT	TCGCT	GGCGG	CGGT	TCGG	GGT	GGC	GAAT	TCCAT	CGT												
C. koseri Cit01	(1)	TTATTTTCCTC	CGGGT	GAGG	CGCGCCACAT	CGCTTCAA	ACC	AGCGAGAT	GTAC	TCAT	TTT	GGCT	GGGC	CGAT	TCGG	GGC	GAAT	TCCAT	CGT											
		Section 2																												
		100	110	120	130	140	150	160	170	180									198											
C. fameri GK2519	(100)	CGTTTC	TGCC	AGCGTT	AAAAAC	CAGCGCA	TCGCCGAAG	GCGCGATA	CTCAT	CGGACAT	AAAG	ACT	GGCAGT	ACCG	AA	CGGT	GA	CAG	AGAT	CGCG	TAG	CTC								
C. sedlakii GK2552	(100)	GGTTTC	GGCC	AGAGTT	AAAAAC	CAGCGGT	TCGCCGAAG	GCGCGATA	TTCTG	TGACATA	AAAG	ACT	GGCAGT	ACCG	AA	CGGT	GA	CAG	AGAT	CGCG	TAG	CTC								
C. werkmanii GK708	(100)	TGTTTC	TGCA	AGTGT	CAAAAA	AGTCC	GTCGCCGAAG	GCGCGATA	CTCGT	CCGACATA	AAAT	TTC	AGGTC	GCAC	GG	AG	CGAT	GA	CA	AGAT	CGCG	CAGTTC								
C. freundii GK100	(100)	GGTTTC	CGCC	AAAGAG	AAAA	AGGCC	ATCGGCCGAAG	GCGCGATA	TTCTG	TGACATA	AAAT	CTC	AGGTC	GCAC	GG	AG	CGAT	GA	CA	AGAT	CGCG	CAGTTC								
C. rodentium Cit02	(100)	GGTTTC	CGCC	AGGTT	AAAAAC	CAGCGCA	TCGCCAAAC	GCGCGATA	CTCAT	CGGACAT	AAAG	ACT	GGCAGT	ACCG	AA	CGGT	GA	CAG	AGAT	CGCG	TAG	CTC								
C. koseri Cit01	(100)	GGTTTC	TGCC	AGGTT	GAGAAC	CAGGCA	TCGCCAAAG	GCGCGATA	TTCTG	TGACATA	AAAG	ACT	GGCAGT	ACCG	AA	CGGT	GA	CAG	AGAT	CGCG	TAG	CTC								
		Section 3																												
		199	210	220	230	240	250	260	270	280									297											
C. fameri GK2519	(199)	GGGAAAC	CAGAT	CGTC	GGCT	TTCT	GTTTC	CGTCT	CCTTT	GTG	ATTTT	TC	CGCT	GACT	GCT	AACT	TGG	CGA	AT	GG	CGA	TGT	CCCT	GC	GT	AT	GGT	TGA	GACC	
C. sedlakii GK2552	(199)	AGGAAAC	ATGG	CGTC	GGCT	TTCT	GTTTC	CGTCT	CCTTT	GTG	ATTTT	TC	CGCT	GACT	GCT	AACT	TGG	CGA	AT	GG	CGA	TGT	CCCT	GC	GT	AT	GGT	TGA	GACC	
C. werkmanii GK708	(199)	CGGAAAC	ATAT	CGTC	AGCT	GCTG	TTC	AGTT	CTTT	GCTG	ATTTT	TC	CGCT	GACT	GCT	AACT	TGG	CGA	AT	GG	CGA	TGT	CCCT	GC	GT	AT	GGT	TGA	GACC	
C. freundii GK100	(199)	CGGAAAC	ATAT	CGTC	GGCT	GCTG	TTC	AGTT	CTTT	GCTG	ATTTT	TC	CGCT	GACT	GCT	AACT	TGG	CGA	AT	GG	CGA	TGT	CCCT	GC	GT	AT	GGT	TGA	GACC	
C. rodentium Cit02	(199)	AGGAAAC	ATAT	CGTC	AGCT	TTT	TGTT	CGGTT	CTTT	GCTG	ATTTT	TC	CGCT	GACT	GCT	AACT	TGG	CGA	AT	GG	CGA	TGT	CCCT	GC	GT	AT	GGT	TGA	GACC	
C. koseri Cit01	(199)	CGGAAAC	ATAT	CGTC	GGCT	AGT	TGCT	CGGTT	CTTT	GCTG	ATTTT	TC	CGCT	GACT	GCT	AACT	TGG	CGA	AT	GG	CGA	TGT	CCCT	GC	GT	AT	GGT	TGA	GACC	
		Section 4																												
		298	310	320	330	340	350	360	370	380									396											
C. fameri GK2519	(298)	CCAACT	GATAT	AGTT	TGCT	CCAGAT	ATA	AAAAG	GTCAG	CAC	TTT	GGTTA	TC	CGT	CAGT	GAA	CGAT	CC	GAG	TTTT	CG	AT	CAG	CG	ACT	GG	CAA	AGAT	CT	CGTT
C. sedlakii GK2552	(298)	CCAGCG	GATAT	AGTT	TGCT	CCAGAT	ATA	AAAAG	GTCAG	CAC	TTT	GGTTA	TC	CGT	CAGT	GAA	CGAT	CC	GAG	TTTT	CG	AT	CAG	CG	ACT	GG	CAA	AGAT	CT	CGTT
C. werkmanii GK708	(298)	CCAGCT	AATG	TAGCT	GTT	CCAGAT	ATA	AAAAG	GTCAG	CAC	TTT	GGTTA	TC	CGT	CAGT	GAA	CGAT	CC	GAG	TTTT	CG	AT	CAG	CG	ACT	GG	CAA	AGAT	CT	CGTT
C. freundii GK100	(298)	CCAGCT	AATG	TAGCT	GTT	CCAGAT	ATA	AAAAG	GTCAG	CAC	TTT	GGTTA	TC	CGT	CAGT	GAA	CGAT	CC	GAG	TTTT	CG	AT	CAG	CG	ACT	GG	CAA	AGAT	CT	CGTT
C. rodentium Cit02	(298)	CCAGCG	GATAT	AGTT	TGCT	CCAGAT	ATA	AAAAG	GTCAG	CAC	TTT	GGTTA	TC	CGT	CAGT	GAA	CGAT	CC	GAG	TTTT	CG	AT	CAG	CG	ACT	GG	CAA	AGAT	CT	CGTT
C. koseri Cit01	(298)	CCAGT	TGATG	TAGCT	GTT	CCAGAT	ATA	AAAAG	GTCAG	CAC	TTT	GGTTA	TC	CGT	CAGT	GAA	CGAT	CC	GAG	TTTT	CG	AT	CAG	CG	ACT	GG	CAA	AGAT	CT	CGTT

VIII. Anhang

Fortsetzung *ramRA* Alignment

204

		Section 5												
	(397)	397	410	420	430	440	450	460	470	480	495			
<i>C. farmeri</i> GK2519	(397)	AAGATG	AAGATAAAAGT	TCGTTGATTA	ACTCGTCTTTT	GTGCGGAAATAGCG	AAACAACGTTCC	TTCGCCACGCCTGC	GTACGGGCTAT	CACAGCGGT				
<i>C. sedlakii</i> GK2552	(397)	AAGATGGAGG	TAAAGTTCGTTAAT	TAACTCGTC	TTTTGGTTCGCGAAATAGCG	AAACAACGTTCC	TTCGCCACGCCTGC	GTACGGGCAAT	CACGGCGGT					
<i>C. werkmanii</i> GK708	(397)	TAAAAGAGG	TAAAGCTCGTTGATC	CAGATCATCTTTGGT	CGCGAAATAGCG	AAACAACGTTCC	TTCGCCAACCCCTGC	ATGCGCGCGATT	ACGGCTGT					
<i>C. freundii</i> GK100	(397)	TAAAAGAGG	TAAAGCTCGTTGATTA	AATCATCTTTGGT	CGCGAAATAGCG	AAACAACGTTCC	TTCGCCAACCCCTGC	ATGCGGGCAAT	ACGGCGGT					
<i>C. rodentium</i> Cit02	(397)	AAGATGGAG	TAAAGTTCGTTGATTA	ACTCGTCTTTT	GTGCGGAAATAGCG	AAACAACGTTCC	TTCGCCACGCCTGC	GTACGGGCGAT	CGGGCGGT					
<i>C. koseri</i> Cit01	(397)	CAATG	CAGATAAAAGT	TCGTTGATTA	AAGTCACTTTT	GTGCGGAAATAGCG	AAACAACGTTCC	TTCAGCAACCCCTGC	TTGCGAGCAAT	GACGGCGGT				
		Section 6												
	(496)	496	510	520	530	540	550	560	570	580	594			
<i>C. farmeri</i> GK2519	(496)	AGATGCCGCG	ATCCCGGAT	TGCGCAATAGCT	TGTGGTTGCAGC	TCCAGTAAT	GCCTGTTTTTTT	TGCTTCACT	CTTCGGACGAGCC	ACTACACTTTT	ACCC			
<i>C. sedlakii</i> GK2552	(496)	AGAAGCCGCG	ATCCCGGACT	TGCGGATGCG	CGTGGTTGCTGC	TCCAGTAAT	GCCAGTTTTTTT	TGCTTCACT	CTTCGGACGAGCC	ACTACACTTTT	ACCC			
<i>C. werkmanii</i> GK708	(496)	TGAGGCCGCA	ATACCTGAT	TGTGCAAAATGCT	TGTGGTTGCAGC	TCCAGTAAT	GCCAGTTTTTTT	TGCTTCACT	CTTCGGACGAGCC	ACTACACTTTT	ACCC			
<i>C. freundii</i> GK100	(496)	AGACGCCGCA	ATACCTGAT	TGTGCAAAATGCT	TGTGGTTGCAGC	TCCAGTAAT	GCCAATTTTTTT	TGCTTCACT	CTTCGGACGAGCC	ACTACACTTTT	ACCC			
<i>C. rodentium</i> Cit02	(496)	AGAGGCCGCG	AGCCCGGAT	TGCGCAACTGCT	TGCGGTTGCTGC	TCCAGTAAT	GCCTGTTTTTTT	TGCTTCACT	CTTCGGACGAGCC	ACTACACTTTT	ACCC			
<i>C. koseri</i> Cit01	(496)	GGAGGCCGCA	ATGCCCGGAT	TGCGGATCGCT	TTTGTGGCGCT	TCCAGTAAC	GCCAGTTTTTTT	TGCTTCACT	CTTCGGACGAGCC	ACTACACTTTT	ACCC			
		Section 7												
	(595)	595	600	610	620	630	640	650	660	670	680	693		
<i>C. farmeri</i> GK2519	(595)	TTAAGAT	TGTCTAAAA	GGTGAATTGAA	ACACGGCCTT	TGCAGCGCCGCAAC	CGGTGAATGT	CAAAGATTGAAA	ATCATCTTGAC	CGGAAACT	TCCGATTT			
<i>C. sedlakii</i> GK2552	(595)	TTA--TC	AGTCTAAAA	CCGAATTGAA	ACACGGCCTT	TGCAGCGCCGCAAC	CGGTGAATGT	CAAAGATTGAAA	ACAGTCTTGAC	CGGAAACT	TCCGATTT			
<i>C. werkmanii</i> GK708	(595)	TTAAGTCT	GTAA-AAA	ACATGATTGAA	TACACGGCCTT	TGCAGCACCCGCAAC	CGGAATGT	CAAAGATTGAAA	ATCATCTTGAC	CGGAACT	TCCGATTT			
<i>C. freundii</i> GK100	(595)	TTAAGT	-TGTAA-AAA	GATGATTGAA	TACACGGCCTT	TGCAGCACCCGCAAC	CGGTGAATGT	CAAAGATTGAAA	ATCATCTTGAC	CGGAACT	TCCGATTT			
<i>C. rodentium</i> Cit02	(595)	TTAAATC	AGTCTGAAA	TGCGATTGAA	ACACGGCCTT	AAGCTGTTCGCAAC	CGGTGAATGT	CAAAGATTGAAA	ATCATCTTGAC	GGAAACT	TCCGATTT			
<i>C. koseri</i> Cit01	(595)	TTAATGA	TGTAA-AAA	ACACGATTGAA	ACACGCTCTT	TGCAGCGCCGCAAC	CGGTGAATGT	CAAAGATTGAAA	ATCATCTTGAC	GAGATTCC	TTCGCTTT			
		Section 8												
	(694)	694	700	710	720	730	740	750	760	770	780	792		
<i>C. farmeri</i> GK2519	(694)	CTATAATGAG	TGCTTACTCACT	CATAATCAAG	AGTCAGTCCGCGCA	AACCATCGGACT	GGAGCGGTTTTA	CAGGTCAGG	ATATGAAGCCT	CCTCCTCCGTT				
<i>C. sedlakii</i> GK2552	(692)	CTATAATGAG	TGCTTACTCACT	CATAATCAAG	AGTCAGC	CCGCGCAACTAC	CGGACGGAGCGCGTTTT	C-AGGTCAGG	ATATGAAGCCT	CCTCACAGTT				
<i>C. werkmanii</i> GK708	(693)	CTATAATGAG	TGCTTACTCACT	CATAATCAAG	AGTCAGTCCGCGCA	AACCGAGCGG	AAAGGAGGCGCGTTTTA	-AGGTCAGG	ATATGAAGCCT	CCTCACAGTT				
<i>C. freundii</i> GK100	(692)	CTATAATGAG	TGCTTACTCACT	CATAATCAAG	AGTCAGTCCGCGCA	AACCGAGCGG	AAAGGAGGCGCGTTTTA	-AGGTCAGG	ATATGAAGCCT	CCTCACAGTT				
<i>C. rodentium</i> Cit02	(694)	CTATAATGAG	TGCTTACTCACT	CATAATCAAG	AGTCAGTCCGCGCA	AACCGAGCGG	AAAGGAGGCGCGTTTTA	-AGGTCAGG	ATATGAAGCCT	CCTCACAGTT				
<i>C. koseri</i> Cit01	(693)	CTATAATGAG	TGCTTACTCACT	CATAATCAAG	TGACAGTCCGCGCA	AACCGAGCGG	AAAGGAGGCGCGTTTT	C-GGATCAGG	ATATGAAGCCT	CCTCACAA	TT			

VIII. Anhang

Fortsetzung *ramRA* Alignment

205

		Section 9																																				
		793	800	810	820	830	840	850	860	870	880	891																										
C. farmeri GK2519	(793)	TGTGTGGT	CGTTATAT	TGCTCATT	GCCAGTGC	AGCAA	CGTTACCG	TTTGTCT	CAATGC	GGC	TTCCGG	CCAGGC	CCGCA	GGGT	GCTG	AGCT	TAGTCAG																					
C. sedlakii GK2552	(790)	TGTGTGGT	TGTTAT	GATGAT	CATTGCC	AGTGC	CGCAA	CGTTACCG	TTTGTCT	CAATGC	TGGC	TTCCGG	TCAGGC	CGCCG	CAAGGGG	CTCAGCT	CAGCCAG																					
C. werkmanii GK708	(791)	TGTGTGGT	TGTTAT	TATGCT	TATTGCC	CTGCT	TACAAG	TTTACCG	TTTGT	ACTCAAT	GCCGG	ATTGG	CCAGGC	CGCCG	CAAGGGG	CACTG	AGTCAG																					
C. freundii GK100	(790)	TGTGTGGT	TGTTAT	TATGCT	CATTG	CGCAG	CTGCAAG	TTTACCG	TTT	TACTCAAT	GCCGG	TTTGG	TCAGGC	CA	CGAAAGGGG	ACAGCT	GAGTCAG																					
C. rodentium CIt02	(739)	-----																																				
C. koseri CIt01	(791)	TGTGTGGT	TGTTAT	TATGCT	TATTGC	TTCTA	CAGC	GAGT	CTG	CCGTTT	GTCTT	AA	C	GCCGG	G	TTTGGT	TCAGG	TGCCG	CA	GGC	GCTCA	ACTG	AGC	CTG														
		Section 10																																				
		892	900	910	920	930	940	950	960	970	980	990																										
C. farmeri GK2519	(892)	GTAGAG	CAATC	TG	GA	ACTA	CCGTG	AC	GGCA	ATTT	CATAAT	CAGGT	GCCA	AC	CCGGG	CTATA	CCGG	AA	CA	AAAG	TATG	CT	CCGG	CA	TGGT	GGGAG												
C. sedlakii GK2552	(889)	TTTGAAC	AGTCC	GTCA	TTAT	CGT	GATGG	GCA	ATT	CCATA	ATC	CAGGT	GCCA	AGG	CCGGG	CTATA	CCGG	AAA	TAAA	AGT	CT	GG	CGG	CC	TGGT	GGGA												
C. werkmanii GK708	(890)	TTTGAAC	AGTCC	CACT	AT	CGT	GATGG	AC	AGTTT	CATA	AT	CAGGT	GCCA	AC	CCGGG	CTATA	CCGG	TAA	CA	AAAG	TATG	CT	GG	CGG	CC	TGGT	GGGAG											
C. freundii GK100	(889)	TTTGAAC	AGTCC	CACT	AT	CGT	GATGG	AC	AGTTT	CATA	AT	CAGGT	GCCA	AC	CCGGG	CTATA	CCGG	CA	CA	AAAG	TATG	CT	GG	CGG	CC	TGGT	GGGAG											
C. rodentium CIt02	(739)	-----																																				
C. koseri CIt01	(890)	GTG	GAAC	AGTCC	CACT	AT	CGT	GATGG	AC	AGTTT	CATA	AT	CA	AT	TACC	ACT	CC	GGT	TAC	ACCGG	GG	A	TAA	GG	GG	ATG	CT	CG	CG	A	TGGT	GGGAG						
		Section 11																																				
		991	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1089																											
C. farmeri GK2519	(991)	TTTCTGGT	CGCG	AAGCG	TG	AAAA	TG	CGCG	ACC	AGC	CCAGCC	ATTACC	CTGGT	TGC	ACCG	ATCT	TGCC	AG	CC	TG	CCGGT	T	GAG	CA	AA	TAC	CT	GATC										
C. sedlakii GK2552	(988)	TTCTGGT	CGCG	AAGCG	AG	GAA	CGCG	CGT	CCGGC	GCAG	CCGTT	ACCG	CTGGT	AG	CG	ACCG	AT	TGC	AG	CTC	TG	CCCG	CG	GAC	AG	GG	AC	CG	CT	GATC								
C. werkmanii GK708	(989)	TTTCTGGT	CGCT	AAGCG	TG	AAAA	TG	CGCG	GCC	AGC	GCAG	CCGTT	ACCG	CTGGT	TGC	AG	CG	AT	CT	CG	CCGG	G	TAC	CG	CG	GC	AG	CAG	GA	TAC	CT	GGT	TC					
C. freundii GK100	(988)	TTTT	TGGT	CGCT	AAGCG	CG	AAAA	TG	CGCG	GCC	AGC	ACA	T	CCGTT	G	CA	TGGT	TGC	AG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG					
C. rodentium CIt02	(739)	-----																																				
C. koseri CIt01	(989)	TTTT	CTGGT	CGCT	AA	CGT	GAAAA	C	CGCG	GCC	TGC	CA	CCGTT	G	CCG	CTGGT	AA	AC	CCG	AT	CT	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG	CG					
		Section 12																																				
		1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1188																											
C. farmeri GK2519	(1090)	TGGCTGGG	GC	CACT	CC	TCGT	GGTACC	TG	CAACT	TGG	CGG	CAA	ACG	TAT	TCT	GAT	CG	ACCG	GGT	TT	TCAG	CAG	T	TAC	G	CCG	CG	CCG	TTTT	CT	G	TT	CT	CAAC				
C. sedlakii GK2552	(1087)	TGGCTCGG	CCACT	CG	TCGT	GGT	ATTT	TG	CAG	CT	CG	CGG	AAA	ACG	CA	T	CT	GAT	CG	ACCG	GGT	TT	TCAG	C	CG	T	TAT	G	CG	CG	CCG	TTTT	CT	TT	CT	CAAC		
C. werkmanii GK708	(1088)	TGGCTGGG	CCACT	CC	TCGT	GGT	ATTT	TG	CAACT	TGG	CGG	T	CA	ACG	CA	T	CT	GAT	CG	ACCG	GGT	TT	TCAG	CA	CT	TAT	G	CG	CG	CG	CCG	TTTT	CT	TT	CT	GAAC		
C. freundii GK100	(1087)	TGGCTGGG	T	CACT	CT	TCGT	GGT	ATTT	TG	CAG	CT	TGG	CGG	T	CA	ACG	TAT	CT	GAT	CG	ACCG	GGT	TT	TAG	CA	CT	TAT	G	CG	CG	CG	CCG	TTTT	CT	TT	CT	GAAC	
C. rodentium CIt02	(739)	-----																																				
C. koseri CIt01	(1088)	TGGCTGGG	CCAT	TCCT	C	TGGT	AT	TG	CAACT	TGG	CGG	A	AA	ACG	CA	T	CT	GAT	CG	ACCG	GGT	TT	TCAG	CAG	CT	TAT	G	CG	CG	CG	CCG	TTTT	CT	G	TT	CT	GAA	T

VIII. Anhang

Fortsetzung *ramRA* Alignment

206

	Section 13																			
	1189	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1287										
(1189) C. farmeri GK2519 (1189)	AAAGCGTT	CGCCGG	GGAGTAT	CCGTGGAC	AGCA	CAGGCG	ATGCCGGAG	ATCGAC	CTGCTGAT	CGTT	TCGCACGATCACTATGACCATCTGGATTACGCC									
C. sedlakii GK2552 (1186)	AAAGCGTTT	TCGGCG	GATTAC	CCCCTGGAC	CGCC	CAGGCA	ATGCCGGCG	ATCGATCTGCTGAT	CATTTCT	CACGATCAT	TATGACCATCTGGATTACGCC									
C. werkmanii GK708 (1187)	AAAGCCTTT	TGCCGG	GGATTAT	CCGTGGAC	CCGG	CAGACGAT	GCCGGAGATCG	ATCTGCT	CATCAT	CTCGCACGATCA	TATGACCATCTGGATCTCGCC									
C. freundii GK100 (1186)	AAAGCCTTT	TGCCGG	TGATTAT	CCGTGGT	CCGCA	CAGACGAT	GCCGGAGATCG	ATCTGCT	CAT	TATCTCGCACGATCACTATGACCATCTGGATCTCGCT										
C. rodentium CIt02 (739)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----									
C. koseri CIt01 (1187)	AAAGCCTTT	TGCCGG	AGACTAC	CCCCTGGAC	GCCG	CAAA	ATGCCGGAGATCG	AC	CTGCTGAT	CATCTCGCACGATCACTATGACCATCTGGAC	TACGCC									
	Section 14																			
	1288	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1386										
(1288) C. farmeri GK2519 (1288)	ACCATCA	CCGCA	TTAATG	CCGAAG	TGAAG	CGGTG	CTTACG	CCGCT	TGGCGT	CGG	CTCGCATCTGCGTTACTGGGGAATGAA	TGGCGACAT	TATTGAA							
C. sedlakii GK2552 (1285)	ACCATCA	AGGCGT	TGATGCC	AAAAG	TGAAG	CGGGT	GATTAC	GCCGCT	CGGCGT	CGG	TCGCATTTGCGG	TACTGGGG	TATGAACGGCGACATCATTGAG							
C. werkmanii GK708 (1286)	ACCATCA	AGGCGT	TAATG	CCGAAG	ATTA	ACGGGT	GATTAC	GCCGCT	GGTGT	G	GGGTCGCATCTGCGTTA	TGGGGAATG	CGCAGCGAGATAATCGAC							
C. freundii GK100 (1285)	ACGATCA	AGGCGT	TAATG	CCGAAA	ATTA	AAGCGGGT	GATTAC	GCCGCT	TGGCGT	AGG	TCACATCTAC	GGTTA	TGGGGAATGCGCGGCGAGATAATCGAC							
C. rodentium CIt02 (739)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----							
C. koseri CIt01 (1286)	ACCATCA	AAGCG	CTG	ATGCCGA	AGATTA	AAGCG	AGT	CATTAC	GCCGCT	GGTGT	G	GGATCGCATTTGCGG	TACTGGGGCATGAA	TGGCGG	GATT	TATCGAC				
	Section 15																			
	1387	1400	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1485										
(1387) C. farmeri GK2519 (1387)	GAGCGT	GACTGGA	ATCAGT	CCGT	CAGAGT	CGATGAT	TCGCTGAT	GATCC	CAGT	G	CTGCCCGCA	CGA	CATTTTTT	CCGGCG	TGGCATCAAGCGCA	AACCAG				
C. sedlakii GK2552 (1384)	GAGCGT	GACTGG	CA	CCAGT	TGTG	CGGGT	GGATGA	CGG	GCT	TTAT	ATTAC	AGT	ACTGCC	CGCCCGCC	CGCCATTTTT	CCGGAC	CGGGCATCAAGCGTAACCAG			
C. werkmanii GK708 (1385)	GAA	CGTGACT	GGAATC	AGTCC	CGT	CAGAGT	GACG	GATTC	ACTGAT	TG	TTCA	TGT	CTGCC	AGCCCGCC	ATTTTT	CGGGCG	AGGCATTAAGCGTAATCAG			
C. freundii GK100 (1384)	GAGATG	GACTGGA	ATCA	ATCC	ATCAGAGT	AACG	GATTC	GCTGAT	CG	TTCA	TG	CGT	TGCC	AGCCCG	T	CATTTTTT	CGGGAG	AGGCATCAAGCGCAATCAG		
C. rodentium CIt02 (739)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
C. koseri CIt01 (1385)	GAGCG	GACTGGA	CC	AGTCC	CGT	CAGGAT	CGATGAT	G	CGCTG	CT	GATCC	CAGT	C	CTGCCCGG	CGCC	ATTTTTT	CTGG	CGGG	GCTCAAA	CGTAACCAG
	Section 16																			
	1486	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1584										
(1486) C. farmeri GK2519 (1486)	ACGCTGT	GGGCCAG	TTTT	CTGTT	CGAAAC	ACCGGA	ACAGAA	GATTT	TATTAC	AGCGG	TGACT	CG	GGCTA	TGG	CCGCATTT	CA	G	GGCGATTGGCGAACAG		
C. sedlakii GK2552 (1483)	ACGCTGT	GGGCCAG	TTTT	CTGTTT	TGAAAC	CGCCGGA	ACAGAAA	ATTT	TACTAC	AGCGG	GACT	CT	GGCTAC	GG	CCGCATTT	CG	GGCGATTGGCGAACAG			
C. werkmanii GK708 (1484)	ACGCTGT	GGGCCAG	CTTT	TATGTTT	TGAAAT	TGCCGG	GGCAGAA	CGTTT	TATTAC	AGCGG	G	GAT	TCCGG	CTAC	GGG	CCGCATTTTAA	AGC	CATTGGCGAGCAG		
C. freundii GK100 (1483)	ACGCTA	TGGGC	GAGTTT	CATGTTT	TGAAAC	CGCCGG	GCAGAA	CGTTT	TATTAC	AGCGG	CGA	T	TCCGG	CTA	T	GGACCG	ATTTTAA	AGC	CATCGGCGAGCAG	
C. rodentium CIt02 (739)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C. koseri CIt01 (1484)	ACGCTGT	GGGG	GAGTTTT	TATGTTT	TGAG	ACGCC	T	GAACAGAA	G	TTTT	TATTAC	AGCGG	G	ACTCCGG	T	TACGG	G	CCGCATTTTAA	AGGCGATTGGA	GAACAG

VIII. Anhang

Fortsetzung *ramRA* Alignment

207

Section 17

	(1585)	1585	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1683
C. fameri GK2519 (1585)	TTTGGC	GGCA	TCGATCT	TGCC	ATTATGGAGA	ACGGCCA	ATATGACC	CAGGACTGGA	AAGTATATTC	CACATGATGCC	GAAGAGACCGC	G
C. sedlakii GK2552 (1582)	TTTGGC	GCGA	TCGAC	CTGGCGAT	CATGGAA	AACGGTCAGTAC	GACC	CGGACTGGA	AATACAT	CACATGATGCC	GAAGAGAC	GGCT
C. werkmanii GK708 (1583)	TTTGGC	TGGT	TGAT	TTGGCGAT	TATGGAGA	ACGGTCAGTAT	GACC	CAGGACTGGA	AAGTTTATTC	CACATGATGCC	GAAGAGAC	GGCT
C. freundii GK100 (1582)	TTTGGC	TGGT	TGAT	TTGGCGAT	TATGGAGA	ACGGCCA	CAGTATGACCA	TGACTGGA	AAGTTTATTC	CACATGATGCC	GAAGAGAC	GGCA
C. rodentium Cit02 (739)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C. koseri Cit01 (1583)	TT	CGCTC	AGTCGATCT	TGGC	CAT	CATGGAA	AACGGTCAGTAC	GACC	GGACTGG	CGA	TAC	ATTACATGATGCC

Section 18

	(1684)	1684	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1782
C. fameri GK2519 (1684)	GAT	TTGCGGG	CAAAAGC	GATTTT	GCCCGGTCAT	GCCGGAC	CGCTTT	TGTGCTGGC	AAAGCATAG	CTGGGAT	GAC	CCCTTAC
C. sedlakii GK2552 (1681)	GAT	CTGCGCC	CAGAGCCAT	CTTACC	GGGGCATGCC	GGAC	CGTTTT	TGTGCTGGC	GAAACACAC	CTGGGAT	GAT	CCCTTAA
C. werkmanii GK708 (1682)	GAT	CTGCGAT	GGAAGCC	GTTTT	GCCCGGTCAC	GCAGGTC	CGTTTT	TGTCTGGC	GAAACATA	CTGGGAT	GAT	CCCTTAA
C. freundii GK100 (1681)	GAT	CTGCGAT	GGAAGCC	GTTT	TACCAGG	CATGCAGGTC	CGTTTT	TGTCTGGC	GAAACATA	CTGGGAT	GAT	CCCTTAA
C. rodentium Cit02 (739)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C. koseri Cit01 (1682)	GA	CTGCGC	GCAAAAGC	GATTTT	TACCCGGTCAT	GCCGGG	CGTTTT	TGTCTGGC	GAAACAC	AGCTGGG	C	GATCCG

Section 19

	(1783)	1783	1790	1800	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1881
C. fameri GK2519 (1783)	CG	AAATAAA	AGCGT	TACCGCCTGCT	CACC	CCGATGCAGGGT	GAACCGGTGA	AGCTGG	ACGATTCAGCG	CAACGG	TTTAC	CA
C. sedlakii GK2552 (1780)	CG	TCATAAA	CCCT	TACCGCCTGCT	CAC	TCCGACGCTGGG	CAACCGGTGA	AGCTCG	ACGATCCGGCG	CAACAG	TTTAC	CG
C. werkmanii GK708 (1781)	CG	CAACAA	AGATT	TACCGACTGCT	GACGCCGAT	GCTGGGTGA	ACCGGT	CATACT	GTCCGAACCGGAC	CAAC	TTTAC	CG
C. freundii GK100 (1780)	CG	TCGTTA	CGATT	TACCGAT	TGCTGACGCCA	AATGCTGGST	GAACCGGT	AATACT	GTCCGACCGGAC	CAACT	TTTAC	CG
C. rodentium Cit02 (777)	CG	TCATAAA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
C. koseri Cit01 (1781)	CG	TCATAAA	CGC	TACCGCCTGCT	GACGCCGA	CCTGGG	GAACCGGTGATG	T	TGGCCGATCCG	ACCAG	TTTAC	CG

Section 20

	(1882)	1882	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980
C. fameri GK2519 (1881)	AT	ATTTG	CAGGAG	GAGGAG	TCC	GAATGACC	ATTTCTGCT	CAGGTTAT	CGACAG	CATTGTCG	AGTGGAT	AGATGAT
C. sedlakii GK2552 (1878)	CA	ATTTG	CAGGAG	GAGGAG	TGCT	GAATGACC	ATTTCTGCT	CAGGTAAT	CGACACC	ATTGTCG	AATGGAT	TGATGAA
C. werkmanii GK708 (1879)	TC	AATGA	ACACAG	GGGAGAG	CAT	GATGACC	ATTTCTGCT	CAGGTAAT	TGATAC	GATTGTT	GAATGGAT	TGATGAT
C. freundii GK100 (1878)	TC	AATGA	AACAG	GGGAGAG	CAT	GATGACC	ATTTCTGCT	CAGGTAAT	TGATAC	GATTGTT	GAATGGAT	TGATGAT
C. rodentium Cit02 (820)	TA	CTTTG	CAGGAG	GAGGAG	TCT	GAATGACC	ATTTCTGCA	CAGGTTAT	CGACACC	ATTGTCG	AATGGAT	TGATGAA
C. koseri Cit01 (1879)	CA	ATTTT	CGAGG	GGGAGAG	CAC	GATGACC	ATTTCTGCT	CAGGTAAT	CGACACC	ATTGTCG	AGTGGAT	TGATGAT

VIII. Anhang

Fortsetzung *ramRA* Alignment

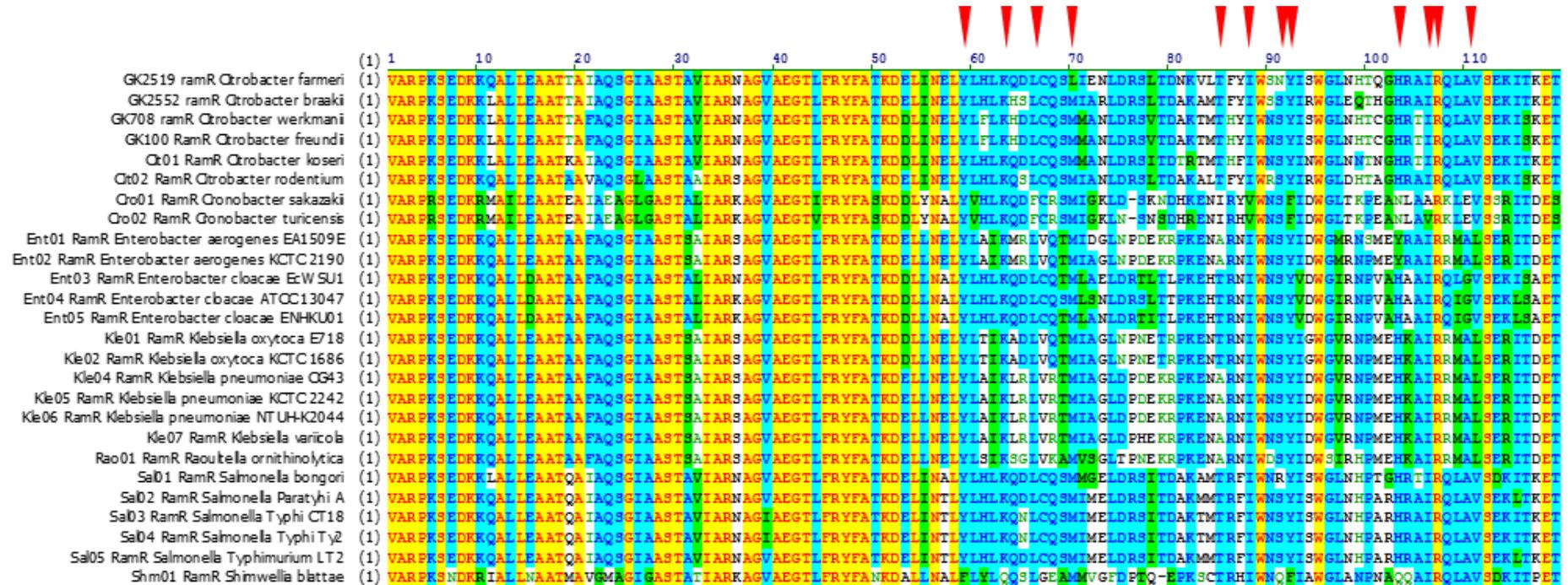
208

	Section 21																																																											
	1981	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2079																																																		
(1981) C. farmeri GK2519 (1980)	GAC	GAG	ATC	GC	AC	GCCA	TG	CG	GGT	TAT	TC	CAA	TGG	CA	CT	TG	CAG	CG	C	TG	TTT	TGC	AGT	ACA	AGG	GG	GAG	AG	C	CT	GGG	CG	CT	A	C	A	T	CG	G	A	G	C	G	C																
C. sedlakii GK2552 (1977)	GAC	GAT	ATC	GCC	CG	CCAC	GCG	GGT	TAT	TC	CA	AGT	GG	CA	TT	TG	CAG	CG	T	TTT	AT	G	C	A	G	T	ACA	AGG	GG	GAG	AG	T	CT	GG	A	C	G	T	A	C	A	T	CG	G	A	G	C	G	T											
C. werkmanii GK708 (1978)	GAT	GAT	AT	TGC	CG	CCAT	GCG	GGT	TAT	TC	CA	AA	TGG	CA	C	T	A	C	A	G	CG	T	TTT	AT	G	C	A	G	T	ACA	AGG	GG	GAG	AG	C	CT	GG	G	CG	T	A	C	A	T	CG	G	A	G	C	G	T									
C. freundii GK100 (1977)	GAT	GAT	AT	TGC	CG	CCAT	GCG	GGT	TAT	TC	CA	AA	TGG	CA	C	T	A	C	A	G	CG	T	TTT	AT	G	C	A	G	T	ACA	AGG	GG	GAG	AG	C	CT	GG	G	CG	T	A	C	A	T	CG	G	A	G	C	G	T									
C. rodentium Ctt02 (1919)	GAC	GAT	AT	TGC	CG	CCAT	GCG	GGT	TAT	TC	CA	AA	TGG	CA	C	T	A	C	A	G	CG	T	TTT	AT	G	C	A	G	T	ACA	AGG	GG	GAG	AG	T	CT	GG	G	CG	T	A	C	A	T	CG	G	A	G	C	G	T									
C. koseri Ctt01 (1978)	GAT	GAT	AT	TGC	CG	CCAC	GCG	GGT	TAT	TC	CA	AA	TGG	CA	C	T	A	C	A	G	CG	T	TTT	AT	G	C	A	G	T	ACA	AGG	GG	GAG	AG	T	CT	GG	G	CG	T	A	C	A	T	CG	G	A	G	C	G	T									
	Section 22																																																											
	2080	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2178																																																		
(2080) C. farmeri GK2519 (2079)	AAA	CTG	CTG	CTG	GGC	GCG	CGG	GAT	CTG	CG	GA	AT	CC	GA	CG	CA	AA	AGT	GT	AT	G	A	C	A	T	T	G	T	C	T	G	CG	C	T	A	C	GG	G	T	T	G	A	C	T	C	A	G	C	A	G	A	C	T	T	T	A	C	C	G	T
C. sedlakii GK2552 (2076)	AAG	CTG	CTG	CTG	GGC	GCG	CGG	GAT	CTG	CG	GA	AT	CC	GA	CG	CA	AA	AGT	GT	AT	G	A	C	A	T	T	G	T	C	T	G	CG	C	T	A	C	GG	G	T	T	G	A	C	T	C	A	G	C	A	G	A	C	T	T	T	A	C	C	G	T
C. werkmanii GK708 (2077)	AAA	CTG	CTG	CTG	GGC	GCG	CGG	GAT	CTG	CG	GA	AT	CC	GA	CG	CA	AA	AGT	GT	AT	G	A	C	A	T	T	G	T	C	T	G	CG	C	T	A	C	GG	G	T	T	G	A	C	T	C	A	G	C	A	G	A	C	T	T	T	A	C	C	G	T
C. freundii GK100 (2076)	AAG	CTG	CTG	CTG	GGC	GCG	CGG	GAT	CTG	CG	GA	AT	CC	GA	CG	CA	AA	AGT	GT	AT	G	A	C	A	T	T	G	T	C	T	G	CG	C	T	A	C	GG	G	T	T	G	A	C	T	C	A	G	C	A	G	A	C	T	T	T	A	C	C	G	T
C. rodentium Ctt02 (1018)	AAG	CTG	CTG	CTG	GGC	GCG	CGG	GAT	CTG	CG	GA	AT	CC	GA	CG	CA	AA	AGT	GT	AT	G	A	C	A	T	T	G	T	C	T	G	CG	C	T	A	C	GG	G	T	T	G	A	C	T	C	A	G	C	A	G	A	C	T	T	T	A	C	C	G	T
C. koseri Ctt01 (2077)	AAG	CTG	CTG	CTG	GGC	GCG	CGG	GAT	CTG	CG	GA	AT	CC	GA	CG	CA	AA	AGT	GT	AT	G	A	C	A	T	T	G	T	C	T	G	CG	C	T	A	C	GG	G	T	T	G	A	C	T	C	A	G	C	A	G	A	C	T	T	T	A	C	C	G	T
	Section 23																																																											
	2179	2190	2200	2210	2220	2230	2240	2253																																																				
(2179) C. farmeri GK2519 (2178)	AT	TTT	ACCCG	TAC	GT	TAA	CC	AG	CCG	CCG	GGT	GC	CTA	CC	GT	AA	AGA	AAA	T	C	A	G	T	CG	GG	CG	CA	CT	GA	-----																														
C. sedlakii GK2552 (2175)	AT	TTT	ACCCG	CAC	GT	TAA	CC	AG	CCG	CCG	GGC	GC	CTA	CC	GT	AA	AGA	AAA	T	C	A	G	T	CG	GG	CG	CA	CT	GA	-----																														
C. werkmanii GK708 (2176)	AT	TTT	ACCCG	TAC	GT	TAA	CC	AG	CCG	CCG	GGC	GC	CTA	CC	GT	AA	AGA	AAA	T	C	A	G	T	CG	GG	CG	CA	CT	GA	-----																														
C. freundii GK100 (2175)	AT	TTT	ACCCG	TAC	GT	TAA	CC	AG	CCG	CCG	GGC	GC	CTA	CC	GT	AA	AGA	AAA	T	C	A	G	T	CG	GG	CG	CA	CT	GA	-----																														
C. rodentium Ctt02 (1117)	AT	TTT	ACCCG	CAC	GT	TAA	CC	AG	CCG	CCG	GGC	GC	CTA	CC	GT	AA	AGA	AAA	T	C	A	G	T	CG	GG	CG	CA	CT	GA	-----																														
C. koseri Ctt01 (2176)	AT	TTT	ACCCG	AAC	GT	TAA	CC	AG	CCG	CCG	GGC	GC	CTA	CC	GT	AA	AGA	AAA	T	C	A	G	T	CG	GG	CG	CA	CT	GA	-----																														

VIII. Anhang

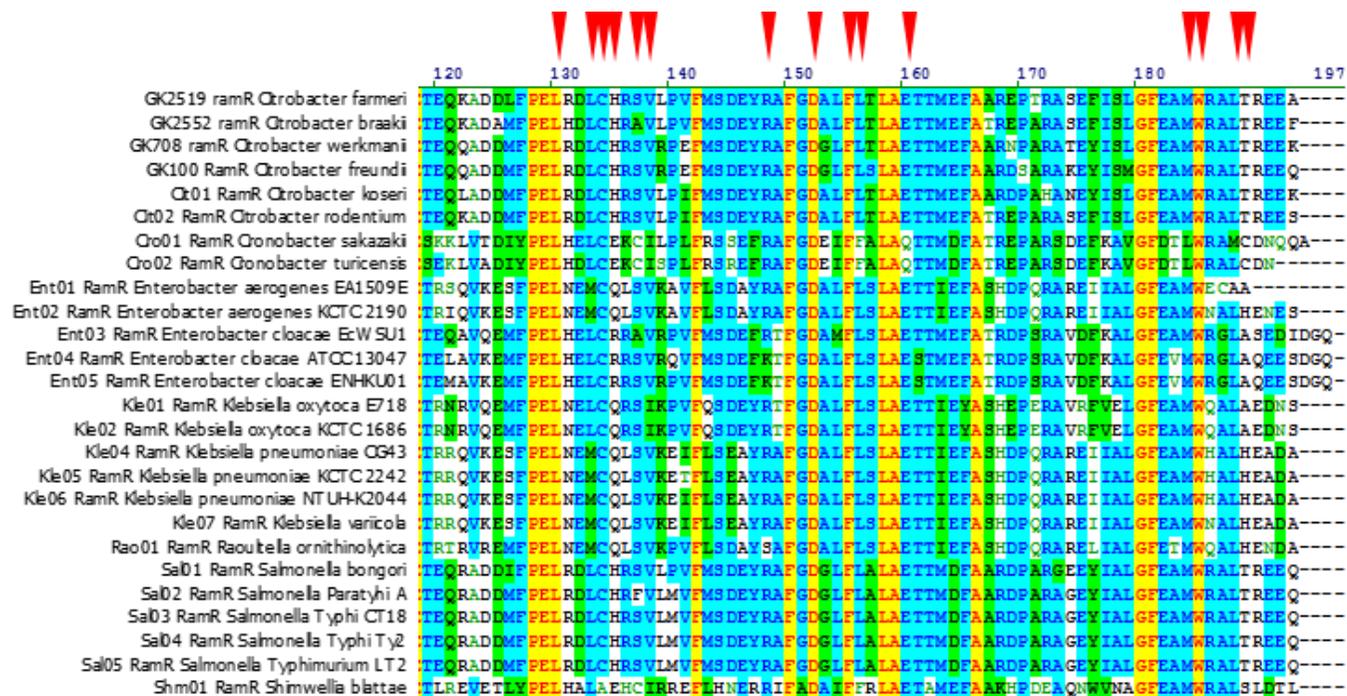
VIII.1.2.4 RamR-Alignment

Rote Pfeile markieren die Substanzinteraktionspunkte mit den Substanzen Ethidiumbromid, Rhodamin 6G, Berberin, Kristalviolett und Dequalinum (nach Yamasaki et al. 2013).



VIII. Anhang

Fortsetzung des RamR-Alignments



VIII. Anhang

VIII.1.2.5 RomA Alignment

	(1)	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130															
Cit01 RomA Citrobacter koseri	(1)	-MKRLTICV	VVIML	LASTAS	LPFV	LNAGFG	QVPO	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
GK2519 RomA Citrobacter farmeri	(1)	-MKPLVVC	VVIML	LASAAT	LPFV	LNAGFG	QAPQ	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
GK2552 RomA Citrobacter braaki	(1)	-MKRLTVC	VVIML	LASAAT	LPFV	LNAGFG	QAPQ	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
GK100 RomA Citrobacter freundii	(1)	-MKRLTVC	VVIML	LASAAT	LPFV	LNAGFG	QAPQ	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
GK708 RomA Citrobacter werkmanii	(1)	-MKRLTVC	VVIML	LASAAT	LPFV	LNAGFG	QAPQ	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
Ent03 RomA Enterobacter cloacae EcWSU1	(1)	MKKPLFIC	VVIML	LASAAS	LPFV	LNAGFG	QVPO	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
Ent04 RomA Enterobacter cloacae ATCC 13047	(1)	MKSLFIC	VVIML	LASAAS	LPFV	LNAGFG	QVPO	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
Ent05 RomA Enterobacter cloacae ENHKU01	(1)	MKKTIFIC	VVIML	LASAAS	LPFV	LNAGFG	QVPO	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
Kle01 RomA Klebsiella oxytoca E718	(1)	-MNRVTF	VVAIML	LASAAT	LPFV	LNAGFG	QAPQ	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
Kle02 RomA Klebsiella oxytoca KCTC 1686	(1)	-MNRVTF	VVAIML	LASAAT	LPFV	LNAGFG	QAPQ	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
Rao01 RomA Raoultella omithinolytica	(1)	-MNRVTF	VVAIML	LASAAT	LPFV	LNAGFG	QAPQ	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
Ent01 RomA Enterobacter aerogenes EA1509E	(1)	-MNRVTF	VVAIML	LASAAT	LPFV	LNAGFG	QAPQ	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
Ent02 RomA Enterobacter aerogenes KCTC 2190	(1)	-MNRVTF	VVAIML	LASAAT	LPFV	LNAGFG	QAPQ	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
Kle07 RomA Klebsiella varicola	(1)	-MNRVTF	VVAIML	LASAAT	LPFV	LNAGFG	QAPQ	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
Kle05 RomA Klebsiella pneumoniae KCTC242	(1)	-MNRVTF	VVAIML	LASAAT	LPFV	LNAGFG	QAPQ	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
Kle04 RomA Klebsiella pneumoniae CG43	(1)	-MNRVTF	VVAIML	LASAAT	LPFV	LNAGFG	QAPQ	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN
Kle06 RomA Klebsiella pneumoniae NTU4-K2044	(1)	-MNRVTF	VVAIML	LASAAT	LPFV	LNAGFG	QAPQ	GAQL	SLVEQ	SPHYRD	GC	FHNQ	LPTPG	YTGK	GMLAA	WWEFL	VAKRENAR	PAQPLPLV	NTDLAS	VPRDR	DTL	IWLGHSSWY	LQ	LAKRIL	IDP	VFS	YA	AP	S	FLN

	(140)	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260																																									
Cit01 RomA Citrobacter koseri(139)	KAFAGD	YPWTAQ	NMPE	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	NGG	LID	ERD	WNC	SVR	DD	ALL	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G		
GK2519 RomA Citrobacter farmeri(139)	KAFAGD	YPWTAQ	NMPE	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	NGD	LIE	ERD	WNC	SVR	DD	SLM	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G		
GK2552 RomA Citrobacter braaki(139)	KAFVGD	YPWTAQ	NMPE	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	NGD	LIE	ERD	WNC	SVR	DD	G	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G	
GK100 RomA Citrobacter freundii(139)	KAFAGD	YPWTAQ	NMPE	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	RGE	LID	ERD	WNC	SVR	DD	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G	
GK708 RomA Citrobacter werkmanii(139)	KAFAGD	YPWTAQ	NMPE	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	RSE	LID	ERD	WNC	SVR	DD	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G	
Ent03 RomA Enterobacter cloacae EcWSU1(140)	KAFAGD	YPWTAQ	NMPE	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	KPE	LIE	ERD	WNC	SVR	DD	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G	
Ent04 RomA Enterobacter cloacae ATCC 13047(140)	KAFAGD	YPWTAQ	NMPE	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	KPE	LIE	ERD	WNC	SVR	DD	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G	
Ent05 RomA Enterobacter cloacae ENHKU01(140)	KAFAGD	YPWTAQ	NMPE	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	KPE	LIE	ERD	WNC	SVR	DD	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G	
Kle01 RomA Klebsiella oxytoca E718(139)	KAFAGD	YPWHAEG	MPED	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	SA	I	IS	E	AD	WNC	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G	
Kle02 RomA Klebsiella oxytoca KCTC 1686(139)	KAFAGD	YPWHAEG	MPED	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	SA	I	IS	E	AD	WNC	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G	
Rao01 RomA Raoultella omithinolytica(139)	KAFPGD	YPWHAER	MPED	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	SA	I	IS	E	AD	WNC	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G	
Ent01 RomA Enterobacter aerogenes EA1509E(139)	KAFPGD	YPWNAQR	MPED	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	DA	I	IS	E	AD	WNC	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G	
Ent02 RomA Enterobacter aerogenes KCTC 2190(139)	KAFPGD	YPWNAQR	MPED	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	DA	I	IS	E	AD	WNC	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G	
Kle07 RomA Klebsiella varicola(139)	KAFPGD	YPWRAEG	MPED	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	DG	A	I	IS	E	AD	WNC	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G
Kle05 RomA Klebsiella pneumoniae KCTC242(139)	KAFPGD	YPWRAEG	MPED	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	DG	A	I	IS	E	AD	WNC	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G
Kle04 RomA Klebsiella pneumoniae CG43(139)	KAFPGD	YPWRAEG	MPED	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	DG	A	I	IS	E	AD	WNC	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G
Kle06 RomA Klebsiella pneumoniae NTU4-K2044(139)	KAFPGD	YPWRAEG	MPED	IDLLI	SHDHYD	HLDYAT	IKAL	MPKIKR	VITPL	GVGSH	LRYWGM	DG	A	I	IS	E	AD	WNC	S	L	I	HVLP	PARH	FSGR	G	LKR	Q	T	L	W	A	S	F	M	E	T	P	Q	K	I	Y	S	G	D	S	G	Y	G	P	H	F	K	A	I	G

VIII. Anhang

	(221)	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	378																																																																																												
Cit01 RomA Citrobacter koseri(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	M	A	D	P	T	Q	C	F	T	A	W	E	-----											
GK2519 RomA Citrobacter farmeri(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	K	L	D	S	A	Q	R	F	T	T	W	D	Q	A	T	Y	L	Q	E	R	S	S	E	-----
GK2552 RomA Citrobacter braakii(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	K	L	D	S	A	Q	R	F	T	T	W	D	Q	A	T	Y	L	Q	E	R	S	S	E	-----
GK100 RomA Citrobacter freundii(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	K	L	D	S	A	Q	R	F	T	T	W	D	Q	A	T	Y	L	Q	E	R	S	S	E	-----
GK708 RomA Citrobacter werkmani(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	K	L	D	S	A	Q	R	F	T	T	W	D	Q	A	T	Y	L	Q	E	R	S	S	E	-----
Ent03 RomA Enterobacter cloacae EcWSU1(221)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	H	V	S	D	T	T	C	F	R	E	W	E	-----											
Ent04 RomA Enterobacter cloacae ATCC 13047(221)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	R	V	S	D	T	T	C	F	R	E	W	E	-----											
Ent05 RomA Enterobacter cloacae ENHKU01(221)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	R	V	S	D	T	T	C	F	R	E	W	E	-----											
Kle01 RomA Klebsiella oxytoca E718(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	W	V	A	D	K	T	Q	S	E	N	A	W	R	-----										
Kle02 RomA Klebsiella oxytoca KCTC 1686(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	W	V	A	D	K	T	Q	S	E	N	A	W	R	-----										
Rao01 RomA Raoutella ornithinolytica(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	W	V	A	D	K	T	Q	S	E	N	A	W	R	-----										
Ent01 RomA Enterobacter aerogenes EA1509E(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	W	V	A	D	K	T	Q	S	E	N	A	W	R	-----										
Ent02 RomA Enterobacter aerogenes KCTC 2190(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	W	V	A	D	K	T	Q	S	E	N	A	W	R	-----										
Kle07 RomA Klebsiella variicola(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	W	V	A	D	K	T	Q	S	E	N	A	W	R	-----										
Kle05 RomA Klebsiella pneumoniae KCTC2242(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	W	V	A	D	K	T	Q	S	E	N	A	W	R	-----										
Kle04 RomA Klebsiella pneumoniae CG43(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	W	V	A	D	K	T	Q	S	E	N	A	W	R	-----										
Kle06 RomA Klebsiella pneumoniae NTUH-K2044(220)	E	Q	F	G	S	V	D	L	A	I	M	E	N	G	Q	Y	D	R	D	W	K	Y	I	H	M	F	E	T	A	Q	A	A	D	L	R	A	K	A	T	L	P	G	H	A	G	R	F	V	L	A	K	H	S	W	D	D	P	K	R	L	A	L	A	S	R	H	K	R	P	R	L	L	T	F	T	L	G	E	F	V	W	V	A	D	K	T	Q	S	E	N	A	W	R	-----										

VIII.1.2.6 RamA Alignment

	(1)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	121																																																																																																			
GK2519 RamA Citrobacter farmeri	(1)	N	T	I	S	A	Q	V	I	D	T	I	V	E	I	D	N	L	H	Q	P	L	R	I	D	D	I	A	R	H	A	G	S	K	W	H	L	Q	R	L	F	L	Q	Y	K	G	E	S	L	G	R	Y	T	R	E	R	K	L	L	A	A	R	D	L	R	E	S	D	A	K	V	V	D	I	C	L	R	Y	G	F	D	S	Q	T	F	T	R	I	F	T	R	T	F	N	O	P	P	G	A	Y	R	K	E	N	H	S	R	A	H	-----		
GK2552 RamA Citrobacter braakii	(1)	N	T	I	S	A	Q	V	I	D	T	I	V	E	I	D	N	L	H	Q	P	L	R	I	D	D	I	A	R	H	A	G	S	K	W	H	L	Q	R	L	F	L	Q	Y	K	G	E	S	L	G	R	Y	T	R	E	R	K	L	L	A	A	R	D	L	R	E	S	D	E	K	V	V	D	I	C	L	R	Y	G	F	D	S	Q	T	F	T	R	I	F	T	R	T	F	N	O	P	P	G	A	Y	R	K	E	N	H	S	R	T	H	P	A	-----
GK708 RamA Citrobacter werkmani	(1)	N	T	I	S	A	Q	V	I	D	T	I	V	E	I	D	N	L	H	Q	P	L	R	I	D	D	I	A	R	H	A	G	S	K	W	H	L	Q	R	L	F	L	Q	Y	K	G	E	S	L	G	R	Y	T	R	E	R	K	L	L	A	A	R	D	L	R	D	T	D	Q	R	V	D	I	C	L	R	Y	G	F	D	S	Q	T	F	T	R	I	F	T	R	T	F	N	O	P	P	G	A	Y	R	K	E	N	H	S	R	T	H	-----			
GK100 RamA Citrobacter freundii	(1)	N	T	I	S	A	Q	V	I	D	T	I	V	E	I	D	N	L	H	Q	P	L	R	I	D	D	I	A	R	H	A	G	S	K	W	H	L	Q	R	L	F	L	Q	Y	K	G	E	S	L	G	R	Y	T	R	E	R	K	L	L	A	A	R	D	L	R	D	T	D	Q	R	V	D	I	C	L	R	Y	G	F	D	S	Q	T	F	T	R	I	F	T	R	T	F	N	O	P	P	G	A	Y	R	K	E	N	H	S	R	T	H	-----			
Cit01 RamA Citrobacter koseri ATCC BAA895	(1)	N	T	I	S	A	Q	V	I	D	T	I	V	E	I	D	N	L	H	Q	P	L	R	I	D	D	I	A	R	H	A	G	S	K	W	H	L	Q	R	L	F	L	Q	Y	K	G	E	S	L	G	R	Y	T	R	E	R	K	L	L	A	A	R	D	L	R	D	T	D	Q	R	V	D	I	C	L	R	Y	G	F	D	S	Q	T	F	T	R	I	F	T	R	T	F	N	O	P	P	G	A	Y	R	K	E	N	H	S	R	T	H	-----			
Cit02 RamA Citrobacter rodentium	(1)	N	T	I	S	A	Q	V	I	D	T	I	V	E	I	D	N	L	H	Q	P	L	R	I	D	D	I	A	R	H	A	G	S	K	W	H	L	Q	R	L	F	L	Q	Y	K	G	E																																																																	

VIII.2 Gefahrstoffverzeichnis

In **Tabelle VIII-4** sind die in dieser Arbeit verwendeten KMR-Substanzen aufgelistet.

Tabelle VIII-4: Liste aller verwendeten KMR-Substanzen.

Cas-Nr.	IUPAC-Bezeichnung	Kategorie
67-66-3	Trichlormethan (Chloroform)	Karzinogen; Kategorie 2; H351
1239-45-8	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium-bromid (Ethidiumbromid)	Keimzellmutagen; Kategorie 2; H341
108-95-2	Benzenol (Phenol)	Keimzellmutagen; Kategorie 2; H341

In **Tabelle VIII-5** sind die in dieser Arbeit verwendeten Gefahrstoffe aufgelistet.

Tabelle VIII-5: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Gefahrstoffe.

Substanz	Gefahrensymbol	GHS-Gefahrenhinweise (Hazard)	GHS-Sicherheitshinweise (Precaution)
Acetonitril	 	H225-H302 + H312 + H332-H319	P210-P261-P280-P305 + P351 + P338-P370 + P378- P403 + P235
Calciumchlorid-Dihydrat		H319	P305 + P351 + P338
Chloroform	 	H302-H315-H319-H331- H336-H351-H361d-H372	P261-P281-P305 + P351 + P338-P311
Ethanol	 	H225 + H319	P210 + P240 + P305-P351- P338 + P403-P233
Ethylendiamintetra-acetat		H319	P305 + P351 + P338

VIII. Anhang

Substanz	Gefahren- symbol	GHS-Gefahrenhinweise (Hazard)	GHS-Sicherheitshinweise (Precaution)
Isoamylalkohol	 	H226-H315-H319-H332- H335	P210-P261-P280-P304 + P340 + P312-P337 + P313- P403 + P235
Isopropanol	 	H225-H319-H336	P210-P261-P305 + P351 + P338
Kaliumhydroxid	 	H290-H302-H314	P280-P301 + P312 + P330- P303 + P361 + P353-P304 + P340 + P310-P305 + P351 + P338
Natriumdodecylsulfat (SDS)	  	H228-H302 + H332- H315-H318-H335-H412	P210-P261-P280-P301 + P312 + P330-P305 + P351 + P338 + P310-P370 + P378
Natriumhydroxid		H290 + H314	P280 + P301-P330-P331 + P305-P351+P338 + P308- P310
Phenol	   	H301 + H311 + H331- H314-H341-H373-H411	P260-P280-P303 + P361 + P353-P304 + P340 + P310- P305 + P351 + P338

VIII. Anhang

Substanz	Gefahrensymbol	GHS-Gefahrenhinweise (Hazard)	GHS-Sicherheitshinweise (Precaution)
Salzsäure (37 %)	 	H290-H314-H335	P260-P280-P303 + P361 + P353-P304 + P340 + P310-P305 + P351 + P338
Trichloressigsäure	 	H314-H410	P260-P280-P303 + P361 + P353-P304 + P340 + P310-P305 + P351 + P338
Xylencyanol		H315 + H319 + H335	P261 + P305-P351 + P338
α -Cyano-4-Hydroxymizsäure		H315-H319-H335	P261-P305 + P351 + P338

VIII.3 Abkürzungsverzeichnis

In **Tabelle VIII-6** sind alle allgemeinen Abkürzungen, in **Tabelle VIII-7** alle Abkürzungen für Gene, in **Tabelle VIII-8** die Abkürzungen für DNA-Basen und in **Tabelle VIII-9** alle Abkürzungen für Aminosäuren aufgeführt, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle VIII-6: Auflistung aller allgemeinen Abkürzungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Abkürzung	Bedeutung
®	registrierter Markenname (englisch: registered trademark)
°C	Celsius
ad	auf (lateinisch)
ADH	Argininhydrolase
ADOF	Adonit-Fermentation
AMP	Adenosinmonophosphat
AmpR/ApR	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ARMS	sequenzspezifische-PCR (englisch amplification refractory mutation system)
as	Aminosäure

VIII. Anhang

Abkürzung	Bedeutung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare (englisch base pairs)
BSA	Rinderserumalbumin (englisch bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoffatom
Ca	Calcium-Atom
ca.	circa
CCLR	englisch: cell culture lysis reagent
ChlR	Chloramphenicol-Resistenz
CIP	Ciprofloxacin
CIT	Citrat
Cl	Chloratom
Da	Dalton
dH ₂ O	Reinstwasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EB	Elutionspuffer (englisch elution buffer)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPI	Effluxpumpeninhibitor
ESC	Esculin-Hydrolyse
et al.	und andere (lateinisch: et alii)
EtBr	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
FC	numerische Angabe eines Verhältnisses (englisch: fold change)
for	vorwärts (englisch: forward)
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigungskonstante
GK	Glycerinkulturnummer
GLUF	Glucose-Fermentation
GTE-Puffer	Glucose-Tris-EDTA-Puffer
h	Stunde/n
H	Wasserstoffatom
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HTH	Helix-Turn-Helix - Motiv
IND	Indol
inkl.	inklusive
INOF	Inosit-Fermentation
k	kilo (1 x 10 ³)

VIII. Anhang

Abkürzung	Bedeutung
K	Kaliumatom
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
KBE	koloniebildende Einheiten
KPE-Puffer	Kaliumphosphat-EDTA-Puffer
L	Liter
LAR	englisch luciferase assay reagent
LB	Luria-Bertani
LDC	Lysindecaboxylase
Lsg.	Lösung
m	milli (1×10^{-3})
M	Molar (mol/L)
MAL	Malonat
max.	Maximal
MDR	englisch: multiple drug resistance
MFS	englisch: major facilitator superfamily
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	englisch: messenger RNA
MW	molecular weight
n	nano (1×10^{-9})
N	Stickstoffatom
Na	Natriumatom
NAL	Nalidixinsäure
NCBI Acc.nr.	Accession number der NCBI Datenbanken
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
ns	Nanosekunde/n
NTC	PCR-Kontrolle ohne DNA-Template (englisch: no template control)
O	Sauerstoffatom
OD	optische Dichte
ODC	Ornithindecaboxylase
OMP	englisch: outer membrane protein
ONPG	o-Nitrophenyl- β -Galaktopyranosid-Test zum Nachweis der β -Galactosidase
ONPX	o-Nitrophenylen- β -Xylosid-Test zum Nachweis der β -Xylosidase
ORF	offener Leserahmen (englisch: open reading frame)

VIII. Anhang

Abkürzung	Bedeutung
ori	Replikationsursprung (englisch: origin of replication)
p	Promotor
p.a.	analysenrein (lateinisch: pro analysi)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: polymerase chain reaction)
PGUR	p-Nitrophenylen- β -Glucuronid-Test zum Nachweis der β -Glucuronidase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PUR	Puromycin
QRDR	Chinolonresistenz determinierende Region (englisch: quinolone resistance determining region)
rev	rückwärts (englisch: reverse)
RHAF	Rhamnose-Fermentation
RLU	Relative Lichteinheiten (engl. relative light units)
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RND	englisch: resistance nodulation cell division
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: rounds per minute)
RS	Referenzstamm
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde/n
Sal	Salicylat
SDS	Natriumdodecylsulfat (englisch: sodium dodecyl sulfate)
SORF	Sorbit-Fermentation
SSM	site-specific mutagenesis (englisch: ortsspezifischen Mutagenese)
SUCF	Saccharose-Fermentation
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TDA	Tryptophan-Deaminase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TET	Tetracyclin
TFB	englisch: tranformation buffer
Tm	Schmelztemperatur
™	Markenname (englisch: trade mark)
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Einheiten (englisch: Units)
URE	Urease
UV	ultraviolett
V	Volt

Abkürzung	Bedeutung
VP	Voges-Proskauer-Test zum Nachweis der Bildung von Acetoin
XYLF	Xylose-Fermentation
μ	mikro (1 x 10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
π-π	molekulare Wechselwirkung zwischen delokalisierten Elektronen

Tabelle VIII-7: Auflistung aller Gene und ihrer Genprodukte, die in dieser Arbeit Erwähnung fanden.

Gen	Genprodukt
<i>aac(6')Ib</i>	kodiert für die Aminoglykosid-Acyltransferase AAC(6')Ib
<i>acrA</i>	kodiert für das periplasmatische Adapterprotein AcrA der AcrAB-TolC Effluxpumpe
<i>acrB</i>	kodiert für das Pumpenprotein AcrB der AcrAB-TolC Effluxpumpe
<i>acrE</i>	kodiert für das periplasmatische Adapterprotein AcrE der AcrEF-TolC Effluxpumpe
<i>acrF</i>	kodiert für das Pumpenprotein AcrF der AcrEF-TolC Effluxpumpe
<i>acrR</i>	kodiert für den lokalen Repressor AcrR von <i>acrAB</i>
<i>acrS</i>	kodiert für den Repressor AcrS von <i>acrAB</i> und <i>acrEF</i>
<i>aphA</i>	kodiert für eine Aminoglykosid-Phosphotransferase
<i>aphA1</i>	kodiert für die Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase
<i>cat</i>	kodiert für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
<i>gyrA</i>	kodiert für die A-Untereinheit der Gyrase
<i>gyrB</i>	kodiert für die B-Untereinheit der Gyrase
<i>luc</i>	kodiert für die Luciferase
<i>marA</i>	kodiert für den globalen Transkriptionsfaktor MarA
<i>marB</i>	kodiert für ein unbekanntes Genprodukt
<i>marC</i>	kodiert für ein putatives Membranprotein unbekannter Funktion
<i>marO</i>	Operatorregion des mar Operons
<i>marR</i>	kodiert für den Repressor des mar Operons MarR
<i>micF</i>	kodiert für die nicht translatierte antisense RNA <i>micF</i>
<i>ompF</i>	kodiert für das Porin OmpF in der äußeren Membran
<i>parC</i>	kodiert für die A-Untereinheit der Topoisomerase IV
<i>parE</i>	kodiert für die B-Untereinheit der Topoisomerase IV
<i>qepA</i>	kodiert für die Chinolon-spezifische Effluxpumpe QepA
<i>qnr</i>	kodiert für das Schutzprotein der Topoisomerasen Qnr
<i>ramA</i>	kodiert für den globalen Transkriptionsfaktor RamA
<i>ramR</i>	kodiert für den Regulator RamR
<i>romA</i>	kodiert für ein unbekanntes Genprodukt
<i>soxR</i>	kodiert für den Regulator SoxR
<i>soxS</i>	kodiert für den globalen Transkriptionsfaktor SoxS

VIII. Anhang

Gen	Genprodukt
<i>tolC</i>	kodiert für das Porin TolC in der äußeren Membran
<i>topA</i>	kodiert für die A-Untereinheit der Topoisomerase I

Tabelle VIII-8: Auflistung aller Abkürzungen für DNA-Basen in dieser Arbeit.

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
B	C/G/T
C	Cytosin
G	Guanin
H	A/C/T
K	G/T
M	A/C
N	C/G/T/A
R	A/G
S	G/C
T	Thymin
U	Uracil
W	A/T
Y	C/T

Tabelle VIII-9: Liste aller Aminosäureanbkürzungen im Drei- und Einbuchstabencode.

Aminosäure	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

VIII.4 Publikationen zu dieser Dissertation

The multiple drug resistance efflux pump regulator RamA from *Citrobacter koseri* reveals high structural and functional homology with the transcription factor MarA in *Escherichia coli*

Alexander Reinhardt, Daniel Hasenpusch, Anke Heisig, Peter Heisig

25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases - ECCMID,

Copenhagen, Denmark; April 2015

Posternummer EV0170

Overexpression of *ramA* from *Citrobacter freundii* mediates MDR phenotype in various *Citrobacter species* and also in *Escherichia coli*

Alexander Reinhardt, Franziska Kühn, Anke Heisig, Peter Heisig

24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases - ECCMID,

Barcelona, Spanien; Mai 2014

Posternummer P1102

Molecular genetics and epidemiology of the *ramR-romA-ramA* regulatory system controlling the expression of multiple drug resistance efflux pump AcrAB-TolC in antibiotic resistant enterobacteriaceae

Alexander Reinhardt, Franziska Pott, Anke Heisig, Peter Heisig

Joint meeting of the Southern Danish Universities and University of Hamburg,

Sandbjerg, Dänemark; November 2011

VIII.5 Lebenslauf

Alexander Anhorn, geb. Reinhardt
 Geboren am 26. Juni 1986 in Nordhausen, Thüringen

Ausbildung

Promotionsstudium	Untersuchungen zur Rolle des <i>ramRA</i> -Operons bei der Ausprägung multipler Antibiotikaresistenz in <i>Citrobacter</i> -Arten
seit 03/2011	Universität Hamburg
Master of Science	Mikrobiologie
10/2008 – 11/2010	Friedrich-Schiller-Universität Jena Abschlussnote 1,4
Bachelor of Science	Biologie
10/2005 – 9/2008	Universität Hamburg Abschlussnote 1,4
Abitur	Gymnasium Dörpsweg, Hamburg
06/2005	Abschlussnote 2,0

Berufserfahrung

Sales Force Effectiveness Manager	Santis GmbH
Seit 02/2016	Betreuung von CRM-Systemen, Umsatz- und Performancereporting, Prämienberechnung und Zielgruppensteuerung, Außendiensttätigkeit für AstraZeneca
Pharmareferent	Santis GmbH
07/2015 – 01/2016	Wissenschaftlicher Außendienst für AstraZeneca, Produkteinführungen im Bereich Primary Healthcare
Freiberufliche Tätigkeit	Lehrbeauftragter der Universität Hamburg
10/2014 – 03/2015	Lehrtätigkeit im Fach Pharmazeutische Biologie
Wissenschaftlicher Mitarbeiter	Universität Hamburg, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Abteilung für Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie, Prof. Heisig
04/2011 – 08/2014	Grundlagenerforschung von Mechanismen multipler Antibiotikaresistenz, Fachliche Betreuung von Kooperationspartnern, Lehrtätigkeit in den Studiengängen Pharmazie und Master of Science Allgemeine Biologie

Studentische Hilfskraft	Helmut-Schmidt-Universität Universität der Bundeswehr Hamburg
12/2007 – 06/2008	Mikrobiologische Untersuchungen für eine technische Diplomarbeit
Tutor	Universität Hamburg
12/2006 – 2/2007	Lerngruppenleitung im Studiengang Bachelor of Science Biologie

Weitere Publikationen

The Emergence of Reduced Ciprofloxacin Susceptibility in *Salmonella enterica* Causing Bloodstream Infections in Rural Ghana.

Clin Infect Dis. 2016 Mar 15;62 Suppl 1:S32-6. doi: 10.1093/cid/civ757.

Daniel Eibach, Hassan M. Al-Emran, Denise Myriam Dekker, Ralf Krumkamp, Yaw Adu-Sarkodie, Ligia Maria Cruz Espinoza, Christa Ehmen, Kennedy Boahen, Peter Heisig, Justin Im, Anna Jaeger, Vera von Kalckreuth, Gi Deok Pak, Ursula Panzner, Se Eun Park, Alexander Reinhardt, Nimako Sarpong, Heidi Schütt-Gerowitt, Thomas F. Wierzba, Florian Marks, Jürgen May

Biomimetic PEG-catecholates for stabile antifouling coatings on metal surfaces: Applications on TiO₂ and stainless steel.

Colloids Surf B Biointerfaces. 2014 May 1;117:185-92.

Faiza Khalil, Elisa Franzmann, Julian Ramcke, Olga Dakischew, Katrin S. Lips, Alexander Reinhardt, Peter Heisig, Wolfgang Maison

The C-module-binding factor supports amplification of TRE5-A retrotransposons in the *Dictyostelium discoideum* genome.

Eukaryot Cell. 2011 Jan;10(1):81-6.

Annika Bilzer, Heike Dölz, Alexander Reinhardt, Anika Schmith, Oliver Siol, Thomas Winckler

VIII.6 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Heisig dafür, dass ich diese Dissertation in seinem Arbeitskreis anfertigen konnte sowie für die Bereitstellung des Forschungsthemas, welches mich über die Jahre hinweg beschäftigt hat. Außerdem danke ich ihm für die Möglichkeit internationale Kongresse zu besuchen und viel mehr noch für die konstruktiven Diskussionen, die fachliche Betreuung und freundliche Unterstützung, die ich vielfach erfahren habe.

Weiter danke ich Herrn Prof. Dr. Bernward Bisping für die Übernahme des Zweitgutachtens. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Andrew Torda und Frau Dr. Paschke-Kratzin, die mir die Übernahme der Prüfung bei meiner Disputation zugesagt haben.

Der Niemann Stiftung danke ich für das Reisestipendium, welches ich für meine Posterpräsentation auf dem 24. ECCMID im Mai 2014 in Barcelona, Spanien erhalten habe.

Bei Dr. Daniel Hasenpusch bedanke ich mich für die fachliche Unterstützung bei der Modellberechnung und -analyse. Danken möchte ich auch Britta Anhorn für viel Korrekturlesen, viel „Punkt Komma Strich“ und viel Verständnis.

Ein großer Dank gilt den Mitgliedern des Arbeitskreises Prof. Heisig für die kollegiale Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre. Frau Dr. Heisig möchte ich danken für Ihre inhaltliche und methodische Unterstützung. Bei Antje Schnasse, Gudrun Melles und Tatjana Claussen bedanke ich mich für ihre vielfache technische Unterstützung im Labor und bei den Praktika. Meinen Doktorandenmitstreitern Janina Wenk, Philipp Hebel, Phyllis Zimmermann und ganz besonders meinen Laborpartnern Katja Carstens und Hans-Peter Sfeir danke ich für den Zusammenhalt, den besonderen Teamgeist, die gegenseitige Unterstützung und einfach für die Zeit, die wir miteinander verbracht haben.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders. Sie stehen immer hinter mir, unterstützen mich in jeglicher Hinsicht und sind die Grundfeste meines Schaffens und dieser Arbeit.

Meinen größten Dank spreche ich meiner Frau Nicola Anhorn aus. Sie hat mir in all den Jahren immer wieder den Rücken freigehalten, mich angetrieben, ist mit mir durch alle Höhen und Tiefen gegangen und hat mir mit Ihrer Kraft und Liebe diese Promotion überhaupt erst möglich gemacht. Danke Nicola.

An letzter Stelle danke ich den zahllosen Bakterien, die zum Zwecke der menschlichen Wissensmehrung in den Thermoblocks, Lysereagenzien und Autoklaven des Forschungslabors ihr Leben hingaben. Ich werde Euch und Euren Geruch nie vergessen!

VIII.7 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, 6. März 2017

.....
Alexander Anhorn