

Die Rolle der Expression und Regulation  
der AcrAB/- und AcrEF/TolC-Effluxpumpe  
bei der Entwicklung der  
Fluorchinolonresistenz in *Escherichia coli*

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Nina Matthiessen**  
aus Hamburg

**-Hamburg 2007-**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2003 bis September 2006 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Peter Heisig in der Abteilung für Pharmazeutische Biologie & Mikrobiologie am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Chris Meier  
(Universität Hamburg, Fachbereich Chemie)

- 1. Gutachter: Prof. Dr. P. Heisig**  
(Universität Hamburg, Abteilung für Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie)
- 2. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Duchstein**  
(Universität Hamburg, Abteilung für Pharmazeutische Chemie)

Disputationstermin: 08.06.2007

Meinen Eltern, meinen Freunden  
und vor allem Oma Gerda!

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1	Antibiotika: Problematik der Resistenzentwicklung	12
1.2	Bakterielle Resistenzmechanismen	13
1.3	Effluxpumpen	13
1.4	Resistenz von <i>E. coli</i> gegenüber Fluorchinolonen	16
1.5	Die AcrAB/TolC-Effluxpumpe in <i>E. coli</i>	19
1.5.1	Struktur, Transportmechanismus und Substratbindung	19
1.5.2	Regulation durch den lokalen Repressor AcrR	27
1.5.3	Regulation über globale Regulatorsysteme	28
1.5.3.1	Das <i>mar</i> -Operon: MarA, MarR	28
1.5.3.2	SoxRS	33
1.5.3.3	Rob	35
1.5.3.4	Weitere Funktionen und Regulatoren	36
1.6	Die AcrEF/TolC-Effluxpumpe in <i>E. coli</i>	37
1.6.1	Struktur, Substratspektrum und Funktion	37
1.6.2	Regulation	38
1.7	Zielsetzung der Arbeit	39
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>41</b>
2.1	Material	41
2.1.1	Geräte	41
2.1.2	Chemikalien	42
2.1.3	Nährmedien	45
2.1.4	Antibiotika und Chemotherapeutika	46
2.1.5	Kits und Systeme	47
2.1.6	Enzyme	48
2.1.7	Oligonukleotide	49
2.1.8	Vektoren	50
2.1.9	Bakterienstämme	51
2.2	Mikrobiologische Methoden	53
2.2.1	Anlegen von Dauerkulturen	53
2.2.1.1	Glycerinkulturen	53
2.2.1.2	Stichkulturen	53
2.2.2	KBE-Bestimmung	54

2.2.3	MHK-Bestimmung . . . . .	54
2.3	Molekularbiologische Methoden: DNA . . . . .	55
2.3.1	Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden . . . . .	55
2.3.2	Gewinnung bakterieller genomischer DNA: Kochmethode . . . . .	56
2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	56
2.3.4	SOEing-PCR (splicing by overlap extension-PCR) . . . . .	61
2.3.5	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese . . . . .	63
2.3.6	Aufreinigung und Konzentrierung von DNA . . . . .	64
2.3.6.1	Isolierung von DNA aus Reaktionsansätzen . . . . .	64
2.3.6.2	Extraktion von DNA aus Agarosegelen . . . . .	65
2.3.6.3	Aufreinigung und Konzentrierung von DNA durch Ethanol-Präzipitation . . . . .	66
2.3.7	Konzentrationsbestimmung von DNA . . . . .	66
2.3.8	Enzymatische Modifikationen . . . . .	66
2.3.8.1	Restriktionsverdau . . . . .	67
2.3.8.2	Dephosphorylierung . . . . .	67
2.3.8.3	Generierung von <i>blunt ends</i> . . . . .	68
2.3.8.4	Ligation . . . . .	68
2.3.9	Gewinnung von Plasmid-DNA . . . . .	69
2.3.9.1	Plasmid-Mini-Präparation . . . . .	69
2.3.9.2	Plasmid-Midi-Präparation . . . . .	70
2.3.10	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation . . . . .	71
2.3.10.1	CaCl <sub>2</sub> -Methode . . . . .	71
2.3.10.2	Transformation nach Hanahan . . . . .	72
2.3.10.3	Herstellung kompetenter Zellen mittels CaCl <sub>2</sub> -Methode zur Lagerung . . . . .	73
2.3.10.4	Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation . . . . .	73
2.3.10.5	Elektroporation . . . . .	73
2.3.11	Konjugation . . . . .	74
2.3.12	DNA-Sequenzierung . . . . .	75
2.3.13	Bestimmung der Luciferase-Aktivität . . . . .	76
2.3.14	Berechnung des RLU/OD Quotienten . . . . .	77
2.3.15	Die statistische Auswertung der spezifischen Luciferase-Aktivitäten . . . . .	78
2.3.16	Berechnung des RLU/KBE Quotienten . . . . .	78
2.3.17	Komplementations-Assay: MarR . . . . .	79
2.3.18	Komplementations-Assay: MarA . . . . .	79
2.4	Molekularbiologische Methoden: Proteine . . . . .	80
2.4.1	Proteinisolierung . . . . .	80
2.4.2	Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration . . . . .	81
2.4.3	Berechnung des RLU/Proteinmenge Quotienten . . . . .	81
2.5	Methoden der Bioinformatik . . . . .	81
2.5.1	Multiples Alignment mit ClustalW . . . . .	81

2.5.2	Energieminimierungen von 3D-Strukturmodellen . . . . .	82
-------	--	----

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>85</b>
----------	-------------------	-----------

3.1	Klonierung des Reportergensystems pPHB331 . . . . .	85
3.2	Charakterisierung von pPHB331 . . . . .	86
3.3	Umklonierung des Reportergensystems pPHB331 zu pPHB335 . . . . .	87
3.4	Charakterisierung von pPHB335 . . . . .	88
3.5	Klonierung des Reportergensystems pPHB333 . . . . .	89
3.6	Charakterisierung von pPHB333 . . . . .	89
3.7	Klonierung des MarA-Überexpressionsplasmids pPHB338 . . . . .	91
3.8	Charakterisierung von pPHB338 . . . . .	91
3.9	Umklonierung des MarA-Überexpressionsplasmids pPHB338 zu pPHB1838 . . . . .	92
3.10	Charakterisierung von pPHB1838 . . . . .	93
3.11	Entwicklung der optimalen Messbedingungen für die Reportergensysteme . . . . .	94
3.11.1	Null-Kontrolle . . . . .	94
3.11.2	LAR- und Probenvolumen . . . . .	94
3.11.3	Zeitpunkt der Probenziehung . . . . .	95
3.11.4	Ermittlung der spezifischen Luciferase-Aktivität . . . . .	96
3.11.5	Selektionsdruck . . . . .	97
3.11.6	Funktionalität der Reporterplasmide . . . . .	98
3.11.7	Funktionalität des Reporterplasmids pPHB331 in <i>Salmonella</i> Hadar . . . . .	102
3.12	Messungen der Promotoraktivität von <i>pacrAB</i> . . . . .	103
3.12.1	Einfluss von <i>gyrA</i> -Mutationen auf die Expression von <i>acrAB</i> in <i>E. coli</i> . . . . .	103
3.12.2	Einfluss von Fluorchinolonen auf die Expression von <i>acrAB</i> in <i>E. coli</i> . . . . .	105
3.12.3	Einfluss des Superspiralisierungsgrads auf die Expression von <i>acrAB</i> in <i>E. coli</i> . . . . .	108
3.12.4	Messungen der Expression von <i>acrAB</i> in <i>E. coli-acrAB</i> - bzw. <i>acrEF</i> -Deletionsmutanten . . . . .	110
3.12.5	Induktion der Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe mit Salicylsäure in einer <i>E. coli-marR</i> -Deletionsmutante . . . . .	112
3.12.6	Messung der Expression von <i>acrAB</i> in verschiedenen <i>E. coli-mar</i> -Mutanten . . . . .	113
3.12.7	Messung der Expression von <i>acrAB</i> in <i>marR</i> -Deletions- und <i>marA</i> -Punktmutanten von <i>E. coli</i> . . . . .	116
3.12.8	Messung der Expression von <i>acrAB</i> in <i>E. coli-marA</i> -Punktmutanten in Gegenwart von pPHB1838 . . . . .	119
3.12.9	Messungen der Expression von <i>acrAB</i> in Salmonellen . . . . .	122
3.13	Messungen der Promotoraktivität von <i>pacrEF</i> . . . . .	123
3.13.1	Induktion der AcrEF/TolC-Effluxpumpe mit Salicylsäure in <i>E. coli</i> . . . . .	123
3.13.2	Messungen der Expression von <i>acrEF</i> in <i>E. coli-acrAB</i> - bzw. <i>acrEF</i> -Deletionsmutanten . . . . .	124

3.13.3	Messung der Expression von <i>acrEF</i> in verschiedenen <i>E. coli-mar</i> -Mutanten	124
3.14	MarR-Komplementation	126
3.15	MarA-Komplementation	127
3.16	Modellierung der 3D-Struktur von MarR aus verschiedenen <i>marR</i> -Punktmutanten	129
3.17	Modellierung der 3D-Struktur von MarA aus verschiedenen <i>marA</i> -Punktmutanten	139
3.18	Sequenzierung und Alignment von <i>acrR</i> aus verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen	144
3.19	Alignments von <i>pacrAB</i> und <i>pacrEF</i>	144
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>146</b>
4.1	Die Reportersysteme pPHB331, pPHB335 und pPHB333	146
4.1.1	Das Reporter(-system) im Vergleich	146
4.1.2	Entwicklung der Reportersysteme	148
4.1.3	Die Messbedingungen und Kontrollen	150
4.1.4	Statistik: Auswahl des Testverfahrens	152
4.2	Einfluss verschiedener Topoisomerase-Mutationen und -Inhibitoren auf die Expression von <i>acrAB</i>	153
4.2.1	Haben <i>gyrA</i> -Mutationen oder GyrA-Inhibitoren einen Einfluss auf die Expression?	154
4.2.2	Welchen Einfluss hat der Superspiralisierungsgrad auf die Expression?	156
4.2.3	Zusammenfassung: Einfluss verschiedener Topoisomerase-Mutationen und -Inhibitoren auf die Expression	157
4.3	Was passiert bei Deletion von <i>acrAB</i> bzw. <i>acrEF</i> ?	158
4.4	Untersuchungen zur globalen Regulation durch das <i>mar</i> -Operon	159
4.4.1	Quantifizierung der Expression von <i>acrAB</i> in unterschiedlichen <i>mar</i> -Mutanten	160
4.4.2	3D-Strukturmodelle von MarR aus verschiedenen <i>marR</i> -Punktmutanten	163
4.4.3	<i>mar</i> -abhängige und <i>mar</i> -unabhängige Induktion der Expression von <i>acrAB</i> durch Salicylsäure	166
4.4.4	Einfluss des <i>mar</i> -Operons auf die Expression von <i>acrEF</i>	167
4.4.4.1	Führen <i>marR</i> -Mutationen zur Überexpression von <i>acrEF</i> ?	167
4.4.4.2	Induktion der Expression von <i>acrEF</i> durch Salicylsäure?	168
4.5	Charakterisierung von <i>marA</i> -Punktmutanten	168
4.5.1	Einfluss der <i>marA</i> -Punktmutation auf die Expression von <i>acrAB</i>	170
4.5.2	Einfluss der <i>marR</i> -Deletion auf die Resistenz	171
4.5.3	Entwicklung der Überexpressionsvektoren pPHB338 und pPHB1838	171
4.5.4	Auswirkungen der MarA-Komplementation auf die MHK-Werte und die <i>acrAB</i> -Expression	172
4.5.5	3D-Strukturmodelle von MarA aus den <i>marA</i> -Punktmutanten	173
4.5.6	Bedeutung der <i>marA</i> -Punktmutationen für Resistenz und Fitness	176

4.6	Untersuchungen der Expression von <i>acrAB</i> im Lebendimpfstamm TAD <i>Salmonella vacT</i> . . . . .	177
4.7	Ausblick . . . . .	178
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>181</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>183</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>185</b>
<b>A</b>	<b>Datenblätter</b>	<b>207</b>
A.1	Sequenz von <i>pacrAB</i> aus dem <i>E. coli</i> -Stamm WT . . . . .	207
A.2	Sequenz von <i>pacrEF</i> aus dem <i>E. coli</i> -Stamm WT . . . . .	208
A.3	Sequenz des <i>mar</i> -Operons . . . . .	208
A.4	Sequenz von <i>acrR</i> aus dem <i>E. coli</i> -Stamm WT . . . . .	210
A.5	Agarosegel-Bilder: Restriktionsanalysen der konstruierten Plasmide . . . . .	211
A.6	Gefahrstoffliste . . . . .	217
<b>B</b>	<b>Danksagung</b>	<b>218</b>
<b>C</b>	<b>Curriculum vitae</b>	<b>219</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<i>acnA</i> .....	codiert für die Aconitase A
<i>acrAB</i> .....	codiert für die AcrAB/TolC-Effluxpumpe
<i>acrEF</i> .....	codiert für die AcrEF/TolC-Effluxpumpe
<i>acrR</i> .....	codiert für den lokalen Repressor AcrR von <i>acrAB</i>
<i>acrS</i> .....	codiert für den lokaler Repressor AcrS von <i>acrEF</i>
<i>araC-paraB</i> .....	codiert für den Regulator AraC und den Arabinosepromotor von <i>araBAD</i>
<i>aslB</i> .....	codiert für einen putativen Regulator des Arylsulfatase-Gens <i>aslA</i>
<i>fldA/B</i> .....	codiert für Flavodoxin I/II
<i>fpr</i> .....	codiert für die NADPH-Ferredoxin Oxidoreduktase
<i>fumC</i> .....	codiert für die Fumerase
<i>fur</i> .....	codiert für das <i>ferric uptake regulation protein</i>
<i>galT</i> .....	codiert für die Galaktose-1-phosphat-uridylyl-transferase
<i>gyrA</i> .....	codiert für die A-Untereinheit der Gyrase
<i>gyrB</i> .....	codiert für die B-Untereinheit der Gyrase
<i>inaA</i> .....	codiert für das <i>weak acid inducible protein</i>
<i>luc</i> .....	codiert für die Luciferase
<i>marA</i> .....	codiert für den globalen Aktivator MarA
<i>marO</i> .....	Operatorregion des <i>mar</i> -Operons
<i>marR</i> .....	codiert für den Repressor des <i>mar</i> -Operons MarR
<i>mar/Mar</i> .....	<i>multiple antibiotic resistance</i>
<i>mdlA</i> .....	codiert für ein <i>multiple-drug-resistance-like ATP-binding component of a transport system</i>
<i>micF</i> .....	codiert für die <i>anti-sense</i> -RNA <i>micF</i> zur Regulation von OmpF
<i>nfo</i> .....	codiert für die Endonuklease IV
<i>nfsA</i> .....	codiert für die Sauerstoff-unempfindliche Nitroreduktase
<i>pacrAB</i> .....	Promotor der AcrAB/TolC-Effluxpumpe
<i>pacrEF</i> .....	Promotor der AcrEF/TolC-Effluxpumpe
<i>parC</i> .....	codiert für eine Untereinheit der Topoisomerase IV
<i>parE</i> .....	codiert für eine Untereinheit der Topoisomerase IV
<i>ribA</i> .....	codiert für die GTP Cyclohydrolase II
<i>rimK</i> .....	codiert für das <i>ribosomal protein modification enzyme</i>
<i>sodA</i> .....	codiert für die Mangan-enthaltende Superoxid-Dismutase
<i>soxR</i> .....	codiert für den positiven Regulator SoxR

<i>soxS</i>	codiert für den globalen Aktivator SoxS
<i>tolC</i>	codiert für das Protein/Porin der äußeren Membran TolC
<i>ybaO</i>	Gen mit unbekannter Funktion
<i>ybiS</i>	Gen mit unbekannter Funktion
<i>yfhD</i>	codiert für ein Protein, dass vermutlich in den periplasmatischen Transport involviert ist
<i>zwf</i>	codiert für die Glukose-6-phosphat-dehydrogenase
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
AMI	Amikacin
AMP	Ampicillin
ARA	L-Arabinose
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CCLR	Cell Culture Lysis Reagent
CDTA	1,2-Cyclohexandiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
CIP	Ciprofloxacin
CLM	Chloramphenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ddNTP	Di-Desoxy-Nukleinsäure-Triphosphat
dH <sub>2</sub> O	demineralisiertes Wasser
dNTP	Desoxy-Nukleinsäure-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL-EBI	European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatic Institute
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GK	Glycerinkulturnummer
GLC	D-Glukose
h	Stunde
hGH	<i>human growth hormone</i>
HTH	<i>helix-turn-helix</i>
IS-Element	Insertionselement
KAN	Kanamycin
kb	Kilobase(n)
KBE	Kolonie bildende Einheit
LB	Luria Botani
MATE	<i>multidrug and toxic compound extrusion</i>
mdr	<i>multi drug resistance</i>
MDS	Molekül-Dynamik-Simulation

MFP .....	Membranfusionsprotein
MFS .....	<i>major facilitator superfamily</i>
MHK .....	Minimale Hemmkonzentration
min .....	Minuten
ND .....	<i>non determined</i>
NEB .....	New England Biolabs
NI/II .....	Standard I/II Nähragar bzw. -bouillon
NOV .....	Novobiocin
OD .....	Optische Dichte
OFL .....	Ofloxacin
OMP .....	<i>outer membran protein</i>
ORF .....	<i>open reading frame</i>
PCR .....	Polymerase Kettenreaktion
QRDR .....	quinolone resistance determining region
r/r' .....	Resistenz
RMSD .....	<i>root-mean-square deviation</i>
RND .....	<i>resistance/nodulation/cell division</i>
Rob .....	<i>right oriC binding</i>
rpm .....	Umdrehungen pro Minute
RT .....	Raumtemperatur
RT-PCR .....	<i>real time</i> -Polymerase Kettenreaktion
SAL .....	Salicylsäure
SDS .....	Natriumdodecylsulfat
SEAP .....	Sekretierte Alkalische Phosphatase
SMR .....	<i>small multidrug resistance</i>
Tab. ....	Tabelle
TAE .....	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TC .....	Tetracyclin
TMS .....	<i>transmembrane segments</i>
U .....	Unit
WHO .....	Weltgesundheitsorganisation
ÜNK .....	Übernachtkultur

# 1 Einleitung

## 1.1 Antibiotika: Problematik der Resistenzentwicklung

Die Statistiken der WHO (2006) zeigen deutlich, dass Infektionskrankheiten weltweit immer noch die häufigste Todesursache darstellen.

Dabei ist in den letzten Jahrzehnten eine weltweit zunehmende Verbreitung von Resistenzen bei bakteriellen Infektionserregern gegenüber den eingesetzten Antibiotika zu beobachten. Zu den Faktoren, die die Ausbildung von Resistenzen fördern, zählt vor allem die übermäßige und häufig unterdosierte oder vorzeitig abgebrochene Gabe von Antibiotika, sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin.

In Europa und in Deutschland tragen multizentrische Untersuchungen dazu bei, Informationen über die Resistenzausbreitung zu vermitteln. Denn die Kenntnis der Resistenzsituation ist die Voraussetzung für die Erarbeitung von zentralen Empfehlungen für gezielte Präventionsmaßnahmen und eine effektive, rationale Therapie.

Die Entwicklung neuartiger Antibiotika geht indes nur zögerlich voran. Mit dem Penicillin G kam 1944 das erste Antibiotikum auf den Markt. Bis zur Entwicklung der ersten rein synthetisch hergestellten Gruppe, den 4-Chinolonen, 1962 wurden die meisten Antibiotika-Klassen (Aminoglykoside, Chloramphenicol, Tetracycline, Makrolide, Glykopeptide, Streptogramin) eingeführt. Seitdem gab es Weiterentwicklungen nur hinsichtlich der Verbesserung von Eigenschaften, wie z.B. Pharmakokinetik und -dynamik, mittels chemischer Modifikationen der schon vorhandenen Leitstrukturen. Im Jahr 2000 folgten erst die Oxazolidinone mit ihrem erstem Vertreter dem Linezolid [85]. Die bisher letzte Innovation (EU-Zulassung: 2006) stellt inzwischen das Lipopeptid Daptomycin dar [72].

Für die Zukunft ist es daher von großer Bedeutung, weitere Antibiotika mit neuem Wirkmechanismus zu entwickeln, um überhaupt noch gegen multiresistente Erreger vorgehen zu können.

Einen wichtigen Beitrag zum Umgang mit und der Entwicklung von Antibiotika liefert die Erforschung und das Verständnis von bakteriellen Resistenzmechanismen.

Die Untersuchung der Ursachen und Entstehungsmechanismen von Resistenzen, sowie der Regulation von Resistenz-vermittelnden Genen sind von großem Nutzen. Daraus resultierende Erkenntnisse können zur Entwicklung möglicher Präventions- oder Inhibitions-Maßnahmen verwendet werden. So könnte einerseits die Wirksamkeit älterer Antibiotika verbessert oder wieder hergestellt werden, andererseits könnten diese Grundlagenkenntnisse bei der Entwicklung neuer bzw. Modifikation älterer Antibiotika genutzt werden.

## 1.2 Bakterielle Resistenzmechanismen

Zunächst kann zwischen einer natürlichen oder intrinsischen (primären) Resistenz, die alle Stämme einer Spezies betrifft, und einer erworbenen (sekundären) Resistenz, die nur einzelne Stämme einer Spezies aufweisen, unterschieden werden.

Ursache für eine intrinsische Resistenz kann sein: Ein Antibiotikum wird von seinem Wirkort vermehrt wieder abtransportiert oder gelangt, aufgrund seiner Struktur, gar nicht erst an diesen (natürliche Targetunempfindlichkeit, chromosomal codierter Resistenzmechanismus). So können z.B. Glykopeptide die äußere Membran von gramnegativen Bakterien nicht durchdringen.

Bei der sekundären Resistenz handelt es sich um ein spontanes genetisches Ereignis, das chromosomal durch eine oder mehrere Mutationen gekennzeichnet sein kann. Bei einer durchschnittlichen Mutationsfrequenz von  $10^{-9}$ - $10^{-12}$ /Nukleotid ist durch die hohe Vermehrungsgeschwindigkeit von Bakterien die Wahrscheinlichkeit eine Mutante zu finden relativ groß. Eine weitere Möglichkeit sind zusätzliche chromosomal oder extrachromosomal vorhandene genetische Informationen. Letztere können in Form von Plasmiden, den sogenannten R-Faktoren, die sich durch eine Übertragung auch auf nicht verwandte Bakterien (horizontaler Gentransfer) mittels parasexueller Prozesse wie Transformation, Transduktion und Konjugation auszeichnen, vorliegen [179]. Da Bakterienzellen haploid sind, prägt sich eine Resistenzmutation oder ein zusätzliches extra-/chromosomales Gen phänotypisch meist direkt aus.

Die grundlegenden Mechanismen, mit denen sich Mikroorganismen gegen toxische Substanzen wehren und so primäre bzw. sekundäre Resistenzen ausbilden können, sind [73]:

1. Veränderung der Zielstruktur durch Mutationen (z.B. bei Fluorchinolonen: *gyrA*-Mutationen) oder chemische Modifikationen (z.B. *erm*-Gen: *erythromycin ribosome methylase gene*)
2. Chemische Modifizierungen des Antibiotikums durch Enzyme, die zur Inaktivierung führen (z.B. Penicilline durch  $\beta$ -Lactamasen, Aminoglykoside durch Acetyltransferasen)
3. Reduzierte Akkumulation des Antibiotikums am Zielort durch verminderten Influx und/oder verstärkten Efflux (z.B. OmpF-Reduktion (Porin) bei Fluorchinolonen, Tetracyclin-Effluxpumpen)

## 1.3 Effluxpumpen

Gerade der Mechanismus Efflux hat inzwischen allgemein aus folgenden Gründen an Bedeutung gewonnen:

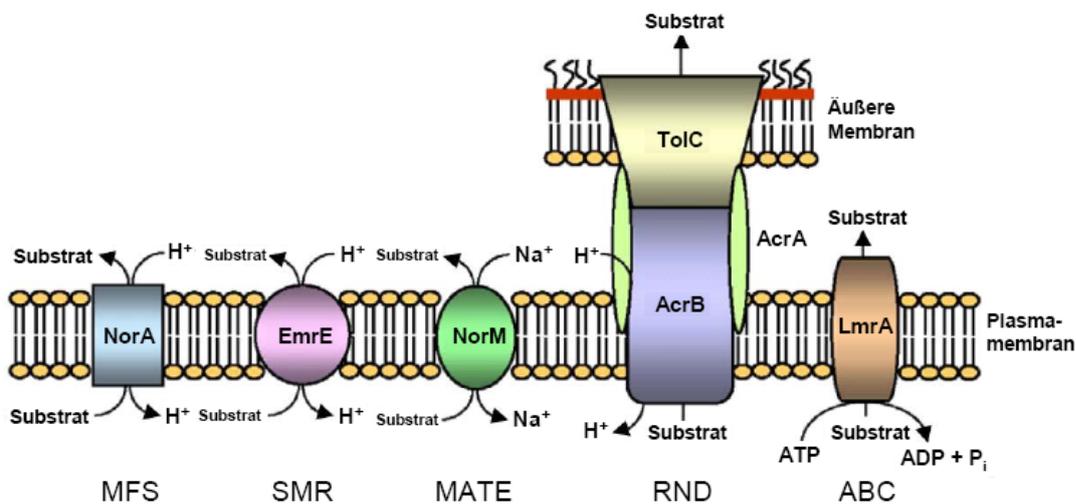
1. Es ist ein weitverbreiteter Mechanismus, der sowohl in grampositiven als auch gramne-

gativen Bakterien nachgewiesen werden konnte.

2. Er führt meistens zur Resistenz (**multi drug resistance**) gegenüber vielen, chemisch nicht verwandten Substanzen.
3. In einigen Fällen scheint dieser Mechanismus den Bakterien eine vorübergehende Toleranz zu vermitteln, mit der Möglichkeit zum Erwerb weiterer Resistenzmutationen.

Effluxpumpen können einerseits chromosomal codiert sein und zu einer intrinsischen Resistenz, bei Überexpression zu einer hohen sekundären Resistenz beitragen [167]. Andererseits besteht auch die Möglichkeit der Lokalisation auf Plasmiden, was vor allem für die sekundäre Resistenz bei Tetracyclinen bekannt ist [192].

Die Unterscheidung der zwei wesentlichen Gruppen von Effluxpumpen erfolgt nach der für die Aktivität verwendeten Energiequelle. Die eine große Gruppe ist die ABC-Familie (**ATP binding cassette**), welche ATP als Energiequelle verwendet. Die andere große Gruppe bezieht ihre Energie aus einem Protonengradienten und gliedert sich in vier Familien, die MFS- (**major facilitator superfamily**), SMR- (**small multidrug resistance**), RND- (**resistance/nodulation/cell division**) und MATE-Pumpen (**multidrug and toxic compound extrusion**) [173]. Beispiele sind in Abbildung 1.1 dargestellt.



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung: Beispiele für die bekannten fünf Effluxpumpenfamilien [105]

Für gewöhnlich bestehen Effluxpumpen aus Proteinmonomeren, mit verschiedenen vielen transmembranären Segmenten (überwiegend 12 TMS) [173]. Da in gramnegativen Bakterien zusätzlich noch eine äußere Membran auftritt, können Effluxpumpen als Multikomponenten-

Systeme organisiert sein. Dabei liegt die eigentliche Effluxpumpe innerhalb der Zytoplasmamembran und assoziiert mit einem Membranfusionsprotein (MFP) sowie einem Protein der äußeren Membran (OMP) [153].

Als natürliche Funktion von Effluxpumpen wird zum Einen der Selbstschutz gegenüber im natürlichen Habitat vorkommenden toxischen Komponenten wie z.B. Gallensalzen oder anderen Bioziden diskutiert [213, 169]. Des Weiteren sind die Pumpen für die Entfernung von toxischen Stoffwechselprodukten und das Ausschleusen von bakteriellen Toxinen bzw. Virulenzfaktoren [204, 9] zuständig. Zudem scheinen sie eine Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation zu spielen [236]. Auch existieren in den Antibiotika-Produzenten wie *Streptomyces*-Arten selbst entsprechende Effluxpumpen, die in der Lage sind das Antibiotikum aus der Zelle zu befördern [38].

Dass nun die therapeutisch eingesetzten Substanzen ebenfalls als Substrate erkannt werden, liegt an, für die effektive Erkennung nötigen, Basis-Strukturelementen. Hierbei handelt es sich oftmals um einen grundsätzlich amphiphilen Charakter sowie eine ionisierbare Gruppe. Durch solch allgemeine Strukturen kommt es meist zu einem breiten Substratspektrum einer Pumpe, was leicht Kreuzresistenzen verursachen kann. Da von einer Bakterienzelle verschiedene Transportproteine gebildet werden können, welche unterschiedliche Substratspektren aufweisen, kann es außerdem schnell zu einem multiresistenten Phänotyp kommen. Zudem kann eine antimikrobielle Substanz von mehreren Effluxpumpen erkannt werden, was die Resistenz noch weiter ausprägt. Auch führen Mutationen in Regulatorgenen leicht zur Überexpression von Effluxpumpen [19, 65]. Für die in dieser Arbeit untersuchte Effluxpumpe AcrAB/TolC sind detaillierte Angaben zum Substratspektrum, der Substratbindung und häufig auftretenden Mutationen in Regulatorgenen in Abschnitt 1.5 beschrieben.

Besonders hervorzuheben ist die Möglichkeit, die schon in der obigen Aufzählung an dritter Stelle genannt wurde, dass durch eine konstitutive Expression von Effluxpumpen die Mutationsfrequenz erniedrigt sein kann. So konnte z.B. für *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt werden, dass nach Deletion von drei RND-Pumpen die Mutationsfrequenz für *target*-Mutationen bei Fluorchinololonresistenz von  $2 \times 10^{-7}$  auf  $< 10^{-11}$  reduziert ist [121].

Zur Inhibition von Effluxpumpen konnten inzwischen unterschiedliche Substanzen gefunden werden, zu denen Phenylalanyl-arginyl- $\beta$ -naphthylamid (PA $\beta$ N), Globomycin, Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP), verschiedene Chinoline und Arylpiperazine gehören. Der Nutzen solcher Substanzen besteht einerseits darin, die klinische Relevanz von Efflux-assoziierten Resistenzen aufzuzeigen. Andererseits soll mit Hilfe der Inhibitoren durch einen möglichen Einsatz in Kombination mit Antibiotika, die Wirkungen dieser wieder verstärkt bzw. hergestellt werden. Die Problematik für den geplanten Einsatz sind die Nebenwirkungen, hervorgerufen durch Interaktion mit eukaryotischen Pumpen oder andere pharmakologische Effekte, sowie die generelle Toxizität einiger Substanzen in den eingesetzten Konzentrationen [161, 197, 128, 27].

### 1.4 Resistenz von *E. coli* gegenüber Fluorchinolonen

*Escherichia coli* (*E. coli*) gehört zur Gattung der Enterobacteriaceae und kommt in der normalen Darmflora von Mensch und Tier vor. *E. coli* ist meist fakultativ pathogen, d.h. außerhalb des Darmes kann es bei entsprechend disponierten Menschen zu Eiterungen, Entzündungen (z.B. Peritonitis, Neugeborenen-Meningitis) sowie Harnwegsinfektionen führen. Einige *E. coli*-Stämme können aber auch obligat pathogen sein durch Produktion unterschiedlicher Pathogenitätsfaktoren wie z.B. Toxinen, und werden meist durch Lebensmittel übertragen (z.B. enterohämorrhagische Colitis, Diarrhoe). Cotrimoxazol, Fluorchinolone, Aminopenicilline und - meist besser wirksam - Cephalosporine sind die Mittel der Wahl [141].

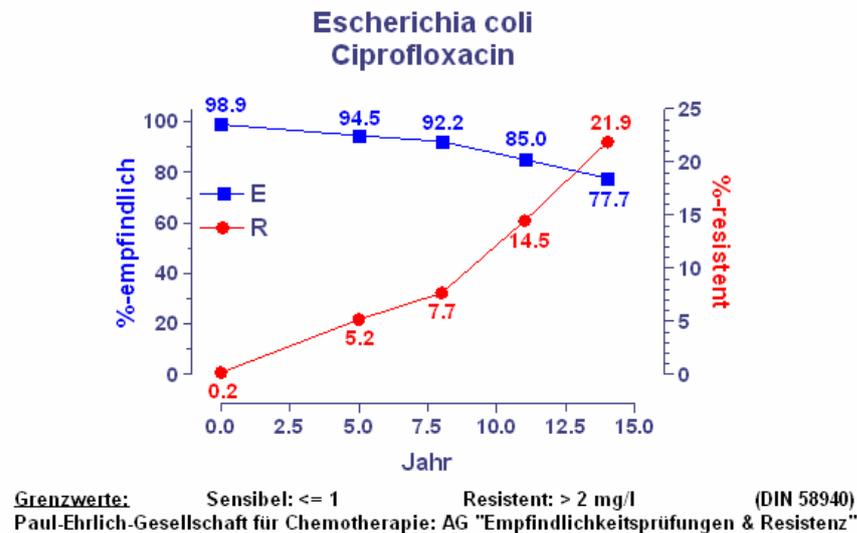
Fluorchinolone sind die am häufigsten bei akuten, unkomplizierten Harnwegsinfektionen eingesetzten Substanzen in West-Europa und Nord-Amerika [149]. Durch die überwiegend unveränderte renale Elimination ist gewährleistet, dass hohe Konzentrationen in den Harnwegen erreicht werden können. Eingesetzt werden vor allem Ciprofloxacin und Norfloxacin, die in mehr als 90 % der Fälle zur Eradikation führen.

Die Wirkung von Fluorchinolonen (GyrA-Inhibitoren) beruht auf einer spezifischen Bindung an den Gyrase-DNA-Komplex, wodurch es zur Bildung eines ternären Komplexes (Fluorchinolone-Gyrase-DNA) kommt. Dieser Komplex ist relativ stabil und verhindert weitere Reaktionen an der Nukleinsäure wie z.B. Replikation und Transkription. Die "Reaktion" der Zelle besteht in der Induktion von Reparaturmechanismen, wie der sogenannten *SOS-Antwort*, welche schließlich für den Zelltod verantwortlich ist [231].

Gerade die Resistenz bei Enterobacteriaceae gegenüber Fluorchinolonen, als vollständig synthetisch hergestellte Chemotherapeutika, war zunächst sehr selten [123]. Als ein Grund dafür galt die hohe MHK-Differenz zwischen Wildtyp-Niveau und klinischer Resistenz (etwa 200-fach), sowie die Tatsache, dass bis zum Erreichen dieser Resistenz mehrere Mutationen notwendig sind [83]. Viele Studien zeigen jedoch inzwischen eine Resistenzsteigerung gegenüber Fluorchinolonen von Jahr zu Jahr [60, 118]. Bei Betrachtung der Resistenzentwicklung von *E. coli* für Ciprofloxacin in den Jahren 1989 - 2004 (Abb. 1.2) wird die Zunahme der Resistenz deutlich [104]. Ähnliche Tendenzen wurden auch für andere Erreger gefunden.

Die bislang bekannten Resistenzmechanismen bei *E. coli* sollen im Folgenden beschrieben werden [188].

Zielstrukturen von Fluorchinolonen sind die Typ II-Topoisomerasen Gyrase und Topoisomerase IV. DNA Topoisomerasen sind Enzyme, welche die DNA Superspiralisierung in den Bakterienzellen kontrollieren, was von essentieller Bedeutung für die Replikation, Rekombination, Reparatur und Transkription ist. Die Gyrase ist ein Heterotetramer bestehend aus zwei Homodimeren (A- und B-Untereinheiten), die durch die in *E. coli* nicht benachbarten Gene *gyrA* und *gyrB* codiert werden. Sie katalysiert eine stärkere Unterwindung (negative Superspiralisierung) der beiden umeinander gewundenen DNA-Stränge [224, 178]. Die Topoisomerase IV ist ebenfalls ein Heterotetramer und aus zwei zu GyrA und GyrB homologen Homodimeren aufgebaut, welche durch die Gene *parC* und *parE* codiert werden. Die Hauptaufgabe der



**Abbildung 1.2:** Zeitliche Entwicklung der Resistenz gegenüber Ciprofloxacin bei *E. coli* (1989 - 2004), Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2004 [104]

Topoisomerase IV besteht in der Trennung der durch die Replikation entstandenen Catenane aus Tochterchromosomen [165, 166].

Bei der Entwicklung der Fluorchinolonresistenz in *E. coli* treten zunächst Mutationen in der primären Zielstruktur Gyrase auf, genauer im *gyrA*-Gen innerhalb der sogenannten QRDR (*quinolone resistance-determining region*, Position Ala-67 bis Gln-106). Hierbei kann ein vermehrtes Auftreten an Position Ser-83, auch in Kombination mit Asp-87 beobachtet werden [187, 220, 75]. Des Weiteren wurden in einigen Isolaten zusätzlich zu den *gyrA*-Mutationen, welche in *gyrB* (überwiegend Asp-426, Lys-447) [237, 234], *parC* (homolog zu den *gyrA*-Mutationen überwiegend: Ser-80, Glu-84) [74] und *parE* (Leu-445) [119] jeweils innerhalb einer zur QRDR in *gyrA* homologen Region gefunden.

Viele gegen Fluorchinolone hoch resistente (*high level*) Stämme zeigen außerdem einen sogenannten MAR-Phänotyp (*multiple antibiotic resistance*) und eine erhöhte Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln. Bei diesen Stämmen konnten *non target*-Mutationen, d.h. Mutationen, die nicht innerhalb der Zielstruktur liegen und zu klinisch relevanter Resistenz führen, identifiziert werden. Dabei handelt es sich vor allem um Mutationen innerhalb des *mar*- oder *sox*-Operons (Abschnitte 1.5.3.1 und 1.5.3.2). Vorrangig sind hier der Operatorbereich *marO* und der Repressor MarR des *mar*-Operons betroffen. Hierdurch kommt es über eine erhöhte *marA*-Expression zu verstärktem Efflux (Überexpression von *acrAB*) und vermindertem Influx (verminderte Bildung von OmpF) [95, 117] (Abschnitt 1.5.3.1).

Für den Efflux von Chinolonen ist in *E. coli* in erster Linie die AcrAB/TolC-Effluxpumpe verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass bei Abwesenheit dieser Effluxpumpe in Stämmen mit *mar*-Mutation keine hohe Resistenz mehr auftrat, d.h. gerade die Überexpression von *acrAB* eine hohe Resistenz verursachte [158]. Doch auch weitere Pumpen, zu deren Substraten Chinolone gehören, wurden beschrieben. Dazu zählen die Gene *acrEF*, *acrD*, *yegO*, *emrAB*, *yjiO*, *yceL*, *mdfA*, *ydhE*, *ydgFE* und *yhiUV*, wobei diese Erkenntnisse, mit Ausnahme von *emrAB* und *yhiUV*, aus einer Studie mit Überexpressionsplasmiden stammen [155]. Untersuchungen mit Mutanten bei denen die entsprechenden Pumpen-Gene deletiert wurden, konnten die Ergebnisse hinsichtlich der Chinolon-Resistenz nicht belegen, sondern zeigten lediglich die entscheidende Rolle von *acrAB* (Abschnitt 1.5) [208].

Seit 2002 ist auch die Möglichkeit der horizontalen Übertragung von Fluorchinolonresistenz bekannt [217]. Dabei sind die Genprodukte (QnrA/B), des auf Plasmiden vorkommenden *qnr*-Gens, in der Lage sowohl die DNA-Gyrase als auch die Topoisomerase IV vor dem Angriff von Chinolonen zu schützen (Protektion) [218, 219].

Die neueste Entdeckung (2006) ist ein durch Plasmide übertragbares, Ciprofloxacin und Norfloxacin modifizierendes Enzym (Aminoglykosidacetyltransferase), das durch das Gen *aac(6')-Ib-cr* codiert wird [164, 183].

Die AcrAB/TolC-Effluxpumpe ist insgesamt bei der Entwicklung einer Resistenz gegenüber Fluorchinolonen in *E. coli* aus folgenden Gründen von besonderer Bedeutung:

Von Oethinger et al. konnte gezeigt werden, dass die Funktionsfähigkeit der AcrAB/TolC-Effluxpumpe Voraussetzung für die Entstehung von *target*-Mutationen in den Genen der Gyrase ist [158]. Daher stellt sich die Frage, ob Fluorchinolone selber einen Einfluss auf diese Effluxpumpe bzw. auf deren Expression ausüben.

Weiterhin führt eine *target*-Einzelmutation (*gyrA*-Mutation in *E. coli*) nicht zu klinisch relevanter Resistenz ( $MHK \geq 4 \mu\text{g/mL}$ ), hierfür sind zusätzliche Mutationen in den Genen der Zielstrukturen erforderlich [231]. Ob oder inwiefern die Aktivität der AcrAB/TolC-Effluxpumpe in den *gyrA*-Einzelmutanten einen Einfluss auf die Entstehung entsprechender Folgemutationen hat, ist bisher noch ungeklärt. Da Mutationen in den Genen der Topoisomerase I und Gyrase, sowie Gyrase-Inhibitoren (Fluorchinolone, Novobiocin) bekanntermaßen zu einer Veränderung des globalen Superspiralisierungsgrads führen [16], ist auch die Klärung dieses Zusammenhangs mit der Expression von *acrAB* von Interesse.

Bei klinisch hoch resistenten Stämmen treten wie schon beschrieben zusätzlich *non target*-Mutationen auf. Dabei handelt es sich oftmals um Mutationen im Operatorbereich *marO* oder Repressorgen *marR* des *mar*-Operons, was zur Überexpression des globalen Aktivators MarA führt (Abschnitt 1.5.3.1). Dies bewirkt zum Einen durch eine erhöhte Expression der *anti-sense*-RNA *micF* eine Repression der Bildung des Porins OmpF und damit eine Reduktion des Influx von Fluorchinolonen. Andererseits kommt es über eine erhöhte Expression von *acrAB* zu einem verstärkten Efflux von Fluorchinolonen. Hier wird die Bedeutung der Überexpression von *acrAB* als Ursache für hohe Fluorchinolonresistenz noch einmal deutlich. Die lokale und globale Regulation von *acrAB*, sowie der Zusammenhang mit der Fluorchinolonresistenz werden in den Abschnitten 1.5.2 und 1.5.3 ausführlich beschrieben.

## 1.5 Die AcrAB/TolC-Effluxpumpe in *E. coli*

Innerhalb der kompletten Sequenz von *E. coli* konnten 37 ORFs (*open reading frames*) anhand von Sequenzähnlichkeiten ausfindig gemacht werden, die für bekannte bzw. potentielle Effluxpumpen codieren [155].

Dabei ist die Haupteffluxpumpe in *E. coli*, die verantwortlich für die hohe intrinsische Resistenz gegenüber vielen Substanzen ist und, bei Überexpression, für eine sekundäre Resistenz sorgt (Abschnitt 1.4) [137], die AcrAB/TolC-Effluxpumpe. Eine Überexpression kann zum Einen erfolgen durch Mutationen im lokalen oder in globalen Regulatorgenen (Abschnitte 1.5.2 und 1.5.3), zum Anderen wurde auch schon über eine spontane Duplikation von *acrAB* berichtet [152].

Als Substrate dieser RND-Pumpe gelten unter anderem Gallensalze, Fettsäuren, organische Lösungsmittel, Farbstoffe, Desinfektionsmittel, Detergentien, Fusidinsäure, Methotrexat, Nalidixinsäure, **Fluorchinolone** und viele lipophile Antibiotika wie  $\beta$ -Lactame, Chloramphenicol, Erythromycin, Clarithromycin, Tetracyclin, Tigecyclin, Novobiocin und andere [185, 126, 154, 159, 229, 81, 32, 82, 100, 208].

### 1.5.1 Struktur, Transportmechanismus und Substratbindung

Die AcrAB/TolC-Effluxpumpe besteht aus drei Komponenten, der eigentlichen Pumpe AcrB, die in der Zytoplasmamembran liegt, dem Membranfusionsprotein AcrA und dem in der äußeren Membran gelegenen Protein TolC (Abb.1.3).

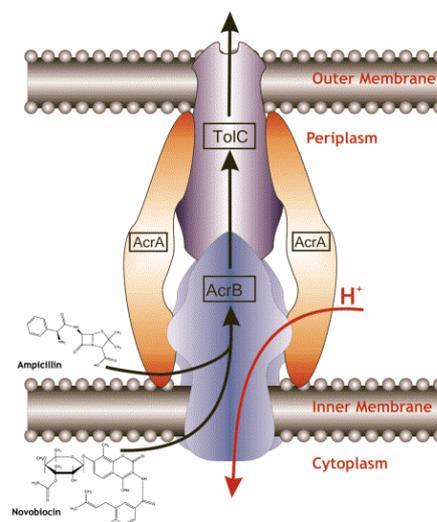
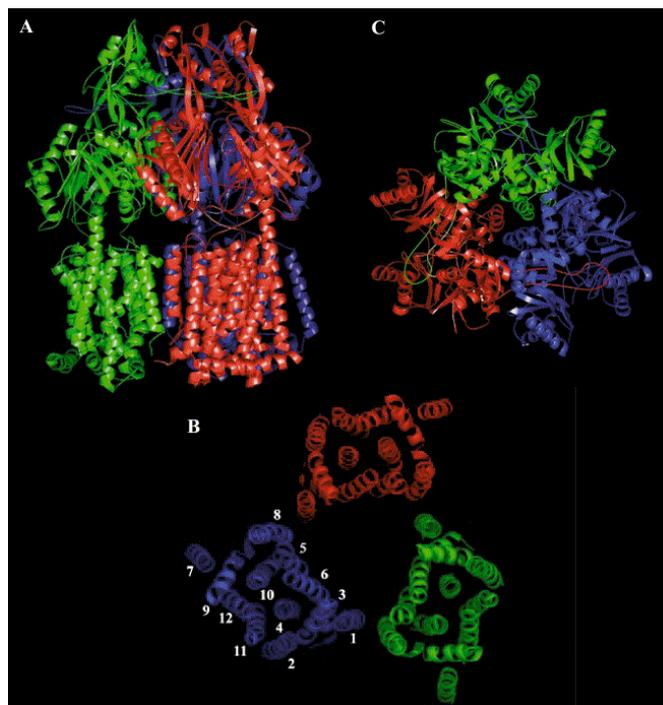


Abbildung 1.3: Schema der AcrAB/TolC-Effluxpumpe [170]

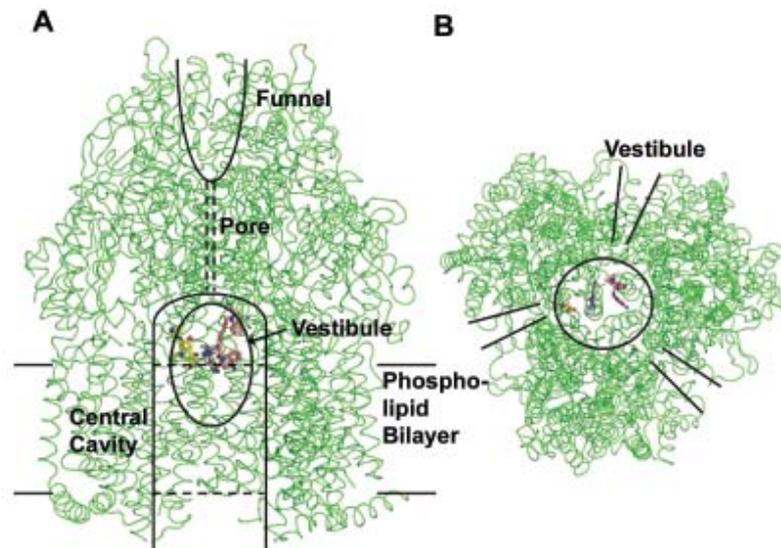
Die Gene, die für AcrB und AcrA codieren, liegen in einem Operon (*acrAB*), wohingegen das Gen für TolC (*tolC*) an anderer Stelle im Chromosom lokalisiert ist (Abb. 1.12).

**Die RND-Pumpe AcrB** (110 kDa) liegt als Trimer vor, wobei jedes Monomer aus 1049 Aminosäuren, mit 12 transmembranäre Segmenten (12 TMS,  $\alpha$ -Helices) und zwei großen periplasmatischen Loops ( $> 300$  Aminosäuren) zwischen den TMS 1 und 2 sowie 7 und 8, aufgebaut ist [148, 47] (Abb. 1.4). Diese Struktur ist typisch für RND-Pumpen.



**Abbildung 1.4:** Proteinstruktur von AcrB: A Seitenansicht, B Aufsicht und C Ausicht: 12 TMS (Helices) mit Nummerierung [170].

Die 3D-Struktur von AcrB [148] gibt verschiedene Anhaltspunkte zur Funktion der Pumpe. Durch die Anordnung der großen trimeren periplasmatischen Domäne ( $70 \text{ \AA}$ ) wird eine Art Trichter (*funnel*) gebildet, dessen oberes Ende geeignet erscheint in direkten Kontakt mit dem zylinderförmigen periplasmatischen Bereich von TolC zu treten. Über eine in der 3D-Struktur geschlossenen Pore ist der Trichter mit einer sehr großen Aushöhlung (*cavity*), mit einem Durchmesser von  $35 \text{ \AA}$  und einem Volumen von  $5.000 \text{ \AA}^3$ , verbunden (Abb. 1.5) [238]. Aufgrund der Größe und Lage, wird angenommen, dass die Aushöhlung mit Phospholipiden der Membran angefüllt ist [170].



**Abbildung 1.5:** Schema zur Struktur von AcrB: A Seitenansicht, B Aufsicht [238]

Von besonderem Interesse sind die drei Öffnungen (*vestibules*), die direkt oberhalb der periplasmatischen Seite der Zytoplasmamembran zwischen den einzelnen Monomeren liegen (Abb. 1.5) [47]. Diese Öffnungen sind ebenfalls mit der Aushöhlung (*cavity*) im Zentrum des Trimers verbunden.

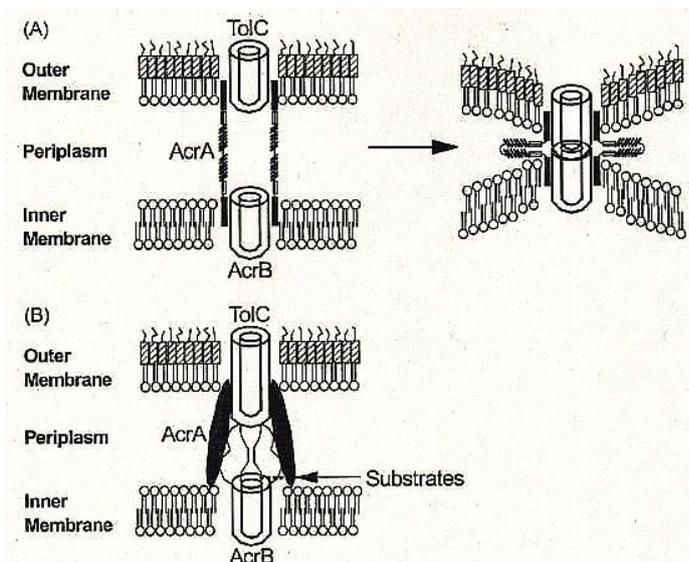
Röntgenkristallographische Untersuchungen von AcrB mit gebundenen Substraten (Ethidiumbromid, Rhodamin 6G, Dequaliniumchlorid und Ciprofloxacin) ergaben, dass immer drei Substratmoleküle gleichzeitig an der Wandung der Aushöhlung gebunden werden. Die Art und Lage der Bindung führte wieder zu der Vermutung, dass eine Bindung an die in der Aushöhlung vermutete Zytoplasmamembran notwendig ist, sowie das Zusammenspiel der drei Moleküle untereinander [239].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Substratspezifität nicht in der Aushöhlung begründet liegt, sondern durch Aminosäuren in der Wandung der seitlichen Öffnungen [238], sowie in den periplasmatischen Loops von AcrB [46, 215].

Eine Hypothese zum Mechanismus der Substratbindung für AcrB beschreibt zunächst eine Bindung der Substanzen an die periplasmatische Oberfläche der Zytoplasmamembran über Lipophilie, Ladung oder Dipolmomente. Anschließend könnte eine laterale Diffusion durch die seitlichen Öffnungen von AcrB erfolgen bis zur Bindung in der zentralen Aushöhlung, vor dem Herauspumpen der Substrate. Dieser Mechanismus erklärt den Transport von Substanzen unterschiedlicher Struktur aus dem Periplasma. Hierbei deuten die Strukturen darauf hin, dass die Substrate durch einen über drei Schritte verlaufenden Drehmechanismus unter laufender Veränderung von Bindungen heraus befördert werden [147]. Für den Transportmechanismus direkt aus dem Zytosol ist bisher lediglich bekannt, dass dieser existiert [238].

Weitere Röntgenstrukturanalysen konnten erste Hinweise auf den Protoneninflux durch einen peristaltischen Pumpmechanismus liefern. Dabei wird angenommen, dass das asymmetrische AcrB-Monomer drei verschiedene aufeinanderfolgende Konformationen während des Transports einnimmt [195]. Dies korreliert mit dem oben beschriebenen Drehmechanismus. Im Detail konnte bisher die Hypothese entwickelt werden, dass zunächst über eine Wasserstoffbrückenbindung ein Kontakt zwischen den Aminosäuren Thr978 und Asp407 hergestellt wird. Nach Protonierung der Letzteren verändert sich das Salzbrücken- und Wasserstoffbrücken-Muster im relais-artigen Protonennetzwerk, was eine Serie an Konformationsänderungen initiiert und damit das Herauspumpen von Substanzen [209]. Zu den relevanten Aminosäuren innerhalb des möglichen Netzwerks von elektrostatisch interagierenden, funktionellen Gruppen zählen inzwischen auch Asp408 (Protonierung) und Lys940 [207].

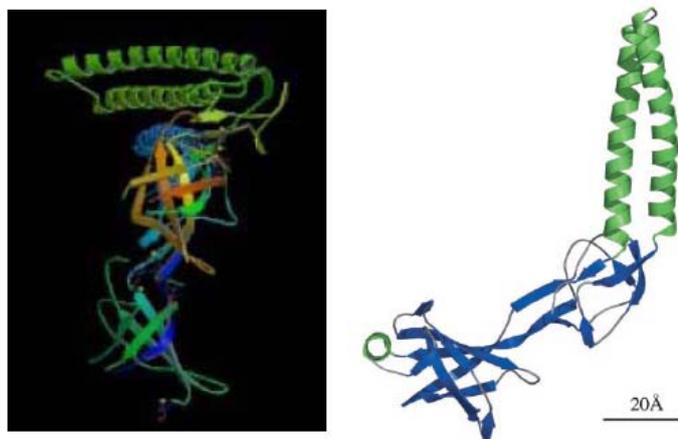
**Das Membranfusionsprotein (MFP) AcrA** (41 kDa ohne den Lipidanteil) ist ein periplasmatisches Lipoprotein, dass in Lösung als asymmetrisches Monomer vorliegt. Nach Abspaltung eines Signalpeptids (Aminosäure 1-24) am N-terminalen Teil von AcrA kommt es zur Lipidmodifikation am endständigen Cystein (Diacylglycerin mit Palmitinsäureketten). Dabei scheint die Lipidmodifikation keinen Einfluss auf die Funktion von AcrA zu haben, ist jedoch verantwortlich für die Verankerung in der Zytoplasmamembran [125, 240, 87, 93]. Aufgrund seiner gestreckten Gestalt (100-200 Å, 10-20 nm) hat man zunächst angenommen, dass AcrA den periplasmatischen Raum überbrückt und so das Zusammenspiel der Komponenten der äußeren (TolC) und inneren (AcrB) Membran koordiniert [240]. Hierzu gab es zwei unterschiedliche Theorien, die in Abbildung 1.6 dargestellt sind.



**Abbildung 1.6:** Schematische Darstellung der Hypothesen zur Funktion von AcrA [47]

AcrA scheint ein sehr flexibles Molekül zu sein, das, induziert durch eine saure pH-Wert-Änderung, oligomerisiert und dabei eine reversible Konformationsänderung vollzieht [87]. Als Oligomer, möglicherweise Trimer, bildet AcrA einen stabilen membran-assoziierten Komplex mit AcrB, in Abwesenheit von Substraten oder TolC [241, 93]. Hierbei wurde allerdings der Lipidanteil von AcrA nicht mit betrachtet. In diesem Komplex kommt der Kontakt zu AcrB über Aminosäuren am C-terminale Ende zustande. Diesen Kontakt kann AcrA mit den meisten RND-Pumpen in *E. coli*, so z.B. auch mit AcrF und YhiU, eingehen, weshalb es als "universelles" MFP angesehen wird [48].

Mittlerweile (2006) konnte die Struktur des AcrA-Monomers röntgenkristallographisch analysiert werden [140]. Hierbei ist zunächst die große Ähnlichkeit zwischen AcrA und dem homologen MexA aus *Pseudomonas aeruginosa*, dessen Struktur schon länger bekannt ist, hervorzuheben (Abb. 1.7).

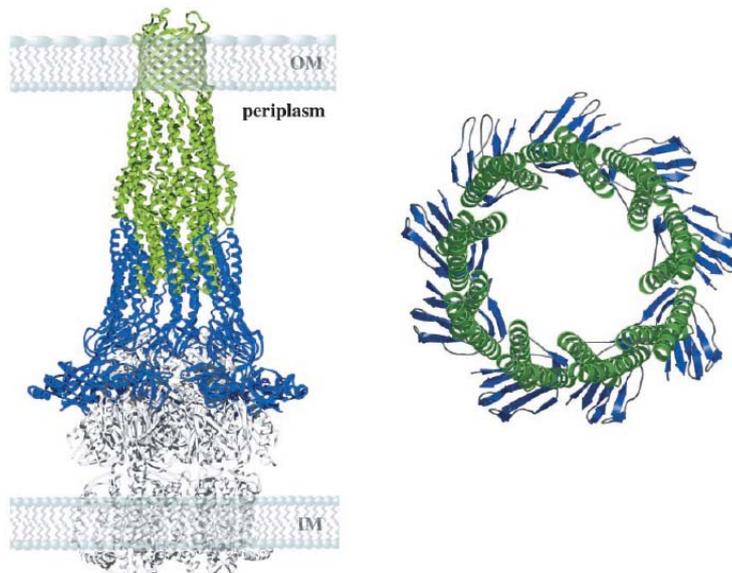


**Abbildung 1.7:** Proteinstruktur von AcrA: Links AcrA-Monomer, Rechts MexA-Monomer [140, 78].

Beide Moleküle bestehen aus drei Domänen: einem  $\beta$ -Zylinder ( $\beta$ -barrel) bestehend aus sechs antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern und einer einzelnen  $\alpha$ -Helix am Ende, einer Lipoyl-Domäne und einer  $\alpha$ -helikalen Haarnadelstruktur (*hairpin*). Letztere Domäne zeigt eine hohe Flexibilität, was als potentiell signifikant für die mechanische Kopplung zwischen einer AcrA-Konformation und der Öffnung des TolC-Tunnels verantwortlich gilt [140]. Dass eine Bindung zwischen AcrA und TolC über diese  $\alpha$ -Helices erfolgt, konnte inzwischen bestätigt werden [58, 206].

Diese Erkenntnisse und Untersuchungen an MexA führten zu einer Weiterentwicklung des Funktions-Modells von Adaptor-Molekülen (MFPs). Durch die Neigung von MexA im Kristall zu einer seitlichen Anlagerung von Monomeren über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den  $\beta$ -Faltblättern, konnte eine Zylinderstruktur aus  $\alpha$ -Helices beobachtet werden. Hierbei konnte die genaue Zahl der oligomerisierenden MexA-Moleküle nur vermutet werden [78]. Ausgehend von verschiedenen Daten wurde so ein Modell entwickelt, zu sehen in Abbildung

1.8, das die in Abbildung 1.6 vorgestellten nicht mehr unterstützen kann. Experimente hinsichtlich der Interaktion zwischen AcrA und TolC deuten inzwischen für AcrA auf ein Hexamer hin [206].



**Abbildung 1.8:** Modell zur Proteinstruktur von MexA: Links Seitenansicht MexA in die bekannten Strukturen von AcrB und TolC modelliert, Rechts postuliertes MexA-Ringmodell aus 9 Monomeren in Aufsicht [78].

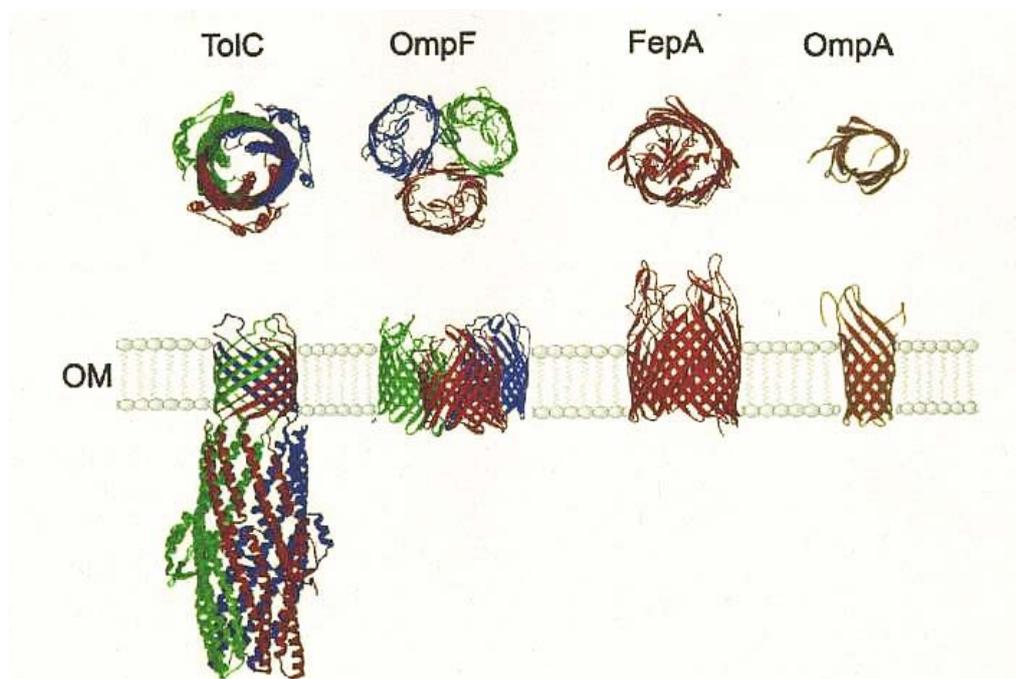
Für MexA wurde auch die Möglichkeit der direkten Substratbindung über den  $\beta$ -Zylinderbereich, der der  $\alpha$ -helikalen Haarnadelstruktur gegenüberliegt, postuliert [78]. Dies deckt sich mit früheren Experimenten zur Substratspezifität von AcrAB, die auf einen möglichen direkten Einfluss von AcrA auf das Substratspektrum hindeuten [238].

**TolC, ein Protein der äußeren Membran,** ist in der Lage mit AcrA und AcrB zu assoziieren und somit Teil der Multikomponenten-Effluxpumpe [51]. Aufgrund des pleiotropen Phänotyps von *tolC*-Deletionsmutanten, konnte TolC auch in Zusammenhang mit anderen Aktivitäten in *E. coli* gebracht werden, wie dem Import von Colicin [242] und der  $\alpha$ -Hämolyisin-Exkretion (Multikomponentensystem mit HlyB und HlyD) [221]. Des Weiteren existieren Vermutungen über einen möglichen Einfluss auf die Porinregulation [142, 145]. Diesbezüglich konnten Misra et al. beobachten, dass es in *tolC*-Mutanten zur Reduktion der Expression von *ompF* kommt. Haupteffekt der *tolC*-Mutation könnte dabei eine Beeinflussung des Porin-regulierenden Systems zugunsten der Expression von *micF* und *ompC* darstellen, was jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt werden konnte [142].

Zudem gab es Spekulationen über eine Rolle zur Beeinflussung der Segregation der Chromosomen [80] und des DNA-Superspiralisierungsgrads [44]. In letzterem Fall konnte in *E. coli*

eine Kompensation von *topA*-Mutationen und des dadurch veränderten Superspiralisierungsgrads durch eine zu *gyrA*- bzw. *gyrB*-Mutationen alternative Mutation beobachtet werden. Diese sogenannte *toc*-Mutation (*topoisomerase one compensatory*) ist in direkter Nähe von *tolC* lokalisiert und scheint *tolC* zu beeinflussen. Dabei ist sowohl der Mechanismus als auch der dadurch hervorgerufene mögliche Einfluss auf den DNA-Superspiralisierungsgrad ungeklärt [175, 44]. Weiterhin assoziiert TolC auch mit anderen RND-Pumpen, wie z.B. AcrEF (Abschnitt 1.6.1) und ist somit nicht nur Interaktionspartner von AcrAB.

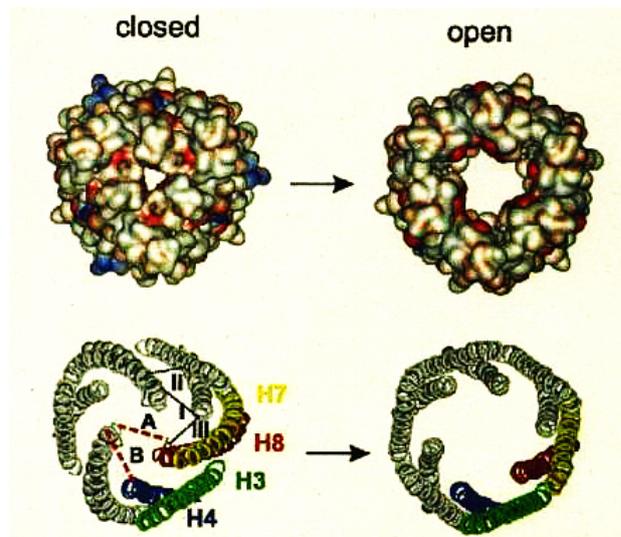
Röntgenstrukturanalysen ergaben für TolC eine trimere Struktur mit einer Länge von 140 Å. Dabei formen die drei Monomere einen transmembranären 40 Å-langen Zylinder aus 12  $\beta$ -Faltblättern, der das Protein in der äußeren Membran verankert. Dieser Kanal ist zum externen Medium hin konstitutiv geöffnet. Der 100 Å-lange periplasmatische Zylinder besteht aus insgesamt 12 linksgängigen  $\alpha$ -Helices, die antiparallel angeordnet sind. Dieser Zylinder besitzt am unteren Ende eine Pore, die durch sechs nach innen gefaltete  $\alpha$ -Helices geschlossen ist [101, 102]. Die Struktur von TolC konnte bisher bei keinem anderen Protein der äußeren Membran in *E. coli* gefunden werden (Abb. 1.9).



**Abbildung 1.9:** Proteinstrukturen verschiedener OMPs (*outer membrane proteins*) in der Aufsicht und auf Membranebene, die einzelnen Monomere sind farblich differenziert [102].

Zur Öffnung der geschlossenen TolC-Pore wurde ein Iris-artiger Mechanismus postuliert, was durch einige Experimente unterstützt werden konnte [102] (Abb.1.10).

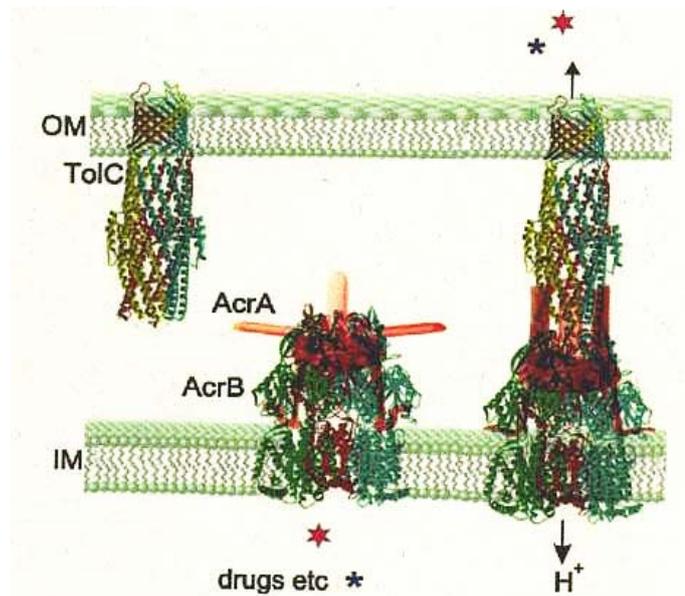
Die Pore kann durch trivalente Kationen, wie z.B. Kobalthexamin, blockiert werden, wobei ein "Aspartat-Ring", der aus den Carboxylgruppen von drei Asparaginsäure-Resten gebildet wird, für die Bindung verantwortlich zu sein scheint [79, 10].



**Abbildung 1.10:** Mechanismus zur Öffnung der TolC-Pore: Geschlossener und offener Zustand im Vergleich, oben mit der Connolly-Oberfläche und unten mit den Helices dargestellt. Die Nummerierung der Helices wurde von [101] übernommen. Gezeigt werden die intramonomeren (I und II) und intermonomeren (III) Verbindungen [102].

Das aktuellste Modell zur Funktionsweise, das sich aus den bekannten Strukturen der Multikomponenten-Effluxpumpe AcrAB/TolC und verschiedenen Studien ergibt, ist in Abbildung 1.11 dargestellt.

Zusammengefasst deuten verschiedene Untersuchungen darauf hin, dass ein schwacher Kontakt zwischen den periplasmatischen Domänen von AcrB und TolC hergestellt wird [210]. Dieser Kontakt muss jedoch durch das Membranfusionsprotein AcrA stabilisiert werden. Dabei scheint es so zu sein, dass AcrA und AcrB konstitutiv im Komplex vorliegen, wobei ungeklärt ist, ob dafür das Substrat gebunden sein muss, und gemeinsam TolC rekrutieren [216].



**Abbildung 1.11:** Schema zum Aufbau und Mechanismus der AcrAB/TolC-Effluxpumpe: Der Komplex AcrA-AcrB rekrutiert TolC [102].

### 1.5.2 Regulation durch den lokalen Repressor AcrR

Der lokale Repressor der AcrAB/TolC-Effluxpumpe AcrR gehört zur sogenannten TetR-Repressor-Familie, wie z.B. auch AcrS aus *E. coli* (Abschnitt 1.6.2), QacR aus *S. aureus* und MtrR aus *N. gonorrhoeae*. Mittels eines von Ramos et al. entwickelten Profils, welches auf Sequenz- und Struktur-Ähnlichkeiten beruht, können Mitglieder dieser Familie identifiziert werden. Gemeinsam ist diesen Proteinen dabei, dass sie als Dimer agieren, dessen Monomere jeweils über ein HTH-Bindemotiv (*helix-turn-helix*) verfügen [176, 65].

Das für den Repressor codierende Gen *acrR* (Datenblatt A.4) wird divergent zum *acrAB*-Operon transkribiert (Abb. 1.12), wobei sich der Promotor innerhalb der intergenischen Region zwischen *acrR* und *acrA* befindet. Mittels vergleichender Sequenzanalyse durch sogenanntes *phylogenetic footprinting* [56] konnte eine mögliche AcrR-Erkennungssequenz in diesem Bereich identifiziert werden [184] (Datenblatt A.1).

Im Jahr 2006 wurde die Struktur von AcrR röntgenkristallographisch aufgeklärt [114].

Der Repressor reprimiert nicht nur die Expression von *acrAB*, sondern auch seine eigene, d.h. er ist autoreguliert. Die primäre Aufgabe von AcrR besteht vermutlich darin als spezifischer sekundärer Regulator für das *fine tuning* der *acrAB*-Expression zu sorgen, d.h. die Zelle vor einer exzessiven Überexpression der Pumpe zu schützen [124]. Hierbei handelt es sich aus zwei Gründen um einen neuen Regulationsmechanismus in *E. coli*. Zum Einen sind die globalen Regulatoren primär, d.h. die Regulation der AcrAB/TolC-Effluxpumpe als Antwort auf äußere Einflüsse (z.B. Antibiotika, oxidativer Stress) erfolgt über diese, während der lokale

Regulator sekundär ist, d.h. als Antwort auf Expressionsveränderungen der Pumpengene zur beschriebenen Feineinstellung notwendig ist. Zum Anderen kommt es bei starker Überexpression von *acrAB* gleichzeitig zu einer erhöhten Expression von *acrR*, um die Funktion (*fine tuning*) des Repressors gewährleisten zu können. Dieser Effekt konnte jedoch bei 25°C nicht gezeigt werden konnte [124].

Bei der Entwicklung klinisch relevanter Fluorchinolonresistenz in *E. coli*-Stämmen kommt es zu einer Akkumulation von Mutationen in verschiedenen Gen-Loci. Dabei kann auch das Gen des Repressors AcrR involviert sein. Verschiedene *in vivo*-Studien konnten zeigen, dass Mutationen in *acrR* zur Resistenz, die teilweise klinisch relevant ist, führen [225, 223, 90]. Dabei konnten bisher Punktmutationen, eine 9 bp Deletion, eine 22 bp Duplikation und die Insertion des IS-Elementes 186 (Datenblatt A.4) in *acrR* für eine gesteigerte Resistenz verantwortlich gemacht werden [223, 90]. Von besonderem Interesse scheint der Aminosäureaustausch von Arginin zu Cystein an Position 45 zu sein, der in mehreren klinischen Isolaten gefunden werden konnte. Diese Position ist hoch konserviert und befindet sich innerhalb des HTH-Bindemotivs [225, 226].

Durch den Verlust der Repressorfunktion kommt es in den Zellen zu einer erhöhten Expression von *acrAB* und damit zu einem gesteigerten Efflux u.a. von Fluorchinolonen.

### 1.5.3 Regulation über globale Regulatorsysteme

Die Expression der Gene *acrAB* als Antwort auf äußere Faktoren (Umwelteinflüsse, Stressbedingungen) wird primär durch globale Regulatorsysteme kontrolliert.

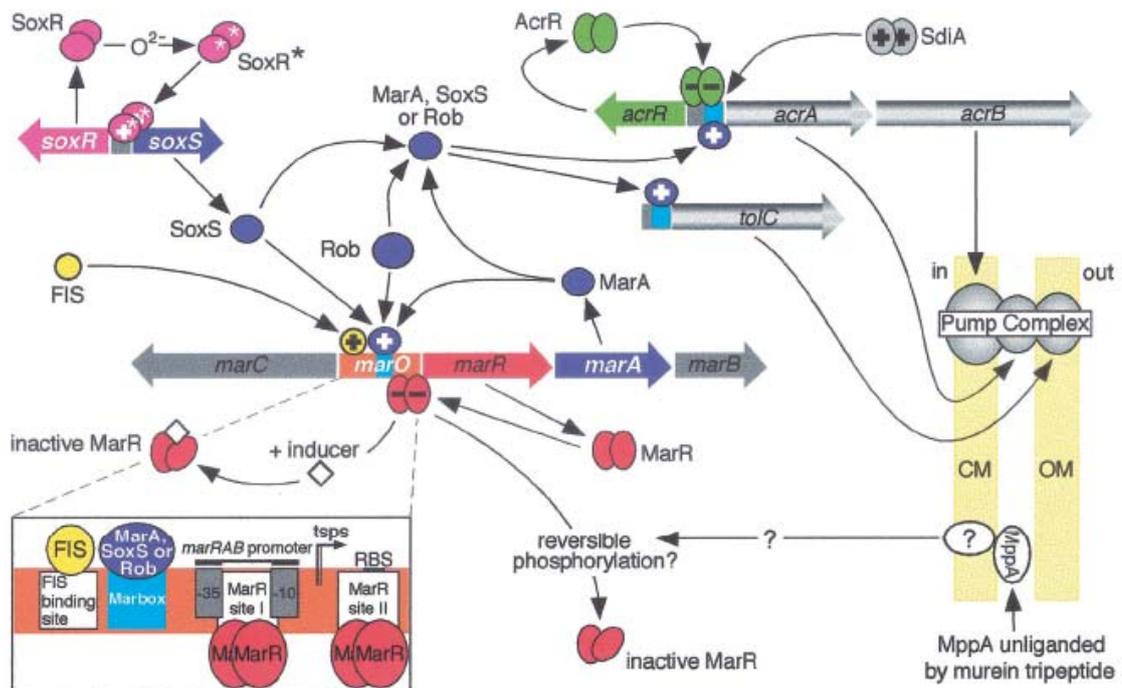
Mutationen in den Genen dieser Regulatorsysteme können zur Überexpression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe und damit zu erhöhter Resistenz führen (Abschnitt 1.5.3.1 und 1.5.3.2) [65].

In Abbildung 1.12 sind die wichtigsten Regulatoren von *acrAB* und deren Organisation schematisch dargestellt, auf die in den folgenden Unterkapiteln im Einzelnen eingegangen werden soll.

#### 1.5.3.1 Das *mar*-Operon: MarA, MarR

Der chromosomale *multiple-antibiotic-resistance* (*mar*)-Locus wurde zuerst bei *E. coli* beschrieben [57]. Inzwischen ist aber bekannt, dass es eine weite Verbreitung dieser Gene bei Enterobacteriaceae gibt [35].

Der *mar*-Locus besteht aus dem Gen *marC* und dem Operon *marRAB*, die divergent transkribiert werden. Hierbei werden zwei unterschiedliche Promotoren innerhalb der intergenischen Region zwischen *marC* und *marR* genutzt (Abb. 1.12). Diese Region wird auch als Operator

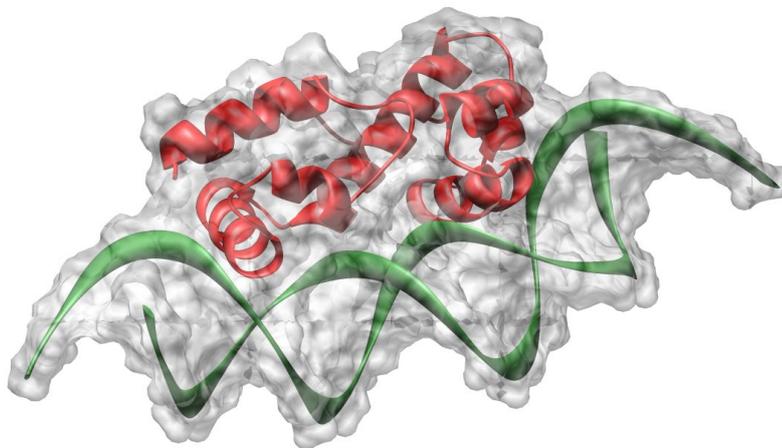
Abbildung 1.12: Übersichtsschema zur Regulation von *acrAB* [65]

*marO* bezeichnet (Datenblatt A.3) [20].

Bei *MarC* könnte es sich möglicherweise um ein integrales Protein der Zytoplasmamembran handeln, dessen Funktion ungeklärt ist. Ebenso ungeklärt ist die Funktion von *MarB* [20]. Im Folgenden soll deshalb nur auf die für die Regulation der AcrAB/TolC-Effluxpumpe wichtige Rolle von *MarA* und *MarR* eingegangen werden.

**MarA** gehört zur sogenannten AraC/XylS-Familie von Transkriptionsregulatoren [52, 45] und ist direkter Aktivator oder indirekter Aktivator bzw. Repressor für mehr als 60 verschiedene Gene (z.B. *fpr*, *fumC*, *micF*, *inaA*, *sodA*, *nfo*, *zwf*, *acrAB*, deren Funktion im Abkürzungsverzeichnis angegeben ist), die zusammen als *mar*-Regulon bezeichnet werden. Erhöhte Expression des *mar*-Regulons führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber verschiedenen Substanzen (z.B. Antibiotika, oxidative Verbindungen) [20, 168, 89]. Dabei scheinen die Promotoren von weniger als 40 Genen direkt aktiviert zu werden, so auch *acrAB* (Abb. 1.12) [135].

Die Struktur von *MarA* inklusive der DNA-Binderegion konnte röntgenkristallographisch analysiert werden [181] (Abb. 1.13). *MarA* besteht aus 127 Aminosäuren und agiert, im Gegensatz zu anderen prokaryotischen Transkriptionsregulatoren wie z.B. TetR-Familienmitglieder (*AcrR*, Abschnitt 1.5.2), als Monomer.



**Abbildung 1.13:** 3D-Strukturmodell von MarA erstellt nach Rhee et al. mit der marbox des *mar*-Operons [181] (*ribbon*-Darstellung inklusive Connolly-Oberfläche)

Dies ist nur möglich, da MarA über zwei homologe HTH-Bindemotive (*helix-turn-helix*) verfügt, welche über eine Helix verbunden sind, die die Orientierung und den Abstand dieser beiden Motive bestimmt. Die Bindung beider Helices gleichzeitig ist nur möglich durch Beugung der DNA (ca. 35°) [181].

Die Bindung von MarA erfolgt an bestimmte Erkennungssequenzen innerhalb der Promotorregion des zu regulierenden Gens, der sogenannten marbox. Trotz der Degeneriertheit, Asymmetrie, sowie unterschiedlichen Lage und Orientierung dieser 20 bp-langen Sequenz, konnte inzwischen eine Konsensussequenz erstellt werden. Dabei wurde auch eine Nomenklatur bezüglich der relativen Lage zur -35- und -10-Region sowie der Orientierung entwickelt: class I marbox: B-orientation (*backward*), *upstream* der -35-Region, class II marbox: F-orientation (*forward*), Überlappung mit der -35-Region [129].

Das *mar*-Operon selber kann durch MarA über eine entsprechende marbox (class I, Datenblatt A.3) autoaktiviert werden (positive Autoregulation) [131]. Die marbox von *acrAB* ist ebenfalls eine class I marbox und im Datenblatt A.1 aufgeführt [129]. Auch für *tolC* konnte eine marbox identifiziert werden [12].

NMR-Untersuchungen zur Interaktion von MarA mit verschiedenen marboxes in Lösung, lassen unterschiedliche Konformationen vermuten. Diese schwachen aber signifikanten Neuordnungen von Seitenketten und/oder des *backbones*, könnten für die Bindung an unterschiedliche DNA-Sequenzen notwendig sein [39].

Für die transkriptionale Aktivierung durch Kontakt zwischen MarA und der RNA-Polymerase wurde ein neuer Mechanismus, das sogenannte *prerecruitment* postuliert. Hierbei bilden MarA und die RNA-Polymerase einen binären Komplex, welcher anschließend die DNA nach möglichen Bindungsstellen (marbox) absucht [134]. Dabei ist noch ungeklärt, ob wie bei anderen Regulatoren vom AraC-Typ eine Bindung an die RNA-Polymerase über deren C-terminale

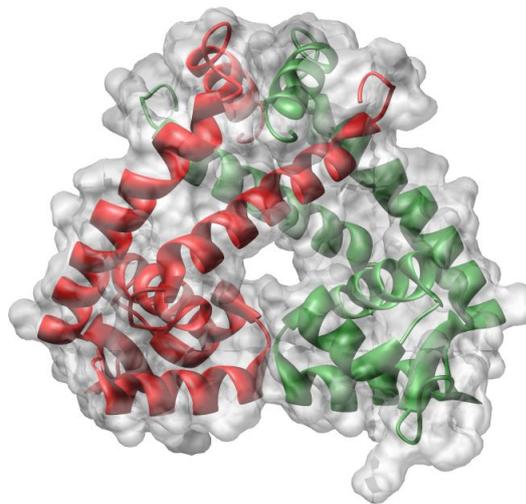
Domäne erfolgt. Ausgeschlossen werden konnte lediglich eine Bindung über den N-Terminus [45].

Als Mechanismus für die Umkehr einer Induktion von MarA, d.h. für den Abbau des Proteins, wird eine proteolytische Spaltung von vermutlich 8 Aminosäuren des N-Terminus durch die Lon-Protease diskutiert [63, 152].

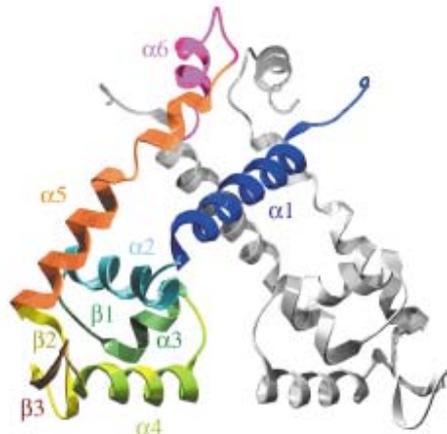
Durch den Einsatz von *anti-sense marA*-DNA konnte die Expression des *mar*-Operons direkt experimentell inhibiert werden [230].

**MarR** ist der Prototyp der MarR-Familie von Regulatorproteinen und lokaler Repressor des *mar*-Operons.

Die röntgenkristallographische Analyse von MarR ergab die in Abbildung 1.14 dargestellte 3D-Struktur. Dabei konnte in Übereinstimmung mit früheren Studien gezeigt werden, dass MarR als Dimer vorliegt, dessen Monomere jeweils aus 144 Aminosäuren bestehen [7, 198]. Jedes Monomer verfügt über ein für die DNA-Bindung verantwortliches *winged-helix*-Bindemotiv ( $\beta 1$ - $\alpha 3$ - $\alpha 4$ - $\beta 2$ -W1- $\beta 3$  in Abb. 1.15).



**Abbildung 1.14:** 3D-Strukturmodell von MarR erstellt nach Alekshun et al. [7] (*ribbon*-Darstellung inklusive Connolly-Oberfläche)



**Abbildung 1.15:** *ribbon*-Darstellung von MarR mit Kennzeichnung der einzelnen Helices und Faltblattstrukturen [7]

Die Bindung innerhalb des Operators *marO* erfolgt über zwei verschiedene Binderegionen (Datenblatt A.3, Abb. 1.12). Die für die Repression entscheidende primäre Binderegion (*site I*) grenzt an die -35-Region und überlappt 4 bp mit der -10-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz. Die zweite Binderegion (*site II*), deren Bedeutung noch nicht gänzlich geklärt ist, beginnt 13 bp weiter *downstream* zur *site I* und endet genau vor dem ersten Basenpaar der codierenden Sequenz von *marR*. Es wird vermutet, dass das Pentamer TTGCC für die Erkennung von MarR von besonderer Bedeutung ist [132, 5]. Die Aktivierung des *mar*-Operons durch den Induktor Salicylat (Natriumsalz) erfolgt über dessen Bindung an MarR [7], wodurch die Bindung des Repressors an die beiden DNA-Sequenzen (*site I* und *site II*) verhindert wird [34].

Auch andere Phenole, die über den gleichen Mechanismus zur Aktivierung führen, zählen zu Induktoren des *mar*-Operons. Dazu gehören die Natriumsalze der Acetylsalicylsäure und Benzoesäure, sowie Paracetamol. Sie bewirken jedoch eine geringere Aktivierung als Salicylat [34].

Weitere Induktoren des *mar*-Operons sind Vitamin K, andere Naphthochinone, Ethanol oder Gallensalze. Über deren Bindungsmodus ist jedoch nichts bekannt. Diese im natürlichen Habitat von *E. coli* vorkommenden Substanzen könnten als alternative Induktoren bei der Entwicklung von Resistenzen eine entscheidende Rolle spielen [84].

Auch für häufig angewendete Arzneistoffe wird inzwischen die Möglichkeit einer Induktion des *mar*-Operons diskutiert, so insbesondere für Diazepam [212].

Zusammenfassend führt die Überexpression von *marA* in *E. coli* zur Ausprägung von Resistenzen gegenüber vielen verschiedenen, nicht verwandten Substanzen [54, 144].

Bei der Entwicklung der hohen klinisch relevanten Resistenz gegenüber Fluorchinolonen spielt im Besonderen das Auftreten von *marR*- und *marO*-Mutationen sowohl *in vitro* als auch

*in vivo* eine Rolle [75, 95, 117]. Insgesamt ist die daraus resultierende Überexpression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe maßgeblich für die Resistenz verantwortlich, wohingegen die Reduktion des Porins OmpF untergeordnet zu sein scheint [54].

Ein Merkmal von *E. coli-marR*-Mutanten ist die reduzierte Fitness im Vergleich zum Ausgangsstamm, die sich vor allem in der verringerten Wachstumsgeschwindigkeit zeigt [194]. Von Schulte (2001) wurde in einem Fitness-Kompensationsexperiment untersucht, ob nach selektionsfreier Inkubation möglicherweise kompensatorische Mutationen diesen Fitnessverlust ausgleichen können. Dabei konnten u.a. *marR*-Mutanten mit zusätzlichen Punktmutationen in *marA*, die eine zum Ausgangsstamm vergleichbare Fitness und eine wiederhergestellte Empfindlichkeit aufwiesen, isoliert werden. Ob oder in welchem Ausmaß ein Zusammenhang zwischen der wiederhergestellten Fitness und Empfindlichkeit mit dem mutierten MarA besteht, konnte bisher noch nicht geklärt werden [194]. Daher wären weitere Untersuchungen der *marA*-Punktmutanten, sowie zum generellen Einfluss des *mar*-Operons und damit der AcrAB/TolC-Effluxpumpe in *E. coli* auf die Fitness von großem Interesse.

### 1.5.3.2 SoxRS

Als Antwort auf oxidativen Stress werden in *E. coli* die Gene des *soxRS*-Regulons aktiviert [8]. Das für diese Regulation verantwortliche *soxRS*-Operon besteht aus den divergent transkribierten Genen für den globalen Aktivator SoxS und dessen positiven Regulator SoxR (Abb. 1.12) [233, 65, 20].

Das Protein **SoxS** zeigt große Homologie zu MarA und gehört ebenfalls zur AraC/XylS-Familie von Transkriptionsaktivatoren [115, 52]. Zur Überexpression von SoxS und damit zur direkten oder indirekten Aktivierung diverser Gene kommt es nach der durch SoxR aktivierten *de novo*-Expression von *soxS* [65, 168].

Beispiele von Genen, die zum *soxRS*-Regulon gehören sind *sodA*, *fpr*, *micF*, *ribA*, *inaA*, *fldA/B*, *nfo*, *marRAB*, *nfsA*, *zwf*, *fur*, *fumC*, *acnA*, *rimK*, *tolC* und *acrAB* (die Funktion dieser Gene ist im Abkürzungsverzeichnis angegeben) [168, 131, 20]. Hier zeigt sich eine deutliche Überlappung mit dem *mar*-Regulon, die teilweise auf direkter Aktivierung des *mar*-Operons beruht und somit zur Ausprägung eines MAR-Phänotyps führt [131, 20]. Auch die Aktivierung von *acrAB* durch SoxS erfolgt vermutlich direkt (Abb. 1.12) [65]. Des Weiteren unterliegt die *soxRS*-Transkription einer negativen Autoregulation durch SoxS selbst [157]. SoxS ist mit 107 Aminosäuren das kleinste Mitglied der AraC/XylS-Familie und agiert wie MarA über zwei HTH-Bindemotive als Monomer [52]. Die DNA-Bindung erfolgt ebenfalls innerhalb des Promotors der zu aktivierenden Gene über die *marbox* (Abschnitt 1.5.3.1) [129]. Hierbei zeigen MarA und SoxS hinsichtlich dieser Erkennungssequenzen unterschiedlich starke Affinitäten, was zu einem quantitativ unterschiedlichem Ausmaß der Aktivierung führt [135]. In der Konsequenz resultiert daraus, dass SoxS zu einer größeren Resistenz gegenüber Superoxiden führt als im Vergleich die Überexpression von MarA [130].

Für die Gen-Aktivierung durch SoxS ist bekannt, dass diese über eine Interaktion von SoxS mit der RNA-Polymerase zustande kommt [88, 134]. Als allgemeiner Mechanismus wird hier wie bei MarA das sogenannte *prerecruitment* vermutet, d.h. die Bildung eines binären Komplexes (SoxS-RNA-Polymerase), welcher das Chromosom nach möglichen Bindestellen absucht [134, 199, 64]. Dabei scheint SoxS an den C-Terminus der RNA-Polymerase zu binden und als eine Art Co- $\sigma$ -Faktor zu agieren [199]. Weitere Studien ergaben zwei mögliche Aktivierungsmechanismen abhängig von der Lage der marbox. Bei einer class I marbox (Abschnitt 1.5.3.1) verläuft die Aktivierung wie gerade beschrieben, wohingegen bei einer class II marbox (Abschnitt 1.5.3.1) der genaue Mechanismus noch unbekannt ist, jedoch die Bindung an den C-Terminus der RNA-Polymerase keine Rolle zu spielen scheint (*ambidextrous transcriptional activation*) [88, 134].

Ebenso wie MarA (Abschnitt 1.5.3.1) wird als verantwortlich für den proteolytischen Abbau von SoxS (17 Aminosäuren des N-Terminus) nach Aussetzen der Induktion die Lon-Protease diskutiert [63, 200].

Der positive Regulator des *soxRS*-Operons **SoxR** gehört zur MerR-Familie von Metallbindenden Transkriptionsfaktoren und agiert als Homodimer. Jedes Monomer besitzt eine DNA-Binderegion (HTH-Bindemotiv) und ein [2Fe-2S]-Zentrum [76], welches im nicht-aktiviertem Zustand in der reduzierten Form vorliegt [41, 55].

Bei auftretendem oxidativem Stress durch Superoxide oder Substanzen, die in der Lage sind Elektronen von NADP oder NADPH abzuspalten, auf molekularen Sauerstoff zu übertragen und damit sogenannte Superoxide zu generieren, kommt es zur Oxidation des [2Fe-2S]-Zentrums von SoxR und damit zur Aktivierung der Transkription von SoxS. Solche Induktoren sind z.B. Paraquat oder Naphtochinone (Menadion), aber auch Stickstoffoxide, die zur Nitrosilierung von SoxR führen [168]. Des Weiteren scheint auch UVB-Strahlung eine Oxidation des [2Fe-2S]-Zentrums von SoxR auszulösen [61]. Auch konnte die Beteiligung des *soxRS*-Regulons als Antwort auf Hydroxyperoxide gezeigt werden [196].

SoxR besitzt innerhalb der überlappenden Promotorbereiche von *soxR* und *soxS* lediglich eine Binderegion, die sowohl für die Autorepression von *soxR* als auch, nach Oxidation von SoxR, für die Aktivierung von *soxS* benötigt wird [77]. Dies ist wahrscheinlich dadurch möglich, indem SoxR nach Oxidation eine Änderung in der Proteinstruktur erfährt [30].

Für die Rückkehr von SoxR zur reduzierten Form scheinen die Gene *rsx* und *rseC* eine Rolle zu spielen, wobei der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt werden konnte [99].

Auch das *soxRS*-Operon scheint im Zusammenhang mit hoher Fluorchinolonresistenz in *E. coli* zu stehen.

So konnte von Kern et al. die Bedeutung von Mutationen im *soxRS*-Operon bei der Entwicklung von Fluorchinolonresistenz in *E. coli in vitro* gezeigt werden [95]. Auch *in vivo* konnten innerhalb des *soxRS*-Operons, vor allem in *soxR*, Mutationen identifiziert werden, die eine erhöhte Resistenz gegenüber Antibiotika in *E. coli* verursachten [103].

Ob es sich hierbei in Hinblick auf Fluorchinolonresistenz um ein bei klinischen Isolaten häufig auftretendes Phänomen handelt, ist bisher noch nicht geklärt.

### 1.5.3.3 Rob

Das *E. coli* Protein **Rob** (*right oriC binding*) gehört als Homologon von MarA und SoxS zur AraC/XylS-Familie von Transkriptionsfaktoren. Rob reguliert ebenfalls diverse Gruppen von Genen (Regulon), welche im Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber Antibiotika, organischen Lösungsmitteln und Schwermetallen stehen. Dabei weist dieses Protein ein überlappendes Spektrum kontrollierter Gene zu MarA bzw. SoxS auf [52] (Abschnitte 1.5.3.1 und 1.5.3.2).

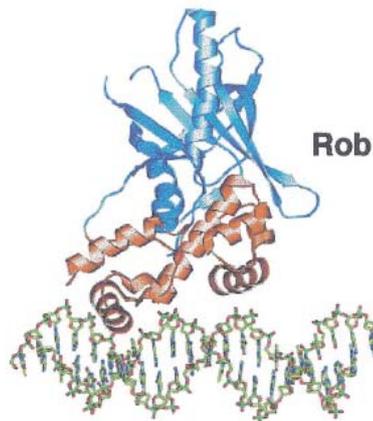
Identifiziert wurde Rob zunächst aufgrund seiner Bindung am "rechten Rand" (*right border*) von *oriC*, wobei kein Einfluss auf die DNA-Replikation nachgewiesen werden konnte. In diesen Untersuchungen konnte auch die Lage des *rob*-Gens zwischen *trpR* und der *phoM*-Region identifiziert werden [203].

Rob wird in *E. coli*, im Gegensatz zu MarA und SoxS, konstitutiv exprimiert mit einer Anzahl von ca. 5.000-10.000 Molekülen pro Zelle [203, 15]. Die Analyse des Rob-Regulons mittels *rob*-Nullmutanten ergab, dass durch den *basal level* an Rob-Protein die Gene *inaA*, *marRAB*, *aslB*, *ybaO*, *mdlA*, *yfhD* und *ybiS* aktiviert werden, wohingegen *galT* reprimiert wird. Obwohl Rob in dieser großen Menge in der Zelle vorliegt, werden die Gene des Regulons nur in geringem Maße aktiviert, so dass angenommen wird, dass Rob als Cofaktor agiert oder erst einer Aktivierung bedarf [22]. *In vitro*-Experimente und Überexpressionsversuche erweiterten die Erkenntnisse über das Regulationsspektrum (*micF*, *fumC*, *nfo*, *sodA*, *fpr*, und *zwf*), wobei hier die Bedeutung für den tatsächlichen Zustand (*basal level*) in der Zelle fraglich ist [13]. Die Funktion der in diesem Absatz aufgeführten Gene ist im Abkürzungsverzeichnis angegeben.

Über die Regulation des *mar*-Operons scheint Rob indirekt einen Einfluss auf die Resistenz gegenüber verschiedenen Substanzen auszuüben (MAR-Phänotyp) [22]. Das *acrAB*-Operon wird jedoch direkt von Rob aktiviert (Abb. 1.12) [229]. Dabei liegt die primäre Aufgabe des konstitutiv exprimierten Rob Proteins vermutlich in der Aktivierung der Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe als Antwort auf im natürlichen Habitat vorkommende toxische Substanzen, wie Gallensalze und Fettsäuren. Für den Mechanismus wird eine Art Aktivierung von Rob durch Bindung der Substanzen an dessen C-Terminus diskutiert [185].

Mittlerweile konnte die Struktur von Rob im Komplex mit der Erkennungssequenz im Promotor von *micF* aufgeklärt werden (Abb. 1.16) [106].

Dadurch wurden neue Theorien hinsichtlich des Aktivierungsmechanismus entwickelt. So konnte gezeigt werden, dass Rob ebenso wie MarA über zwei HTH-Bindemotive im N-terminalen Teil (120 Aminosäuren, homolog zu MarA und SoxS) verfügt, welche über eine weitere Helix miteinander verbunden sind. Des Weiteren besitzt Rob einen wesentlich größeren C-terminalen Teil (169 Aminosäuren, homolog zu GalT) als MarA oder SoxS, dessen Bedeutung noch ungeklärt ist, für den jedoch die Bindung von Effektormolekülen vermutet wird [106]. Mögliche Effektormoleküle sind sehr wahrscheinlich Gallensalze und Fettsäuren [185].



**Abbildung 1.16:** *ribbon*-Darstellung von Rob inklusive der DNA-Bindestelle im *micF*-Promotor: rot markiert ist der zu MarA und SoxS homologe Bereich, blau markiert ist der C-terminale Teil [106, 65].

Die DNA-Bindung selber erfolgt wie bei MarA und SoxS über die 20 bp Erkennungssequenz, die sogenannte *marbox* (Abschnitt 1.5.3.1). Dabei scheint Rob nur mit dem N-terminalen HTH-Motiv direkt zu binden. Für die Bindung des zweiten HTH-Motivs wurden unterschiedliche Hypothesen entwickelt. Zum Einen könnte es nach Bindung zu einer Beugung der DNA oder nach Bindung eines Effektormoleküls oder Verlust eines Inhibitors zu einer Konformationsänderung von Rob kommen. Zum Anderen könnte die Bindung über eine Helix ausreichen, aber für die Steigerung des Effekts in einigen anderen Promotoren auch die zweite Helix von Bedeutung sein [106, 13].

Die Expression von *rob* wird sowohl von MarA [193] als auch von SoxS [139] reprimiert als Antwort auf Antibiotika- bzw. oxidativen Stress. Dadurch werden die Bindungsstellen an den entsprechenden Promotoren für diese beiden Transkriptionsaktivatoren frei.

Für eine posttranslationale Steigerung der Aktivität von Rob können 2,2'-Dipyridyl und 4,4'-Dipyridyl eingesetzt werden. Hierbei scheint eine Bindung dieser Substanzen an den C-Terminus von Rob eine Rolle zu spielen [186].

### 1.5.3.4 Weitere Funktionen und Regulatoren

Neben der in Abschnitt 1.5 angesprochenen Rolle bei der Resistenzvermittlung gegenüber verschiedenen Substanzen, besteht eine weitere Aufgabe der AcrAB/TolC-Effluxpumpe vermutlich darin, Signalmoleküle, die für die Zelldichten-abhängige Zell-Zell-Kommunikation wichtig sind, herauszuschleusen [227].

Die Zell-Zell-Kommunikation von Bakterien basiert auf der Sekretion verschiedener niedermolekularer Signale und wird als *quorum-sensing* bezeichnet. Der *quorum-sensing*-Regulator

SdiA (*suppressor of division inhibition*) in *E. coli*, ein LuxR-Homologon, spielt dabei eine entscheidende Rolle [92, 235]. Dieser Regulator reguliert *acrAB* positiv, so dass mit Hilfe der Effluxpumpe noch bisher unbekannte Signalmoleküle aus der Zelle transportiert werden können [174, 236]. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Signalmolekülen um solche mit einer Chinolon-ähnlichen Struktur, wie sie schon bei *Pseudomonas aeruginosa* (2-Heptyl-3-hydroxy-4-chinolon, *Pseudomonas quinolone signal*) beschrieben wurden [236, 174].

Des Weiteren scheint das *E. coli* Protein Fis (*factor for invasion stimulation*) ein indirekter Aktivator von *acrAB* zu sein [133]. Fis ist ein sequenzspezifisches DNA-Bindeprotein (über 35 bekannte Bindestellen), das verschiedene Gene reguliert, indem es bestimmte DNA-Konformationen stimuliert [162, 163]. Dadurch bewirkt Fis eine Fixierung des negativen Superspiralisierungsgrads und stabilisiert die DNA-Architektur verschiedener Promotoren [65]. Durch eine der beiden Möglichkeiten verstärkt Fis die Transkriptionsaktivierung der Promotoren von *rob*, *soxS* und *marA*, wodurch die Expression von *acrAB* erhöht wird [133]. Dabei ist für das *mar*-Operon eine Bindung von Fis innerhalb von *marO* stromabwärts (*upstream*) von der *marbox* bekannt [65].

Das in der Abbildung 1.12 mit aufgeführte Protein MppA (*periplasmic murein tripeptide binding protein*) scheint keine Bedeutung für die Regulation des *mar*-Operons und damit für *acrAB* zu haben [25].

## 1.6 Die AcrEF/TolC-Effluxpumpe in *E. coli*

Eine weitere, aufgrund ihrer großen Homologie, sowie einem vermutlich ähnlichem Substratspektrum zu AcrAB, interessante RND-Effluxpumpe in *E. coli* ist AcrEF/TolC. Auch AcrEF wird im Zusammenhang mit Fluorchinolonresistenz diskutiert [155, 125].

### 1.6.1 Struktur, Substratspektrum und Funktion

Der strukturelle Aufbau und vermutlich auch die Funktionsweise von AcrEF sind ähnlich zu AcrAB (Abschnitt 1.5). Die eigentliche Pumpe AcrF befindet sich in der Zytoplasmamembran und steht in direktem Kontakt mit dem Membranfusionsprotein AcrE. Auch AcrEF assoziiert, für den Transport von Substanzen durch die äußere Membran mit dem Porin TolC [125].

Die Gene, die für AcrF und AcrE codieren, wurden erstmals fälschlicherweise als *envCD* kloniert, später als *acrEF* bezeichnet und bilden wie *acrAB* ein Operon [97, 96, 155].

Mit der Überexpression von *acrEF* auf Plasmiden konnte zum Einen die Überempfindlichkeit von *acrAB*-Deletionsmutanten unterdrückt werden [208], zum Anderen konnte gezeigt werden, dass AcrEF ein zu AcrAB nahezu identisches Substratspektrum besitzt [155, 208, 82]. Die *acrEF*-Gene werden jedoch unter Laborbedingungen wenig bis gar nicht

exprimiert [127]. Dafür scheint eine Maskierung des Effektes der AcrEF-Effluxpumpe durch die AcrAB-Effluxpumpe verantwortlich zu sein [94].

Untersuchungen mit *acrEF*-Deletionsmutanten lassen darauf schließen, dass die Bedeutung von AcrEF im Ausschleusen des toxischen Stoffwechselproduktes Indol (Tryptophanabbau) liegt, bei dem AcrAB eine untergeordnete Rolle spielt [94, 43]. Indol ist ein putatives extrazelluläres Signalmolekül [222], welches auch in die Bildung von Biofilmen in *E. coli* involviert ist [136] und überwiegend in der stationären Wachstumsphase vorherrscht [180].

Des Weiteren wird vermutet, dass AcrEF mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung der Zellteilung ist. Dabei wird angenommen, dass diese Effluxpumpe in der Lage ist, die Produkte des Membran- und Murein-*recyclings* aus dem periplasmatischen Raum zu entfernen [107].

### 1.6.2 Regulation

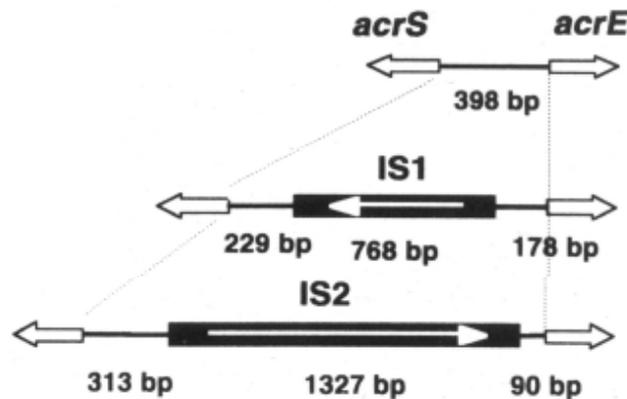
Analog zu *acrAB* wird das *acrEF*-Operon ebenfalls durch einen divergent transkribierten lokalen Repressor der TetR-Familie reguliert [176]. Entsprechend der schon erwähnten Verwechslung wurde dieser zunächst als EnvR bezeichnet und später in AcrS umbenannt [155, 107]. Innerhalb der intergenischen Region zwischen *acrS* und *acrE* konnte mittels vergleichender Sequenzanalyse durch *phylogenetic footprinting* [56] eine putative AcrR-Erkennungssequenz identifiziert werden [184] (Datenblatt A.2), deren Bedeutung jedoch ungeklärt ist.

In der gleichen Studie konnte des Weiteren eine marbox, die Erkennungssequenz des globalen Transkriptionsaktivators MarA (Abschnitt 1.5.3.1), gefunden werden, wobei auch hier die Funktionalität noch ungeklärt ist [184] (Datenblatt A.2).

Aufgrund der Tatsache, dass *acrEF* nur wenig bis gar nicht exprimiert wird, AcrEF allerdings ein ähnliches Substratspektrum wie AcrAB aufweist, wurde angenommen, dass AcrEF AcrAB bei Funktionsverlust ersetzt. Dieses Phänomen konnte jedoch zunächst lediglich in artifiziellen Systemen (Überexpressionsvektoren) gezeigt werden [208]. Des Weiteren konnte von Elkins und Nikaido gezeigt werden, dass die MF-Proteine AcrA und AcrE beliebig austauschbar zu sein scheinen. So konnte unter anderem ein AcrA-Verlust durch eine erhöhte AcrE-Menge kompensiert werden [48]. Kobayashi et al. konnten ergänzend zeigen, dass bei einem AcrB-Verlust dieser durch eine Erhöhung der Menge AcrF kompensiert werden kann [98].

In neueren Studien wurden *E. coli*-Stämme mit Insertionen im *acrB*-Gen (IS30, IS186) untersucht, welche dadurch eine verminderte Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln aufwiesen. Nach einem weiteren Selektionsschritt waren diese Stämme wieder resistent. Verantwortlich dafür wurden IS-Elemente (IS1, IS2) innerhalb der intergenischen Region zwischen *acrS* und *acrE* gemacht (Abb. 1.17 und Datenblatt A.2). Nach Integration von IS1 bzw. IS2 konnte eine erhöhte Expression der AcrEF/TolC-Effluxpumpe nachgewiesen werden, wobei der Effekt für IS2 etwas stärker ausgeprägt war [98, 90]. Als Mechanismus für die gesteigerte Expression von *acrEF* durch IS2 wurde die mögliche Bildung eines Hybridpromotors

vermutet [90]. Diese Steigerung der Expression von *acrEF* nach Insertion von IS-Elementen (IS1, IS10) innerhalb der intergenischen Region (*acrS-acrE*) konnte inzwischen auch bei Salmonellen beobachtet werden [160].



**Abbildung 1.17:** Schematische Darstellung der *acrSE*-intergenischen Region (offene Pfeile zeigen die Richtung der Gene *acrS* und *acrE* an) und Markierung der IS-Elemente mit dunklen Balken unter Richtungsangabe des Transposase-Gens [98].

Ein weiterer möglicher Mechanismus scheint die Regulation durch H-NS (*histone like protein*) zu sein. H-NS ist in gramnegativen Bakterien weit verbreitet, beteiligt an der Strukturierung des bakteriellen Chromosoms und der Regulation verschiedener Gene [14, 26].

Die meisten dieser Gene spielen eine Rolle bei der Anpassung an veränderte Umweltbedingungen und/oder bei der Virulenz [86]. Es konnte gezeigt werden, dass H-NS die Expression unter anderem von *acrEF* reprimiert und, dass durch Deletion von *hns* die Resistenz in *E. coli*-Stämmen mit *acrAB*-Deletion wieder hergestellt werden konnte [156].

Auch scheint die in Abschnitt 1.5.3.4 angesprochene Regulation von *acrAB* durch SdiA, für die Funktion bei der Zell-Zell-Kommunikation, ebenfalls bei *acrEF* eine Rolle zu spielen [227].

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Vor dem Hintergrund einer weltweiten Zunahme bakterieller Resistenzen gegenüber den eingesetzten Antibiotika und der dadurch erschwerten Therapie von Infektionskrankheiten, ist das Verständnis der dahinterstehenden Resistenzmechanismen unabdingbar. Aufgrund der dabei zunehmenden Bedeutung von Efflux-bedingten hochgradigen Resistenzen gegenüber

vielen nicht-verwandten Substanzen (Abschnitt 1.4 und 1.3) gilt diesem Mechanismus besondere Aufmerksamkeit.

Bei der Entwicklung von Fluorchinolone-resistenz in *E. coli* scheint der Effluxmechanismus eine entscheidende Rolle zu spielen. Hierbei kommt vor allem der AcrAB/TolC-Effluxpumpe Bedeutung zu. So scheint die Funktionsfähigkeit dieser Pumpe Voraussetzung für die Entstehung von *target*-Mutationen zu sein [158]. Dabei führen Einzelmutationen (bei *E. coli* in *gyrA*) nicht zu einer klinisch relevanten Resistenz (MHK  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ), hierfür sind zusätzliche Mutationen in den Genen der Zielstrukturen erforderlich [231]. Für die Entwicklung von hoher klinisch relevanter Fluorchinolone-resistenz ist die Akkumulation von Mutationen in verschiedenen Genen notwendig, wobei in späteren Selektionsschritten *non target*-Mutationen auftreten. Meist sind die Gene des lokalen (*acrR*) und der globalen Regulatoren (z.B. *mar*-Operon) der AcrAB/TolC-Effluxpumpe betroffen. Die dadurch verursachte Überexpression von *acrAB* ist demnach ein wichtiger Faktor in der Resistenzentwicklung von Fluorchinolonen (Abschnitt 1.4).

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, mögliche Zusammenhänge der Expression von *acrAB* bei der Entwicklung der Resistenz gegenüber Fluorchinolonen in *E. coli* zu untersuchen.

Von Interesse waren dabei der Einfluss von Fluorchinolonen selbst, *gyrA*-Mutationen, sowie der Einfluss des Superspiralisierungsgrads auf die Expression von *acrAB*. Des Weiteren sollte der Einfluss unterschiedlicher *marO*- bzw. *marR*-Mutationen auf das Ausmaß der Expression von *acrAB* im Vergleich mit phänotypischen Werten (MHK) untersucht werden. Zudem sollte geklärt werden, ob die nach selektionsfreier Inkubation bei *marR*-Deletionsmutanten aufgetretenen *marA*-Punktmutationen für die verminderte Resistenz und die Fitness-Kompensation in diesen Stämmen verantwortlich sind. Auch der Zusammenhang zwischen der AcrAB/TolC- und der homologen AcrEF/TolC-Effluxpumpe sollte überprüft werden.

Hauptaugenmerk lag dabei zunächst auf der Entwicklung von Reportersystemen, die eine einfache, schnelle und sensitive Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Änderungen im Ausmaß der Expression von *acrAB* bzw. *acrEF* ermöglichen sollten.

Durch Komplementations-Assays mit bestehenden und neu konstruierten Überexpressionsplasmiden sollte der Einfluss von Regulatoren der AcrAB/TolC-Effluxpumpe (*MarR*, *MarA*) auf die Resistenz bzw. Empfindlichkeit untersucht werden.

Mit Hilfe eines Computerprogramms (SYBYL<sup>®</sup> 7.2) sollten zusätzlich 3D-Strukturmodelle von mutierten Regulatorproteinen (*MarR*, *MarA*) berechnet werden, um weitere Anhaltspunkte zum Resistenzmechanismus zu erhalten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in der Tabelle 2.1 aufgelistet.

<b>Geräte</b>	<b>Firma</b>	<b>Bezeichnung</b>
Brutschrank	Heraeus, Osterode, Deutschland	Function line
Cycler	Biometra, Göttingen, Deutschland	T3 Thermocycler, Tpersonal, Tgradient
Elektroporationsgeräte	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland	Pulse Controller II/ Gene Pulser II
Gelelektrophoresekammer	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, Deutschland	Comphor Mini/ Comphor Midi
Kapillarsequenzierer	Perkin Elmer Corporation Foster City, USA	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
Luminometer	Anthos, Krefeld, Deutschland	anthos lucy 2
Mikrotiterplatten Luminometer	Dynatec, USA	Dynatec MicroFOUR™
Mikrotiterplatten MHK	VWR International, Darmstadt, Deutschland	96er Well, steril, U-Form
pH Meter	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland	ino Lab pH Level 1 + Elektrode
Photometer	Varian Deutschland GmbH Darmstadt, Deutschland	Cary 50 Bio
Pipetten	Abimed, Düsseldorf, Deutschland	Gilson Kolbenhubpipetten
Reinstwasseranlage	Millipore, Schwalbach, Deutschland	MilliQ synthesis
Schüttelinkubator (groß)	New Brunswick Scientific New Jersey, USA	C25 Incubator Shaker Classic Series
Schüttelinkubator (klein)	B. Braun Biotech	Certomat H/

## 2 Material und Methoden

Geräte	Firma	Bezeichnung
(Schüttelinkubator (klein))	International GmbH Melsungen, Deutschland	Certomat R
Sicherheitswerkbänke	Heraeus, Osterode, Deutschland	Hera safe, Hera guard
Spannungsgeber	Gibco BRL, Gaithersburg, USA	Gibco BRL ST504
Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg Deutschland	Laboport
Videodokumentationsanlage	Biometra, Göttingen, Deutschland	BioDoc Analyze/ Biometra Ti5
Vortexer	Scientific Industries Inc. Bohemia USA	Vortex Genie 2
Wasserbad (groß)	Julabo Labortechnik GmbH	Julabo Shake Temp SW22
Wasserbad (klein)	Seelbach, Deutschland	Julabo MWB
Zentrifuge (groß)	Heraeus, Osterode, Deutschland	Biofuge stratos
Zentrifugen (klein)		Biofuge fresco/ pico

**Tabelle 2.1:** Liste der verwendeten Geräte

### 2.1.2 Chemikalien

Die zur Durchführung der Experimente benötigten Chemikalien (reinst, p.a.) sind in der Tabelle 2.2 mit den, für die sichere Handhabung zu beachtenden, Gefahrensymbole, sowie R- und S-Sätzen angegeben. In Tabelle 2.3 ist die Herstellung der verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Stoffbezeichnung	Firma	Gefahrensymbol/ R- und S-Sätze
Agar Agar	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
Agarose, <i>low-melt</i>	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
Bacto™ Trypton	Becton, Dickinson & Co., La Pont de Claix, Frankreich	Entfällt nach 67/548/EWG
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
BSA	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
CaCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Xi; R:36; S:22-24
CDTA	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland	Xi; R:36/37/38; S:26-36

Stoffbezeichnung	Firma	Gefahrensymbol/ R- und S-Sätze
D-Glukose x H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA	Xn; R:20/21/22
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Xi; R:36/38; S:26
dNTPs	Roche, Mannheim, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
EDTA (Titrplex III)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	C; R:10-35; S:23-26-45
Ethanol (96 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	F; R:11, S:7-16
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	T+; R:22-26-36/37/38-68; S:26-36/37-45
Ficoll-400	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
Glycerin 87 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
Glycerol 99 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	C; R:34;S:26-36/37/39-45
HCl-Lösung, rauchend	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	C; R:34-37; S:26-36/37/39-45
Hefe Extrakt	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
K(CH <sub>3</sub> COO)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
KCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
L-Arabinose	Fluka/Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
LiChrosolv H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
MgCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
MOPS	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland	Xi; R:36/37/38; S:26-36
Na(CH <sub>3</sub> COO)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	C; R:35; S:26-37/39-45
NH <sub>4</sub> Cl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Xn; R:22-36 ; S:22
SeaKam <sup>®</sup> LE Agarose	Cambrex Bio Science Rockland, Rockland ME, USA	Entfällt nach 67/548/EWG
Smart Ladder	Eurogentec, Seraing, Belgien	Entfällt nach 67/548/EWG
Tris Base	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Xi; R:36/38
Triton X-100	Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA	Xn; R:22; S: 36/37/38

Stoffbezeichnung	Firma	Gefahrensymbol/ R- und S-Sätze
Xylencyanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	Xi; R:36; S: 24

**Tabelle 2.2:** Chemikalienliste

Puffer	Herstellung
5x CCLR	12,5 mL Tris-PO <sub>4</sub> 0,1543 g DTT 0,3463 g CDTA 50 mL Glycerol 99 % 5 mL TritonX-100
Ladepuffer	2,5 mg Bromphenolblau 2,5 mg Xylencyanol ad 1 mL Ficoll-400
10x Ligationspuffer	660 mM Tris·Cl 50 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM DTT 10 mM dATP in 10 mL dH <sub>2</sub> O
50x TAE	242,2 g Tris Base 18,7 g 50 mM EDTA 1 L dH <sub>2</sub> O mit Eisessig auf pH 8 einstellen
TE	0,24 g 20mM Tris·Cl pH 7,6 0,29 g 50 mM NaCl ad 100 mL dH <sub>2</sub> O
TFB1	0,5 g K(CH <sub>3</sub> COO) 18 g MgCl <sub>2</sub> 0,75 g KCl 1,6 mL 1 M CaCl <sub>2</sub> 17 mL Glycerin 87 % 81,4 mL dH <sub>2</sub> O pH 5,8 mit Eisessig einstellen, steril filtrieren
TFB2	0,1 g MOPS 3,8 mL 1M CaCl <sub>2</sub> 0,0375 g KCl 8,5 mL Glycerin 87 % 37,5 mL dH <sub>2</sub> O, steril filtrieren

**Tabelle 2.3:** Herstellung von Puffern

### 2.1.3 Nährmedien

Zur Anzucht von Bakterien wurden sowohl feste, als auch flüssige Nährmedien verwendet (Tab. 2.4). Dabei wurden für verschiedene Stämme und Versuche unterschiedliche Anzuchtbedingungen benötigt. Vor Gebrauch wurden die Lösungen nach Ph. Eur. 2005 autoklaviert. Empfindliche Substanzen wurden steril filtriert und im Anschluss hinzugegeben.

Nähragar/ Nährbouillon	Firma	Herstellungsprotokoll
Chinablau-Laktose-Agar	OXOID Ltd., Hampshire, England	35 g/L dH <sub>2</sub> O, autoklavieren
LB-Bouillon	Eigenherstellung	10 g Bacto Trypton, 5 g Hefe Extrakt, 10 g NaCl in 800 mL dH <sub>2</sub> O lösen, mit 1 N NaOH auf pH 7,4 einstellen, mit dH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen, autoklavieren
LB-Nähragar	Eigenherstellung	Siehe LB flüssig + 15 g Agar Agar
M9-Agar + Glukose	Eigenherstellung	10x M9-Salze: 5 g NaCl, 112,27 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O, 10 g NH <sub>4</sub> Cl, 30 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 750 mL dH <sub>2</sub> O hinzugeben und in gelöster Form den pH mit 10 N NaOH-Lösung auf 7,4 einstellen, auf 1 L dH <sub>2</sub> O auffüllen, autoklavieren. 18 g Agar Agar + 800 mL dH <sub>2</sub> O + 100 mL 10x M9-Salze, + 1 mL 1M MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O, + 0,1 mL 1M CaCl <sub>2</sub> , + 10 mL 20% D-Glukose × H <sub>2</sub> O, mit autoklaviertem dH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen.
Mueller Hinton Broth (Müller Hinton Bouillon)	Becton Dickinson, La Pont de Claix Frankreich	22 g/L dH <sub>2</sub> O, autoklavieren
SOB	Eigenherstellung	20 g Bacto Trypton, 0,58 g NaCl, 0,18 g KCl, 0,95 g MgCl <sub>2</sub> , 2,47 g MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O, 5 g Hefe Extrakt, auf 1 L mit dH <sub>2</sub> O auffüllen, autoklavieren
SOC	Eigenherstellung	5 g Hefe Extrakt,

## 2 Material und Methoden

Nähragar/ Nährbouillon	Firma	Herstellungsprotokoll
(SOC)		20 g Bacto Trypton, 0,58 g NaCl, 0,18 g KCl, 0,95 g MgCl <sub>2</sub> × 7H <sub>2</sub> O, 5,94 g MgSO <sub>4</sub> , 3,96 g D-Glukose × H <sub>2</sub> O, mit dH <sub>2</sub> O auf 1 L auffüllen, autoklavieren
Standard I-Nähragar (NI)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	37 g/L dH <sub>2</sub> O, autoklavieren
Standard I-Nährbouillon (NI)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	25 g/L dH <sub>2</sub> O, autoklavieren
Standard II-Nähragar (NII)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	siehe Abschnitt 2.2.1.2
Standard II-Nährbouillon (NII)	Merck KGaA, Darmstadt,	siehe Abschnitt 2.2.1.2

**Tabelle 2.4:** Die zur Anzucht der Bakterien verwendeten Nährmedien

### 2.1.4 Antibiotika und Chemotherapeutika

Die in Tabelle 2.5 aufgeführten antimikrobiellen Substanzen wurden zu Selektionszwecken, MHK-Bestimmungen oder Versuchen mit den Reportergensystemen eingesetzt. Die Herstellung erfolgte durch Lösen in einem geeigneten Lösungsmittel (Wasser, Ethanol) mit anschließender Sterilfiltration. Die eingesetzten Endkonzentrationen sind den Kapiteln 2 und 3 zu entnehmen.

Antibiotika und Chemotherapeutika	Firma	Gefahrensymbol, R-/S-Sätze
Ampicillin	Sigma Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland	Xn; R:36/37/38-42/43 S:22-26-36/37
Chloramphenicol	Sigma Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland	T; R45-46-63-42/43 S:45-36/37/39
Ciprofloxacin	Bayer Leverkusen AG Leverkusen, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
Gentamicin	Sigma Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland	Xn; R:42/43 S:22-45-36/37/39
Kanamycin	Sigma Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
Novobiocin	Sigma Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland	Xi; R:43; S:36

Antibiotika und Chemotherapeutika	Firma	Gefahrensymbol, R-/S-Sätze
Ofloxacin	Aventis Pharma GmbH Frankfurt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG
Tetracyclin	Sigma Aldrich Chemie Steinheim, Deutschland	Xn; R:22; S:22-36

Tabelle 2.5: Antibiotika und Chemotherapeutika

### 2.1.5 Kits und Systeme

In Tabelle 2.6 sind die verwendeten Kits und Systeme aufgelistet. Die Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen sind bei den jeweiligen Herstellerangaben nachzuschlagen.

Kits und Systeme	Puffer/Lösungen	Firma	Gefahrensymbol/ R- und S-Sätze
BigDye <sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Template Preparation Reagent	Ready Reaction Mix Sequencing Buffer Hi-Di <sup>™</sup> Formamid	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG Entfällt nach 67/548/EWG T; R:61; S:53-26-36/37/39-45
Luciferase Assay System	Luciferase Assay Substrate Luciferase Assay Puffer	Promega, Madison, USA	Entfällt nach 67/548/EWG Entfällt nach 67/548/EWG
Qiagen Plasmid Midi Kit	P1 P2 P3 QBT QC QF EB	Qiagen, Hilden, Deutschland	Entfällt nach 67/548/EWG Xi; R:36/38; S:13-26-36-46 Entfällt nach 67/548/EWG R:10 R:10 R:10 Entfällt nach 67/548/EWG
Qiaquick Gel Extraction Kit	QG PE	Qiagen, Hilden, Deutschland	Xn; R:20/21/22-32; S:13-26-36-46 Entfällt nach 67/548/EWG
Qiaquick PCR Purification Kit	PB PE	Qiagen, Hilden, Deutschland	Xn; R:10-22-36/38; S:13-23-26-36/37/39-46 Entfällt nach 67/548/EWG
RC DC Protein Assay	DC Reagent A DC Reagent S	Bio-Rad, Laboratories, Hercules CA,	C; R:34; S:20-26-36/37/39-45-60 S:60

## 2 Material und Methoden

---

Kits und Systeme	Puffer/Lösungen	Firma	Gefahrensymbol/ R- und S-Sätze
(RC DC Protein Assay)	DC Reagent B RC Reagent I  RC Reagent II	USA	Entfällt nach 67/548/EWG C; N, R:34-51/53; S:26-36/37/39-45-57-60 S:60

**Tabelle 2.6:** Liste der Kits und Systeme

### 2.1.6 Enzyme

In Tabelle 2.7 sind die verwendeten Enzyme aufgelistet.

Enzyme	Hersteller
Alkaline Phosphatase, Shrimp	Roche, Mannheim, Deutschland
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich, England
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs, Ipswich, England
DNA-Polymerase I, <i>Large</i> (Klenow) Fragment	New England Biolabs, Ipswich, England
<i>Eco</i> RI	New England Biolabs, Ipswich, England
<i>Eco</i> RV	New England Biolabs, Ipswich, England
Expand™ High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim, Deutschland
<i>Hind</i> III	New England Biolabs, Ipswich, England
Lysozym	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
<i>Nco</i> I	New England Biolabs, Ipswich, England
<i>Nhe</i> I	New England Biolabs, Ipswich, England
<i>Pst</i> I	New England Biolabs, Ipswich, England
<i>Pvu</i> I	New England Biolabs, Ipswich, England
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
RNase A	Qiagen, Hilden, Deutschland
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich, England
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, England
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Promega, Madison, USA
<i>Xba</i> I	New England Biolabs, Ipswich, England

**Tabelle 2.7:** Liste der verwendeten Enzyme

## 2.1.7 Oligonukleotide

Bezeichnung	Länge [bp]	Sequenz 5'→3'
acr1	29	<b>GCTCTGCAGAGATCTCATGAACAAATCCG</b> <i>Position: acrAB -328 - -308</i>
acr2	32	<b>GTTTTTGGCGTCTTCCATATGTAACCTCGAG</b> <i>Position: luc 18 - 1 acrAB -1 - -14</i>
acrR1	20	<b>CCGCAAGAATATCACGACGC</b> <i>Position: acrR 628 - 609</i>
acrR2b2	19	<b>ATGTAAACCTCGAGTGTCC</b> <i>Position: acrR -144 - -126</i>
KAAraP5'	27	<b>GTCGCTAGCGTGCCACCTGCATCGATT</b> <i>Position: araC 900 - 882</i>
KAAraPSOE3'	33	<b>GCGTCTGGACATCGTCATTTTTTATAACCTCCT</b> <i>Position: marA 18 - 1 araC -354 - -340</i>
KAmara3'	30	<b>GTCGCTAGCTCATGATTGCCTCAGTGACGT</b> <i>Position: marA 425 - 405</i>
KAmaraSOE5'	33	<b>AGGAGGTTATAAAAAATGACGATGTCCAGACGC</b> <i>Position: araC -340 - -354 marA 1 - 18</i>
marR3R4	20	<b>ACTCGAAGCCATATCGTTCT</b> <i>Position: marR 716 - 697</i>
marR5R4	20	<b>CGGCACTGTTTCATGTTGCCT</b> <i>Position: marR -327 - -308</i>
luc3-3	28	<b>GTCCTGCAGTCGGAGGATTACAATAGCT</b> <i>Position: luc 1705 - 1687</i>
luc5	32	<b>CTCGAGGTTTACATATGGAAGACGCCAAAAAC</b> <i>Position: acrAB -14 - -1 luc 1 - 18</i>
luc5-B-1	34	<b>AACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAG</b> <i>Position: luc 60 - 93</i>
lucef5	28	<b>TTGAGGAATAGTAATGGAAGACGCCAAA</b> <i>Position: acrEF -13 - -1 luc 1 - 15</i>
LUC-I-1	21	<b>GATTCTCGCATGCCAGAGATC</b> <i>Position: luc 653 - 73</i>
LUC-I-2	21	<b>GGCTCACTGAGACTACATCAG</b> <i>Position: luc 1022 - 1042</i>
lucM_5'	23	<b>TCACTGCATACGACGATTCTGTG</b> <i>Position: luc 248 - 226</i>
LUC-M-2	23	<b>CACAGAATCGTCGTATGCAGTGA</b> <i>Position: luc 226 - 248</i>
luc_03'	23	<b>TGGAATCGATATTGTTACAACAC</b> <i>Position: luc 1361 - 1383</i>
pacrEF3	28	<b>TTTGGCGTCTTCCATACTATTCTCAA</b> <i>Position: luc 15 - 1 acrEF -1 - -13</i>
pacrEF5	30	<b>GCTCTGCAGTAGATAGCGCCACGCGTAACG</b> <i>Position: acrEF -544 - -524</i>
pacrEF-Ia5'	21	<b>TAGATAGCGCCACGCGTAACG</b> <i>Position: acrEF -544 - -524</i>
pacrEF-Ib5'	20	<b>TCGTCTTGCTTACGCCATGC</b> <i>Position: acrEF -495 - -476</i>
pacrEF-IIa3'	20	<b>CCTGCGGTTACCGACGTGA</b> <i>Position: acrEF 115 - 96</i>
pacrEF-IIb3'	22	<b>GCACATCGCTGCCTTCAGTGAA</b> <i>Position: acrEF 259 - 238</i>

Tabelle 2.8: Primer-Liste: braun→Restriktionsschnittstellen, rot→*luc*, blau→*pacrAB*, grün→*pacrEF*, orange→*marA*, gelb→*araC-paraB*

## 2 Material und Methoden

In Tabelle 2.8 sind die Bezeichnungen der verwendeten *Primer*, deren Länge, Sequenz und Lage angegeben. Des Weiteren sind einige, für die Klonierungen interessanten Bereiche farblich markiert. Mit Ausnahme der in unserem Labor synthetisierten *Primer* *pacrEF-la5'*, *pacrEF-lb5'*, *pacrEF-IIa3'* und *pacrEF-IIb3'*, wurden die *Primer* von Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland) hergestellt.

### 2.1.8 Vektoren

In Tabelle 2.9 sind die verwendeten Plasmidvektoren unter Angabe ihrer Funktion, ihrer relevanten genetischen Marker und ihrer Herkunft aufgeführt.

Plasmid	Größe [bp]	Genetische Marker	Herkunft/Referenz
pACYC184	4245	CLM <sup>r</sup> , TC <sup>r</sup>	New England Biolabs Ipswich, England
pBP507	9198	GENT <sup>r</sup> , AMI <sup>r</sup> , KAN <sup>r</sup> , Mob+, Tra-	Heisig, 1993
pBP591	9013	GENT <sup>r</sup> , AMI <sup>r</sup> , KAN <sup>r</sup> , Mob+, Tra-, <i>pbla-marR</i>	Hüllen & Heisig 1998
pBR322	4362	AMP <sup>r</sup> , TC <sup>r</sup>	Bolivar et al., 1977
pBR322-luc	6061	AMP <sup>r</sup> , TC <sup>r</sup> , <i>luc</i>	Abu Mraheil & Heisig 1999
pGEM-luc	4933	TC <sup>r</sup> , <i>luc</i>	Promega, Madison, USA
pKD4	3267	KAN <sup>r</sup>	Datsenko & Wanner, 2000
pKD46	6329	<i>araC-paraB</i> , $\gamma$ , $\beta$ , <i>exo</i> , AMP <sup>r</sup>	Datsenko & Wanner, 2000
pPHB1838	5921	TC <sup>r</sup> , <i>araC-paraB-marA</i>	Diese Arbeit
pPHB331	6400	TC <sup>r</sup> , <i>pacrAB-luc</i>	Diese Arbeit
pPHB333	6616	TC <sup>r</sup> , <i>pacrEF-luc</i>	Diese Arbeit
pPHB335	7805	KAN <sup>r</sup> , <i>pacrAB-luc</i>	Diese Arbeit
pPHB338	6045	AMP <sup>r</sup> , <i>araC-paraB-marA</i>	Diese Arbeit

**Tabelle 2.9:** Liste der Plasmidvektoren

Nomenklatur der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide: p = Plasmid; PHB = Abt. für Pharm. Biologie & Mikrobiologie; 1.Zahl = Bezeichnung des Ausgangsvektors: 3 für pBR322, 18 für pACYC184; 2.Zahl = Projekte von Nina Matthiessen (3); 3.Zahl = Schlüssel für die Inserte: 1 für *pacrAB-luc*, 3 für *pacrEF-luc*, 5 für *pacrAB-luc* + KAN<sup>r</sup>, 8 für *araC-paraB*.

## 2.1.9 Bakterienstämme

In Tabelle 2.10 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme aufgeführt unter zusätzlicher Angabe der genetischen Marker sowie der Herkunft bzw. Referenz.

Spezies	Stamm	Genetische Marker/Mutationen	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i>	4917 (GK 242)	<i>gyrA</i> S83W, <i>parC</i> G78D, $\Delta$ <i>acrR</i>	Krasmann, Bayer AG
<i>E. coli</i>	AG100 (GK 1071)	<i>argE3</i> , <i>thi3</i> , <i>rpsL</i> , <i>supE44</i> , $\Delta$ <i>gal</i>	S.B. Levy
<i>E. coli</i>	AG102 (GK 1295)	wie AG100, <i>marR</i> G77T	S.B. Levy
<i>E. coli</i>	C600SN (GK 119)	<i>thr1</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi1</i> , <i>lacY</i> , <i>tonA</i> , <i>supE44</i> , <i>hsdR</i> , <i>rpsL</i> , <i>recA</i> , <i>gyrAR</i>	Heisig & Wiedemann, 1991
<i>E. coli</i>	DH5 $\alpha$ (GK 409)	F-, 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ), U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ - <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Gibco-BRL
<i>E. coli</i>	HW2 (GK 1102)	<i>gyrA</i> S83L, <i>marR</i> E31stop	Wetzstein, Bayer AG
<i>E. coli</i>	HW58 (GK 1103)	<i>marR</i> $\Delta$ 20bp(39-45), stop59	Wetzstein, Bayer AG
<i>E. coli</i>	HW75 (GK 1136)	<i>marR</i> ::13bp(85-89), stop85	Wetzstein, Bayer AG
<i>E. coli</i>	HW83 (GK 1137)	<i>gyrA</i> S83L, <i>marR</i> $\Delta$ 13bp(80-85), stop98	Wetzstein, Bayer AG
<i>E. coli</i>	HW85 (GK 1138)	<i>marR</i> $\Delta$ 34bp(6-17), stop60	Wetzstein, Bayer AG
<i>E. coli</i>	HW96 (GK 1139)	<i>marR</i> L64stop	Wetzstein, Bayer AG
<i>E. coli</i>	JM83 (GK 56)	<i>araD</i> ( <i>lac-proAB</i> ), <i>rpsL</i> , <i>thi</i> ,	Vieira, Messing 1982
<i>E. coli</i>	JTT1 (GK 711)	Wildtyp	Sternglanz et al. 1981
<i>E. coli</i>	KD112 (GK 712)	<i>gyrB226</i>	Steck et al. 1993
<i>E. coli</i>	KM-F (GK 1296)	$\Delta$ (AS50), V96E	S.B. Levy
<i>E. coli</i>	KM-F-KO (GK 1303)	$\Delta$ ( <i>mar</i> -Operon)	S.B. Levy
<i>E. coli</i>	MG1655 (GK 2110)	Wildtyp	Jensen 1993
<i>E. coli</i>	MG1655- $\Delta$ <i>acrAB</i> (GK 2111)	$\Delta$ <i>acrAB</i> , Tn903:: <i>kan</i>	Potrykus et al. 2002
<i>E. coli</i>	MG1655- $\Delta$ <i>acrEF</i> (GK 2112)	$\Delta$ <i>acrEF</i> , Tn903:: <i>kan</i>	Potrykus et al. 2002
<i>E. coli</i>	MI (GK 572)	<i>gyrA</i> S83L	Tschorny & Heisig 1994
<i>E. coli</i>	MII (GK 573)	<i>gyrA</i> S83L, <i>marR</i> $\Delta$ 175	Tschorny & Heisig 1994
<i>E. coli</i>	MIII (GK 574)	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>parC</i> S80I, <i>marR</i> $\Delta$ 74	Tschorny & Heisig 1994
<i>E. coli</i>	MIII300 (GK 733)	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>parC</i> S80I, <i>marR</i> $\Delta$ 74	Schulte & Heisig 2001

## 2 Material und Methoden

Spezies	Stamm	Genetische Marker/Mutationen	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i>	MIII300S16 (GK 755)	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>parC</i> S80I, <i>marR</i> Δ74, <i>marA</i> I58N	Schulte & Heisig 2001
<i>E. coli</i>	MIVa (GK 575)	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>parC</i> S80I, <i>marR</i> Δ74	Tschorny & Heisig 1994
<i>E. coli</i>	MIVa300 (GK 734)	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>parC</i> S80I, <i>marR</i> Δ74	Schulte & Heisig 2001
<i>E. coli</i>	MIVa300S32 (GK 756)	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>parC</i> S80I, <i>marR</i> Δ74 <i>marA</i> N21Y	Schulte & Heisig 2001
<i>E. coli</i>	RS2 (GK 713)	<i>topA</i> 10	Sternglanz et al. 1981
<i>E. coli</i>	S17-1 (GK 658)	enthält defektes RP4-Plasmid chromosomal integriert (Φ80Δ( <i>lacZ</i> )M15)	Pühler et al., Bio Technology
<i>E. coli</i>	WT (GK 571)	Wildtyp, klinisches Isolat	Tschorny & Heisig 1994
<i>E. coli</i>	WT3-1 (GK 796)	<i>gyrA</i> S83L, D87G	Bagel & Heisig, 1999
<i>E. coli</i>	WT3-1-M21 (GK 902)	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>marR</i> Δ80	Heisig
<i>E. coli</i>	WT3-1-M26 (GK 901)	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>marR</i> A53P	Heisig
<i>E. coli</i>	WT3-1-M27 (GK 906)	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>marR</i> L33P	Heisig
<i>E. coli</i>	WT3-1-MB2 (GK 927)	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>parC</i> S80I	Heisig
<i>E. coli</i>	WT3-1-MB13 (GK 936)	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>parC</i> E84K	Heisig
<i>E. coli</i>	WT3-1-MB21 (GK 938)	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>marO</i> ::19bp	Heisig
<i>E. coli</i>	WT3-1-MB33 (GK 942)	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>parC</i> G78D	Heisig
<i>E. coli</i>	WT3-2 (GK 643)	<i>gyrA</i> D87G	Hüllen & Heisig 1998
<i>E. coli</i>	WT4 (GK 1347)	<i>parC</i> S80I	Wetzstein, Bayer AG
<i>Salmonella</i> Hadar	D (GK 772)	Wildtyp, klinisches Isolat	Dr. W. Rabsch, Robert-Koch-Institut, Wernigerode,
<i>Salmonella</i> Hadar	D1b (GK 726)	<i>gyrA</i> D87Y	Hansen & Heisig 2000
<i>Salmonella</i> Hadar	D1b4a2 [70]	<i>gyrA</i> D87Y	Hansen & Heisig 2000
<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	M415 [172]	Wildtyp	Dr. W. Rabsch, Robert-Koch-Institut, Wernigerode,
<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	TAD <i>Salmonella</i> vacT [172]	<i>gyrA</i> W59R, G75A, D87G, A866S	Lohmann Animal Health, Cuxhaven,

Spezies	Stamm	Genetische Marker/Mutationen	Herkunft/Referenz
<i>Salmonella typhimurium</i>	vacT Enro1 [70, 172]	<i>gyrA</i> W59R, G75A, D87G, A866S	Hansen & Heisig 2000

Tabelle 2.10: Liste der Bakterienstämme mit Angabe der Glycerinkulturnummer (GK)

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Anlegen von Dauerkulturen

Um Bakterienstämme als Reinkulturen über einen längeren Zeitraum lagern zu können, wurden, unter Anwendung von zwei verschiedenen Methoden, Dauerkulturen angelegt.

#### 2.2.1.1 Glycerinkulturen

Bei Glycerinkulturen wird ausgenutzt, dass durch Tiefgefrieren der Stoffwechsel der Bakterien drastisch reduziert oder zum Stillstand gebracht und dadurch die Überlebensdauer wesentlich erhöht wird. So kann eine hohe genetische Stabilität der Zellen und eine gute Konstanz ihrer Merkmale über lange Zeiträume hinweg garantiert werden [21].

Von einer Agarplatte wurden zwei bis fünf Kolonien mit einem sterilen Glasstab abgenommen und in ein Mikroröhrchen mit Schraubverschluss überführt und suspendiert. Dieses Probenröhrchen enthielt eine Mischung aus Standard-I-Nährbouillon (NI) und Glycerin 87 % im Verhältnis 1:1 sowie Glasperlen. Die Glasperlen dienten zum Einen der Adhäsion der Zellen und zum Anderen der Verbesserung des Einfrierprozesses. Nach einer Inkubationszeit von ca. 30 min wurde das Medium abpipettiert, das Probenröhrchen in einem Kryoblock schockgefroren und bei -80°C gelagert. Durch die Glasperlen besteht des Weiteren der Vorteil der einfachen Entnahme zum Reaktivieren der Zellen unter Vermeidung von zu häufigem Wiederauftauen.

#### 2.2.1.2 Stichkulturen

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen Impfspitze von einer frisch überimpften Agarplatte abgenommen und in einen Weichagar (10 mg Standard-II-Nähragar, 3 mg Standard-II-Nährbouillon und 1 mL Aqua dest.) eingebracht. Diese Stichkultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei RT gelagert.

### 2.2.2 KBE-Bestimmung

Die KBE (**K**olonie **b**ildende **E**inheit) gibt die Anzahl an Zellen an, die nach wiederholter Zellteilung eine Kolonie bilden können. Mit Hilfe der im Folgenden beschriebenen KBE-Bestimmung wurden Bakteriensuspensionen, bei bestimmten optischen Dichten, in Erwartung einer entsprechenden Keimzahl, untersucht.

Nach Entnahme von 100  $\mu\text{L}$  aus den verschiedenen Versuchsansätzen wurden jeweils dekadische Verdünnungsreihen in steriler, 0,9 %iger NaCl-Lösung hergestellt. Anschließend wurden Standard-I-Nähragarplatten mit 100  $\mu\text{L}$  aus diesen Verdünnungsstufen im Spatelverfahren beimpft und bei 37°C über Nacht (ca. 20 h) inkubiert. Dabei wurden die Verdünnungsstufen so gewählt, dass eine Kolonienzahl von etwa 1-100 pro Platte erhalten werden konnte, um Fehler bei der Auszählung möglichst klein zu halten. Zur Berechnung der KBE/mL wurde folgende Gleichung benutzt:

$$KBE/mL = \frac{\text{Kolonienzahl}}{\text{Verdünnungsstufe} \times \text{Volumen [mL]}}$$

### 2.2.3 MHK-Bestimmung

Unter der MHK (**m**inimale **H**emmkonzentration) versteht man die Antibiotikumkonzentration, bei der nach Bebrütung unter definierten Bedingungen gerade kein sichtbares Wachstum mehr zu erkennen ist. Die Bestimmung der MHK wurde nach dem Standardverfahren des CLSI (**C**linical and **L**aboratory **S**tandards **I**nstitute) mittels Mikrodilution durchgeführt [150].

Zunächst wurden 50  $\mu\text{L}$  des Mediums (Müller Hinton Bouillon, LB) in die Vertiefungen 1-10 und 12 (Reihe einer 96er Mikrotiterplatte) pipettiert. Anschließend wurden ausgehend von Vertiefung 11, in die 100  $\mu\text{L}$  Antibiotikum-Lösung vorgelegt wurde, durch serielle 1:2 Verdünnung absteigende Antibiotikumkonzentrationen hergestellt. Vertiefung 12 sollte als Wachstumskontrolle dienen. Die Einstellung der erforderlichen Menge Inokulum von  $5 \times 10^5$  KBE/mL wurde erreicht, indem der McFarland-Standard verwendet wurde. Hierbei wurden Kolonien der Bakterienkultur von einer über Nacht bebrüteten Agarplatte mit einem sterilen Glasstab abgenommen und in 0,9 %iger NaCl-Lösung suspendiert. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm mit einem Spektralphotometer bestimmt und sollte  $0,120 \pm 0,025$  betragen. Dies entspricht einer Keimzahl von ungefähr  $1 \times 10^8$  KBE/mL. Die so erhaltene Suspension wurde 1:100 in Nährbouillon (Müller Hinton Bouillon, LB) verdünnt, so dass letztendlich eine Keimzahl von etwa  $1 \times 10^6$  KBE/mL eingesetzt werden konnte. Dabei wurden 50  $\mu\text{L}$  dieser Bakteriensuspension in die Vertiefungen 1-12 überführt. Nach 18-20 h Bebrütung bei 37°C wurde die Mikrotiterplatte ausgewertet.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden: DNA

### 2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden

Die Konzentrationsbestimmung von DNA beruht auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm. Die Messung der wässrigen Oligonukleotidlösungen erfolgte mittels Spektralphotometer in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Eine Lösung, die 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doppelsträngige DNA enthält, besitzt unter diesen Bedingungen einen Absorptionswert von 1. Dieser sogenannte OD-Wert (**O**ptische **D**ichte) dient zur Bestimmung der Konzentration der unbekanntes DNA-Lösung. Nicht basengepaarte Nukleinsäuren besitzen eine höhere Absorption, ein Effekt, der als Hyperchromie bezeichnet wird. Daher kann die photometrische Bestimmung von Oligonukleotidkonzentrationen über die Annäherungswerte einzelsträngiger DNA oder aber - bei bekannter Sequenz - aus der Summe der molaren Absorptionskoeffizienten der Basen des Oligonukleotids erfolgen [122]. Die Konzentration der *Primer*-Lösungen wurde unter Anwendung der folgenden Formel berechnet [143]:

$$c[\mu\text{g}/\text{mL}] = OD_{260} \times V \times F \quad c[\mu\text{mol}/\text{mL}] = \frac{OD_{260} \times V \times F}{M_w \times L}$$

- $OD_{260}$ : optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge
- $V$ : Verdünnungsfaktor
- $F$ : Multiplikationsfaktor (50 für doppelsträngige DNA, 20 für einzelsträngige Oligonukleotide)
- $L$ : Länge in kb
- $M_w$ : Molekulargewicht je Base (330 g/mol) bzw. Basenpaar (660 g/mol)

Mit dem entsprechenden Annäherungswert gilt für Oligonukleotide:

$$c[\mu\text{mol}/\text{mL}]_{\text{Oligonukleotid}} = \frac{OD_{260} \times V}{10 \times L}$$

oder genauer

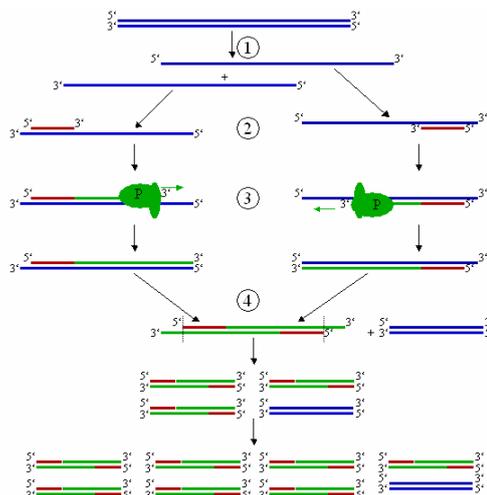
$$\frac{OD_{260} \times V}{(15 \times A + 7,1 \times C + 12 \times G + 8,4 \times T)}$$

### 2.3.2 Gewinnung bakterieller genomischer DNA: Kochmethode

Mit einem sterilen Glasstab wurden zwei bis fünf Kolonien von einer Agarplatte abgenommen und in 100  $\mu\text{L}$  demineralisiertem Wasser mittels vortexen resuspendiert. Anschließend wurde die Probe 15 min bei 100°C inkubiert und wieder auf RT abgekühlt. Nach Zentrifugation für 5 min, bei 13.000 rpm und RT, konnte der Überstand in ein sauberes Gefäß überführt werden. Die so gewonnene genomische DNA wurde bei -20°C gelagert und direkt für nachfolgende Versuche (PCR) eingesetzt.

### 2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Im Jahre 1983 wurde von K.B. Mullis eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten entwickelt [189]. Hierbei werden zunächst, ausgehend von einer bekannten DNA-Sequenz, zwei, den zu amplifizierenden Bereich flankierende, Oligonukleotide (*Primer*) abgeleitet, von denen einer komplementär zum kodierenden (*sense*), der andere komplementär zum nicht kodierenden (*anti-sense*) Strang ist. Nach Denaturierung der doppelsträngigen Matrizen-DNA (Template) hybridisieren diese *Primer* mit dem jeweiligen Einzelstrang (*Annealing*). Ausgehend von den angelagerten *Primern* erfolgt durch die DNA-Polymerase die DNA-Synthese (Extension). Anschließend wird wieder eine Denaturierung durchgeführt und ein erneutes *Annealing* ermöglicht, so dass die DNA-Fragmente exponentiell bis zum Erreichen eines Plateaus amplifiziert werden (Abb. 2.1) [122].



**Abbildung 2.1:** Schema der Polymerase-Kettenreaktion: 1) Denaturierung bei z.B. 95°C, 2) *Annealing* bei der optimalen Anlagerungstemperatur, 3) Extension bei der für die DNA-Polymerase optimalen Temperatur, 4) Ende des ersten Zyklus [1]

Für PCR-Standardanwendungen wurde entweder die *Taq*-DNA-Polymerase oder das Expand™ High Fidelity PCR System verwendet (Tab. 2.7). Der wesentliche Unterschied besteht in der *proofreading*-Funktion im Expand™ High Fidelity PCR System, da hier zusätzlich zur *Taq*- noch die *Pwo*-DNA-Polymerase, die eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität besitzt, vorhanden ist (siehe Angaben des Herstellers). Die eingesetzten hitzestabilen DNA-Polymerasen benötigen für ihre Funktion freie divalente Kationen, wie z.B. Mg<sup>2+</sup>. Die Mg<sup>2+</sup>-Ionen werden jedoch auch von dNTPs, *Primern* und eventuell vorhandenem EDTA gebunden [143], so dass für jedes PCR-Protokoll die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration optimiert wurde. Die eingesetzten Konzentrationen für die *Primer*, dNTPs und das Template ergaben sich aus den empfohlenen Standardbedingungen der Enzym-Hersteller. Zur Ermittlung der optimalen *Annealing*-Temperatur wurden Temperatur-Gradienten verwendet. Ausgegangen wurde vorab in der Regel von einer vereinfachten Berechnung für die Schmelztemperatur:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G und C}) + 2 \times (\text{Anzahl A und T})$$

In den Tabellen 2.11-2.16 sind die Protokolle für die Amplifikation der DNA-Fragmente *pacrAB*, *pacrEF*, *luc* mit den entsprechenden Überhängen, *marA* und *araC-paraB*, die im Folgenden für die Konstruktion der Plasmide pPHB331, pPHB335, pPHB333, pPHB338 und pPHB1838 eingesetzt wurden, angegeben. Des Weiteren sind in den Tabellen 2.18-2.19 die PCR-Protokolle für *pacrEF*, *acrR*, und *marR* angegeben, die nach Aufreinigung für die Sequenzierung verwendet wurden. Für die anschließende Sequenzierung von *marA* wurde ebenfalls das in Tabelle 2.15 beschriebene Protokoll verwendet.

Reaktionsansatz (50 µL)	Methode
5 µL 10x Puffer	Initial-Denaturierung: 95°C 3 min
3 µL MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	
5 µL 5'- <i>Primer</i> : <i>acr1</i> [2 pmol/µL]	Denaturierung: 95°C 45 s
5 µL 3'- <i>Primer</i> : <i>acr2</i> [2 pmol/µL]	<i>Annealing</i> : 51°C 30 s
5 µL Template: genomische DNA	Extension: 72°C 2 min
aus WT ca. 50 - 100 ng/µL	30 Zyklen
1,25 µL dNTPs [2 mM]	
0,25 µL <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Final-Extension: 72°C 5 min
25,5 µL dH <sub>2</sub> O	Abschluss: 4°C Pause

**Tabelle 2.11:** PCR-Protokoll: Amplifikation von *pacrAB* mit passenden Überhängen zu *luc* (355 bp)

## 2 Material und Methoden

Reaktionsansatz (50 $\mu\text{L}$ )	Methode
5 $\mu\text{L}$ 10x Puffer	Initial-Denaturierung: 95°C 5 min
4 $\mu\text{L}$ $\text{MgCl}_2$ [25 mM]	
5 $\mu\text{L}$ 5'-Primer: luc5 [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ]	Denaturierung: 95°C 45 s
5 $\mu\text{L}$ 3'-Primer: luc3-3 [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ]	Annealing: 48°C 30 s
2 $\mu\text{L}$ Template: pGEM-luc	Extension: 72°C 3 min
von Promega ca.50 - 300 ng/ $\mu\text{L}$	30 Zyklen
1,25 $\mu\text{L}$ dNTPs [2 mM]	
0,25 $\mu\text{L}$ Taq-DNA-Polymerase	Final-Extension: 72°C 5 min
27,5 $\mu\text{L}$ $\text{dH}_2\text{O}$	Abschluss: 4°C Pause

**Tabelle 2.12:** PCR-Protokoll: Amplifikation von *luc* mit passenden Überhängen zu *pacrAB* (1718 bp)

Reaktionsansatz (50 $\mu\text{L}$ )	Methode
5 $\mu\text{L}$ 10x Puffer	Initial-Denaturierung: 95°C 4 min
enthält $\text{MgCl}_2$ [15 mM]	
5 $\mu\text{L}$ 5'-Primer: pacrEF5 [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ]	Denaturierung: 95°C 45 s
5 $\mu\text{L}$ 3'-Primer: pacrEF3 [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ]	Annealing: 45°C 30 s
5 $\mu\text{L}$ Template: genomische DNA	Extension: 72°C 3 min
aus WT ca. 50 - 100 ng/ $\mu\text{L}$	30 Zyklen
1,25 $\mu\text{L}$ dNTPs [2 mM]	
0,75 $\mu\text{L}$ Expand <sup>TM</sup> High Fidelity PCR System	Final-Extension: 72°C 5 min
28 $\mu\text{L}$ $\text{dH}_2\text{O}$	Abschluss: 4°C Pause

**Tabelle 2.13:** PCR-Protokoll: Amplifikation von *pacrEF* mit passenden Überhängen zu *luc* (550 bp)

Reaktionsansatz (50 $\mu\text{L}$ )	Methode
5 $\mu\text{L}$ 10x Puffer	Initial-Denaturierung: 95°C 4 min
enthält $\text{MgCl}_2$ [15 mM]	
5 $\mu\text{L}$ 5'-Primer: lucef5 [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ]	Denaturierung: 95°C 45 s
5 $\mu\text{L}$ 3'-Primer: luc3-3 [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ]	Annealing: 46°C 30 s
2 $\mu\text{L}$ Template: pGEM-luc	Extension: 72°C 3 min
von Promega ca.100 - 300 ng/ $\mu\text{L}$	30 Zyklen
1,25 $\mu\text{L}$ dNTPs [2 mM]	
0,75 $\mu\text{L}$ Expand <sup>TM</sup> High Fidelity PCR System	Final-Extension: 72°C 5 min
31 $\mu\text{L}$ $\text{dH}_2\text{O}$	Abschluss: 4°C Pause

**Tabelle 2.14:** PCR-Protokoll: Amplifikation von *luc* mit den passenden Überhängen zu *pacrEF* (1720 bp)

Reaktionsansatz (50 $\mu\text{L}$ )	Methode
5 $\mu\text{L}$ 10x Puffer enthält $\text{MgCl}_2$ [15 mM] 5 $\mu\text{L}$ 5'-Primer: KAmarASOE5' [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ] 5 $\mu\text{L}$ 3'-Primer: KAmarA3' [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ] 5 $\mu\text{L}$ Template: genomische DNA aus WT ca. 50 - 100 ng/ $\mu\text{L}$ 1,25 $\mu\text{L}$ dNTPs [2 mM] 0,25 $\mu\text{L}$ Taq-DNA-Polymerase 28,5 $\mu\text{L}$ dH <sub>2</sub> O	Initial-Denaturierung: 95°C 4 min  Denaturierung: 95°C 45 s Annealing: 55°C 30 s Extension: 72°C 3 min 30 Zyklen  Final-Extension: 72°C 5 min Abschluss: 4°C Pause

**Tabelle 2.15:** PCR-Protokoll: Amplifikation von *marA* (mit passenden Überhängen zu *araC-paraB*) (450 bp); bei Verwendung von *marA*, für die anschließende SOEing-PCR wurden 0,75  $\mu\text{l}$  Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System sowie 1,25  $\mu\text{l}$  dNTPs [10 mM] eingesetzt.

Reaktionsansatz (50 $\mu\text{L}$ )	Methode
5 $\mu\text{L}$ 10x Puffer enthält $\text{MgCl}_2$ [15 mM] 5 $\mu\text{L}$ 5'-Primer: KAAraP5' [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ] 5 $\mu\text{L}$ 3'-Primer: KAAraPSOE3' [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ] 1 $\mu\text{L}$ Template: pKD46 von Promega ca.100 - 300 ng/ $\mu\text{L}$ 1,25 $\mu\text{L}$ dNTPs [10 mM] 0,75 $\mu\text{L}$ Expand <sup>TM</sup> High Fidelity PCR System 31,75 $\mu\text{L}$ dH <sub>2</sub> O	Initial-Denaturierung: 95°C 4 min  Denaturierung: 95°C 45 s Annealing: 50°C 30 s Extension: 72°C 3 min 30 Zyklen  Final-Extension: 72°C 5 min Abschluss: 4°C Pause

**Tabelle 2.16:** PCR-Protokoll: Amplifikation von *araC-paraB* mit den passenden Überhängen zu *marA* (1300 bp)

Reaktionsansatz (50 $\mu\text{L}$ )	Methode
5 $\mu\text{L}$ 10x Puffer 3 $\mu\text{L}$ $\text{MgCl}_2$ [25 mM] 5 $\mu\text{L}$ 5'-Primer: acrR1 [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ] 5 $\mu\text{L}$ 3'-Primer: acrR2b2 [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ] 5 $\mu\text{L}$ Template: genomische DNA aus WT ca. 50 - 100 ng/ $\mu\text{L}$ 2 $\mu\text{L}$ dNTPs [2 mM] 0,25 $\mu\text{L}$ Taq-DNA-Polymerase 24,75 $\mu\text{L}$ dH <sub>2</sub> O	Initial-Denaturierung: 95°C 4 min  Denaturierung: 95°C 45 s Annealing: 50°C 30 s Extension: 72°C 2 min 30 Zyklen  Final-Extension: 72°C 5 min Abschluss: 4°C Pause

**Tabelle 2.17:** PCR-Protokoll: Amplifikation von *acrR* (869 bp)

## 2 Material und Methoden

---

Reaktionsansatz (50 $\mu\text{L}$ )	Methode
5 $\mu\text{L}$ 10x Puffer 3 $\mu\text{L}$ $\text{MgCl}_2$ [25 mM] 5 $\mu\text{L}$ 5'-Primer: 1. und 2. <i>pacrEF-Ia5'</i> [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ] 3. <i>pacrEF-Ib5'</i> [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ] 5 $\mu\text{L}$ 3'-Primer: 1. und 3. <i>pacrEF-IIa3'</i> [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ] 2. <i>pacrEF-IIb3'</i> [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ] 5 $\mu\text{L}$ Template: genomische DNA aus WT ca. 50 - 100 ng/ $\mu\text{L}$ 2 $\mu\text{L}$ dNTPs [2 mM] 0,25 $\mu\text{L}$ <i>Taq</i> -DNA-Polymerase 24,75 $\mu\text{L}$ $\text{dH}_2\text{O}$	Initial-Denaturierung: 95°C 4 min  Denaturierung: 95°C 45 s <i>Annealing</i> : 1. und 2. 66°C 30 s 3. 61°C 30 s Extension: 72°C 2 min 30 Zyklen  Final-Extension: 72°C 5 min Abschluss: 4°C Pause

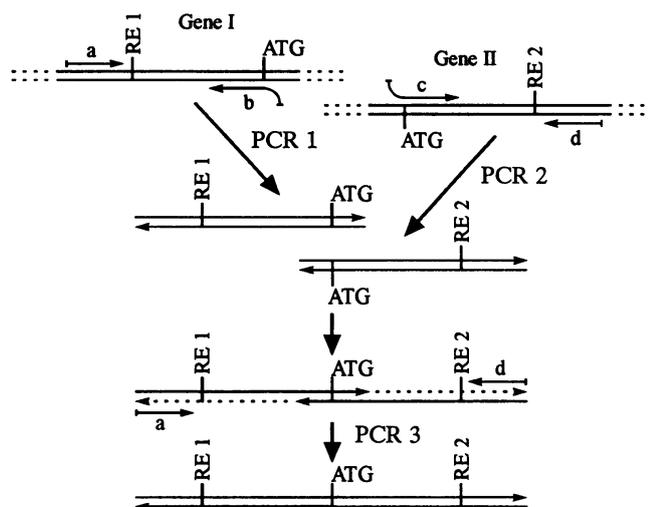
**Tabelle 2.18:** PCR-Protokoll: Amplifikation von *pacrEF* (1. 659 bp, 2. 803 bp, 3. 610 bp)

Reaktionsansatz (50 $\mu\text{L}$ )	Methode
5 $\mu\text{L}$ 10x Puffer enthält $\text{MgCl}_2$ [15 mM] 5 $\mu\text{L}$ 5'-Primer: <i>marR5R4</i> [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ] 5 $\mu\text{L}$ 3'-Primer: <i>marR3R4</i> [2 pmol/ $\mu\text{L}$ ] 5 $\mu\text{L}$ Template: genomische DNA aus WT ca. 50 - 100 ng/ $\mu\text{L}$ 1,25 $\mu\text{L}$ dNTPs [2 mM] 0,25 $\mu\text{L}$ <i>Taq</i> -DNA-Polymerase 33,5 $\mu\text{L}$ $\text{dH}_2\text{O}$	Initial-Denaturierung: 95°C 4 min  Denaturierung: 95°C 45 s <i>Annealing</i> : 50°C 30 s Extension: 72°C 2 min 30 Zyklen  Final-Extension: 72°C 5 min Abschluss: 4°C Pause

**Tabelle 2.19:** PCR-Protokoll: Amplifikation von *marR* (1042 bp)

## 2.3.4 SOEing-PCR (splicing by overlap extension-PCR)

Die PCR bietet auch die Möglichkeit, zwei DNA-Fragmente miteinander zu verbinden. Zunächst werden die beiden Fragmente unabhängig voneinander amplifiziert. Dabei werden die *Primer* so gewählt, dass am 5'-Ende des einen DNA-Fragments eine überhängende Sequenz komplementär zum 3'-Ende des zweiten DNA-Fragments entsteht und umgekehrt. In dem folgenden PCR-Ansatz werden beide Amplimere vereinigt, wodurch diese nach Denaturierung, über die eingeführten komplementären Sequenzen, zu einem Hybrid renaturieren. Ausgehend von diesem Hybrid kann durch DNA-Synthese ein Doppelstrang über den kompletten Bereich beider DNA-Fragmente synthetisiert werden. Schließlich kann durch die *Primer*, die an den Enden des Hybrid-Moleküls binden, in einer konventionellen PCR das verknüpfte Molekül amplifiziert werden (Abb. 2.2) [42].



**Abbildung 2.2:** Schema der SOEing-PCR [68]: b/c: *Primer* mit den überlappenden Bereichen, a/d: äußere *Primer*

Die verwendeten SOEing-PCR-Protokolle sind in den Tabellen 2.20-2.22 aufgeführt. Die überlappenden Bereiche der eingesetzten *Primer* können der Tabelle 2.8 entnommen werden.

## 2 Material und Methoden

<b>Reaktionsansatz 1 (50 <math>\mu</math>L)</b>	<b>Methode 1</b>
2 $\mu$ L <i>pacrAB</i> 9 $\mu$ L <i>luc</i> ca. im Verhältnis 1,5:1 bis 3:1, Endkonz.: 100-200 ng/ $\mu$ L 5 $\mu$ L 10x Puffer 3 $\mu$ L MgCl <sub>2</sub> [25 mM] 1,25 $\mu$ L dNTPs [10 mM] 0,75 $\mu$ L Expand <sup>TM</sup> High Fidelity PCR System 29 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O	Initial-Denaturierung: 95°C 5 min  Denaturierung: 95°C 45 s <i>Annealing</i> : 72°C 30 s Extension: 72°C 3 min 7 Zyklen Final-Extension: 72°C 5 min Abschluss: 4°C Pause
<b>Reaktionsansatz 2 (90 <math>\mu</math>L)</b>	<b>Methode 2</b>
10 $\mu$ L Template aus Reaktionsansatz 1/ Methode 1 9 $\mu$ L 10x Puffer 5,4 $\mu$ L MgCl <sub>2</sub> [25 mM] 10 $\mu$ L 5'- <i>Primer</i> : <i>acr1</i> [2 pmol/ $\mu$ L] 10 $\mu$ L 3'- <i>Primer</i> : <i>luc3-3</i> [2 pmol/ $\mu$ L] 2,25 $\mu$ L dNTPs [10 mM] 0,75 $\mu$ L Expand <sup>TM</sup> High Fidelity System 42,6 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O	Initial-Denaturierung: 95°C 5 min  Denaturierung: 95°C 45 s <i>Annealing</i> : 72°C 30 s Extension: 72°C 3 min 30 Zyklen Final-Extension: 72°C 5 min Abschluss: 4°C Pause

**Tabelle 2.20:** SOEing-PCR-Protokoll: Fusion von *pacrAB* und *luc* (2073 bp)

<b>Reaktionsansatz 1 (50 <math>\mu</math>L)</b>	<b>Methode 1</b>
7 $\mu$ L <i>pacrEF</i> 3 $\mu$ L <i>luc</i> ca. im Verhältnis 4:1, Endkonz.: 150-300 ng/ $\mu$ L 5 $\mu$ L 10x Puffer enthält MgCl <sub>2</sub> [15 mM] 1,25 $\mu$ L dNTPs [10 mM] 0,75 $\mu$ L Expand <sup>TM</sup> High Fidelity PCR System 33 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O	Initial-Denaturierung: 95°C 4 min  Denaturierung: 95°C 45 s <i>Annealing</i> : 73°C 30 s Extension: 72°C 3 min 7 Zyklen Final-Extension: 72°C 5 min Abschluss: 4°C Pause
<b>Reaktionsansatz 2 (50 <math>\mu</math>L)</b>	<b>Methode 2</b>
10 $\mu$ L Template aus Reaktionsansatz 1/ Methode 1 5 $\mu$ L 10x Puffer enthält MgCl <sub>2</sub> [15 mM] 5 $\mu$ L 5'- <i>Primer</i> : <i>pacrEF5'</i> [2 pmol/ $\mu$ L] 5 $\mu$ L 3'- <i>Primer</i> : <i>luc3-3</i> [2 pmol/ $\mu$ L] 1,25 $\mu$ L dNTPs [10 mM] 0,75 $\mu$ L Expand <sup>TM</sup> High Fidelity PCR System 23 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O	Initial-Denaturierung: 95°C 5 min  Denaturierung: 95°C 45 s <i>Annealing</i> : 71°C 30 s Extension: 72°C 3 min 30 Zyklen Final-Extension: 72°C 5 min Abschluss: 4°C Pause

**Tabelle 2.21:** SOEing-PCR-Protokoll: Fusion von *pacrEF* und *luc* (2270 bp)

Reaktionsansatz 1 (50 $\mu$ L)	Methode 1
2 $\mu$ L <i>marA</i> 2 $\mu$ L <i>araC-paraB</i> ca. im Verhältnis 5:1, Endkonz.: 150-300 ng/ $\mu$ L 5 $\mu$ L 10x Puffer enthält MgCl <sub>2</sub> [15 mM] 1,25 $\mu$ L dNTPs [10 mM] 0,75 $\mu$ L Expand <sup>TM</sup> High Fidelity PCR System 39 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O	Initial-Denaturierung: 95°C 5 min  Denaturierung: 95°C 45 s <i>Annealing</i> : 70°C 30 s Extension: 72°C 3 min 7 Zyklen Final-Extension: 72°C 5 min Abschluss: 4°C Pause
Reaktionsansatz 2 (50 $\mu$ L)	Methode 2
10 $\mu$ L Template aus Reaktionsansatz 1/ Methode 1 5 $\mu$ L 10x Puffer enthält MgCl <sub>2</sub> [15 mM] 5 $\mu$ L 5'-Primer: KAAraP5' [2 pmol/ $\mu$ L] 5 $\mu$ L 3'-Primer: KAmarA3' [2 pmol/ $\mu$ L] 1,25 $\mu$ L dNTPs [10 mM] 0,75 $\mu$ L Expand <sup>TM</sup> High Fidelity PCR System 23,5 $\mu$ L dH <sub>2</sub> O	Initial-Denaturierung: 95°C 5 min  Denaturierung: 95°C 45 s <i>Annealing</i> : 70°C 30 s Extension: 72°C 3 min 30 Zyklen Final-Extension: 72°C 5 min Abschluss: 4°C Pause

Tabelle 2.22: SOEing-PCR-Protokoll: Fusion von *araC-paraB* und *marA* (1750 bp)

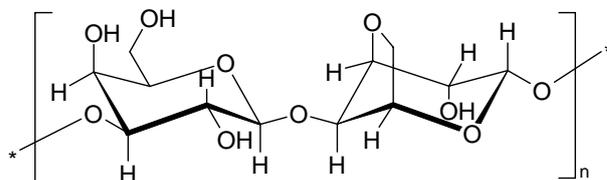
### 2.3.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Zur Identifizierung und Ermittlung der Größe von DNA-Fragmenten wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei macht man sich zunutze, dass DNA-Moleküle aufgrund ihrer, innerhalb eines großen pH-Bereichs, negativ geladenen Phosphatgruppen im elektrischen Feld in Richtung Anode wandern. Diese sogenannte elektrophoretische Beweglichkeit, die Mobilität, ist eine substanzabhängige Größe, die die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld bestimmt und damit für die Trennung entscheidend ist.

Da jedes Nukleotid eine Phosphatgruppe besitzt, ist die Ladung der DNA direkt proportional zu ihrer Basenpaarzahl bzw. zu ihrer Länge. Daher werden die Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit von Nukleinsäuren in einer festen Gelmatrix ausschließlich durch verschiedene Molekülgrößen hervorgerufen.

Als Trägermaterial für eine feste Gelmatrix kann Agarose (Abb. 2.3) dienen. Diese hat die Eigenschaft, nach dem Lösen durch Erhitzen, beim Abkühlen zu gelieren. Hierbei bilden sich Polysaccharidsol Doppelhelices, die sich in Gruppen zu relativ dicken Fäden zusammenschließen. Diese Struktur verleiht den Agarosegelen hohe Stabilität bei großen Porendurchmessern (150-500 nm). Dadurch wird das Gel zu einer Art "Molekularsieb", das das Vorankommen kleinerer DNA-Fragmente begünstigt. Die Laufstrecke der Moleküle ist dem Logarithmus der Basenpaare umgekehrt proportional.

Die Wanderung der Nukleinsäuren im elektrischen Feld kann vor allem durch zwei Theorien beschrieben werden, dem Ogston-Sieffekt und der Reptationstheorie. Das theoretische Verhalten kann als "Mischung" dieser beiden Theorien angesehen werden [122].



**Abbildung 2.3:** Strukturformel von Agarose (Sesselkonformation)

Bei den Experimenten wurde ein Agaroseanteil von 0,8-1,2 % (je nach erwarteten Fragmentgrößen) durch Aufkochen in 0,5x TAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst. Während des Abkühlens wurde der DNA-Interkalator Ethidiumbromid (Endkonzentration ca. 0,1 - 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) hinzugegeben, wodurch die DNA nach anschließender UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden kann. Nach der Bildung des Agarosegels in der Gelelektrophoresekammer, wurde dieses mit 0,5x TAE-Puffer überschichtet.

Die Probelösungen (5-10  $\mu\text{L}$ ) wurden mit 1/5 Ladepuffer gemischt und anschließend in die, durch einen Kamm geformten, Geltaschen pipettiert. Unter Anlegen einer Spannung von 5-10 V/cm wurde die Elektrophorese gestartet. Nach dem Lauf wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt und mit einer Videodokumentationsanlage betrachtet. Die Größe und Konzentration der DNA-Banden konnte mit Hilfe eines Größen-Standard-Markers (Smart Ladder) bestimmt werden, der neben den Probelösungen aufgetragen wurde.

### 2.3.6 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA

Zur Beseitigung störender Reaktionsbedingungen wie z.B. zu hoher Salzgehalt, noch vorhandenes Enzym, *Primer* oder Nukleotide, wurden die Reaktionsansätze vor der Weiterverarbeitung aufgereinigt und konzentriert.

#### 2.3.6.1 Isolierung von DNA aus Reaktionsansätzen

Zur Isolierung von DNA aus Reaktionsansätzen wurde das QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen verwendet, wobei nach dem entsprechenden Protokoll des Herstellers vorgegangen wurde [4].

Das Prinzip, das diesem Kit zugrunde liegt, sind Anionenaustauschersäulen, die durch ihre positive Ladung die negativ geladene DNA binden können. Dies geschieht bei relativ niedriger Salzkonzentration (ca. 750 mM). Degradierete RNA und Proteine binden unter den Bedin-

gungen nicht. Das Säulenmaterial wird mit Puffern einer höheren Salzkonzentration (1 M) gewaschen, um Spuren von Proteinen (RNase A) oder RNA zu eliminieren. Die Elution der DNA erfolgt bei noch höheren Salzkonzentrationen (1,25 M) [122].

Die tatsächlichen Salzkonzentrationen sind vom Säulenmaterial abhängig und den Herstellerangaben zu entnehmen. Bei den Säulen der Firma Qiagen ist ein pH-Wert von  $\leq 7,5$  zu beachten, sowie der Einsatz eines hohen Anteils an chaotropen Salzen. Chaotrope Salze zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Struktur des Wassers brechen können und Proteine inaktivieren.

Zu der Probe wurde im Verhältnis 1:6 PB-Puffer hinzugegeben und diese Mischung gevortext. Anschließend wurde dieser Ansatz auf die mitgelieferte Säule pipettiert und für 1 min, bei 13.000 rpm und RT, zentrifugiert, um die Bindung der DNA an die Silica-Gel-Membran zu gewährleisten.

Im nächsten Schritt wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 750  $\mu\text{L}$  PE-Puffer gewaschen. Um den Ethanol-haltigen PE-Puffer vollständig von der Säule zu entfernen, wurde zweimal für jeweils 1 min, bei 13.000 rpm und RT, zentrifugiert und zwischendurch der Durchfluss verworfen. So können Interferenzen in den Folgeexperimenten vermieden werden.

Abschließend wurde die gebundene DNA mit 30-50  $\mu\text{L}$  EB-Puffer bzw. 1:10 EB-Puffer oder reinem Wasser von der Säule eluiert. Dabei wurde immer dann demineralisiertes Wasser bevorzugt, wenn Salze für folgende Experimente störend waren, wie z.B. bei der Elektroporation (Abschnitt 2.3.10.5). Das Eluat wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.3.6.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um aus einem Gemisch verschieden großer DNA-Fragmente das gewünschte Fragment zu isolieren, wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. Das zugrundeliegende Prinzip wurde in Abschnitt 2.3.6.1 beschrieben.

Nach einer Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.5) in einem *low-melt*-Agarosegel wurde die distinkte Bande (DNA-Fragment entsprechender Größe) mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten.

Nach Überführung in ein sauberes Gefäß, wurde das Gelstück gewogen und im Verhältnis 1:4 QG-Puffer hinzupipettiert. Um die Agarose aufzulösen, wurde für 10 min bei  $50^\circ\text{C}$  auf dem Wasserbad inkubiert und anschließend der pH-Wert anhand der Färbung überprüft. Es musste nie eine Einstellung des pH-Wertes durchgeführt werden.

Im nächsten Schritt erfolgte die Bindung der DNA an die Säule durch Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm und RT. Um noch die letzten Agarosereste zu entfernen wurde 500  $\mu\text{L}$  QG-Puffer auf die Säule gegeben und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die sich nun anschließenden Wasch- und Elutionsvorgänge sind ebenfalls in Abschnitt 2.3.6.1 beschrieben [4].

### 2.3.6.3 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA durch Ethanol-Präzipitation

In Gegenwart monovalenter Kationen bildet DNA (bzw. auch RNA) in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert werden kann. In der Regel wird Natriumacetat verwendet und in bestimmter Konzentration (0,3 M) zur Nukleinsäurelösung hinzugegeben. Diesem Gemisch wird das 2,5-3fache Volumen an Ethanol (96 %) zugesetzt, inkubiert und zentrifugiert. Das mitgefällte Salz kann durch anschließendes Waschen mit 70 %igem Ethanol beinahe vollständig entfernt werden. Das Nukleinsäurepellet wird kurz getrocknet (37°C) und in einem entsprechenden Puffer oder Wasser gelöst [122]. Ethanol-Fällungen wurden bei der Aufbereitung von Proben zum Sequenzieren und bei der Plasmidisolierung durchgeführt. Die genauen Angaben sind den Abschnitten 2.3.9.1, 2.3.9.2 und 2.3.12 zu entnehmen.

### 2.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die für die Methode wichtigen Grundlagen sind in Abschnitt 2.3.1 schon beschrieben. Da das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280 nm liegt, lässt sich durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption sowohl bei 260 nm als auch bei 280 nm die Reinheit einer Nukleinsäurelösung abschätzen. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen  $OD_{260}/OD_{280}$ -Wert von 1,8. Ist die Nukleinsäurelösung mit Proteinen (oder Phenol) kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner [122].

Gemessen wurden wässrige Lösungen oder TE- bzw. EB-Puffer-haltige Lösungen gegen den entsprechenden Nullwert. Dabei ist die Problematik zu bedenken, dass abhängig vom pH-Wert und Salzgehalt der Lösungen ein und dieselbe Nukleinsäurepräparation  $OD_{260}/OD_{280}$ -Verhältnisse von 1,5 bis 2,2 aufweisen kann [232]. Zu den in Abschnitt 2.3.1 genannten Formeln lässt sich folgende ergänzen [143]:

$$c[\mu\text{mol}/\text{mL}]dsDNA = \frac{OD_{260} \times V}{13,2 \times L}$$

- $V$ : Verdünnungsfaktor
- $L$ : Länge in kb

### 2.3.8 Enzymatische Modifikationen

Die folgenden Abschnitte befassen sich mit einigen in dieser Arbeit verwendeten Enzymen. Dabei geht es um Modifikationen hinsichtlich der Identifizierung, Charakterisierung und Klo-

nierung von doppelsträngiger DNA.

### 2.3.8.1 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die in der Lage sind doppelsträngige DNA-Moleküle an bestimmten Erkennungssequenzen zu binden und zu schneiden (Hydrolyse). Hierbei können entweder glatte (*blunt*) oder kohäsive (*sticky*) Enden mit 5'- oder 3'-Überhängen entstehen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Typ-II-Restriktionsendonukleasen verwendet (Tab. 2.7). Diese besitzen nur eine Restriktionsaktivität und spalten die DNA meist innerhalb ihrer definierten Erkennungssequenz, so dass DNA-Fragmente mit definierter Länge und definierten Enden resultieren. Die Erkennungssequenzen dieser Enzyme sind 4-8 Nukleotide lang und meist palindromisch.

Bei der Durchführung einer Restriktion ist vor allem auf die Einstellung des optimalen pH-Wertes zu achten, der meist zwischen pH 7,5 und 8 liegt. Des Weiteren ist für die Enzymaktivität ein divalentes Kation (meist  $Mg^{2+}$ ) erforderlich. Das Temperaturoptimum liegt überwiegend bei 37°C. Eine Temperaturerhöhung kann bei einigen Restriktionsenzymen zur Inaktivierung genutzt werden. Die Restriktionsenzymmenge wird in Einheiten ( $U/\mu L$ ) angegeben: Eine Einheit ist die Menge, die benötigt wird, um ein Mikrogramm Substrat-DNA bei optimalen Reaktionsbedingungen innerhalb einer Stunde zu spalten. Als Substratmolekül wird in der Regel Bakteriophage  $\lambda$ -DNA verwendet [122].

Bei den Restriktionen wurden Ansätze von 20  $\mu L$  gewählt. Eingesetzt wurden 0,2-1  $\mu g$  DNA, der dem jeweiligen Enzym beigefügt 10x Puffer, sowie teilweise BSA-Lösungen [2]. Zur Berechnung der einzusetzenden Restriktionsenzymmenge, angepasst an die jeweils eingesetzte DNA-Menge, wurde folgende Formel verwendet:

$$Unit_{Enzym} = \frac{48.500 \text{ bp } (\lambda DNA) \times \text{Anzahl der Schnittstellen}_{DNA} \times \mu g \text{ DNA}}{\text{bp DNA} \times \text{Anzahl der Schnittstellen}_{\lambda DNA} \times h}$$

Für die unterschiedlichen Restriktionsansätze wurden die in Tabelle 2.7 angegebenen Restriktionsendonukleasen verwendet, deren Einsatz an den entsprechenden Stellen in Kapitel 3 Erwähnung findet.

### 2.3.8.2 Dephosphorylierung

Für die Klonierungen wurden Plasmide eingesetzt, die mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurden, welches kohäsive Enden mit freien Phosphatresten an den 5'-Enden erzeugte. Diese Reste werden für die anschließende Ligation benötigt. Da jedoch, wegen der Verwendung nur eines Restriktionsenzym, durch die entstandenen kompatiblen Enden die Möglichkeit der Religation der Vektoren bestand, wurden diese mit Alkalischen-Phosphatasen

inkubiert. Aufgrund der gleichen Problematik wurde bei geschnittenen Plasmide mit glatten Enden (nach Auffüllen mit dem *Large* (Klenow) Fragment der DNA-Polymerase I) ebenso verfahren. Die Alkalische-Phosphatase hydrolysiert Phosphoresterbindungen am 5'-Ende von Nukleinsäuren, wodurch die Religation verhindert werden kann.

Das Fragment, das hineinkloniert werden sollte, besaß dagegen noch beide Phosphatreste und konnte daher seinerseits mit der Vektor-DNA ligieren; zumindest mit einem der beiden Stränge, was für eine erfolgreiche Klonierung ausreichend ist [143].

Eingesetzt wurden bei den Versuchen die in Tabelle 2.7 aufgelisteten Phosphatasen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben der Enzymhersteller.

### 2.3.8.3 Generierung von *blunt ends*

Das sogenannte *Large* (Klenow) Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* ist eine modifizierte Variante der DNA-Polymerase I. Es handelt sich um das größere (76 kDa) von zwei enzymatisch aktiven Peptidfragmenten, die bei der partiellen Proteolyse der DNA-Polymerase I durch eine bestimmte Protease entstehen. Das *Large* (Klenow) Fragment besitzt nur noch die 5'→3'-DNA-Polymeraseaktivität und die 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Die 5'→3'-Exonukleaseaktivität ist hingegen nicht mehr vorhanden. Die gleichen Aktivitäten besitzt auch eine DNA-Polymerase aus dem Phagen T4 (T4-DNA-Polymerase). Beide Enzyme weisen nur dann eine Exonukleaseaktivität auf, wenn keine Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs) vorhanden sind. In Gegenwart von dNTPs hingegen überwiegt die Polymeraseaktivität [42].

Für die Experimente wurden die in Tabelle 2.7 genannten Enzyme eingesetzt, um für die Umklonierung von DNA-Fragmenten *blunt ends* (glatte Enden) zu erzeugen. Die Reaktion wurde nach Angaben der Enzymhersteller durchgeführt.

### 2.3.8.4 Ligation

Die DNA-Ligase aus dem Bakteriophagen T4 (T4-DNA-Ligase) katalysiert die Verknüpfung von 5'-Phosphatgruppen mit 3'-OH-Enden einer DNA. Die benötigte Energie zur Bildung der Phosphodiesterbindung bezieht das Enzym aus der Hydrolyse des Co-Substrats ATP.

Für die Ligationen wurden entweder das Rapid Ligation Kit oder die T4-DNA-Ligase von NEB mit dem hergestellten Puffer (Tab. 2.7 und 2.3) verwendet. Die einzusetzenden DNA-Mengen wurden wie folgt berechnet:

$$DNA - Menge[pmol] = \frac{Masse[pg]}{(660[g/mol] \times Anzahl\ der\ Basenpaare)}$$

Dabei wurde stets darauf geachtet, dass sich das DNA-Fragment zum Vektor im Verhältnis von ca. 5:1 im Ligationsansatz befand.

Bei der Verwendung des Rapid Ligation Kits wurden die Angaben des Herstellers benutzt. Bei Verwendung der T4-DNA-Ligase im hergestellten Puffer wurde zu einem 20  $\mu\text{L}$  Ligationsansatz 1  $\mu\text{L}$  Enzym gegeben und dieser bei 14°C für 15 h inkubiert.

### 2.3.9 Gewinnung von Plasmid-DNA

Plasmide sind zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle, die sich unabhängig vom bakteriellen Genom in Bakterien vermehren können. Im Folgenden geht es dabei ausschließlich um die Plasmidvektoren, die aus verschiedenen Elementen zusammengesetzt sind und für viele molekularbiologische Anwendungen essentiell sind, nicht um natürlich vorkommende Plasmide. Die Minimalausstattung eines solchen Plasmids (ca. 2,5-10 kb) besteht aus einem Replikationsstart (*origin of replication, ori*), einem Selektionsgen (meist ein Antibiotikumresistenzgen) und einer Klonierungsstelle (Restriktionsschnittstelle, *cloning site*), um fremde DNA ins Plasmid einschleusen zu können. Der Replikationsursprung wird von der DNA-Polymerase als Initiationspunkt für die Replikation erkannt und entscheidet über die Zahl der Plasmidkopien pro Bakterienzelle [122, 143, 42].

In den Abschnitten 2.3.9.1 und 2.3.9.2 werden zwei in dieser Arbeit angewandte Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA beschrieben, welche nach Angaben der Firma Qiagen durchgeführt wurden.

#### 2.3.9.1 Plasmid-Mini-Präparation

Für die Isolierung von Plasmiden musste zunächst der Plasmid-tragende Bakterienstamm unter Selektionsdruck wachsen gelassen werden. Dazu wurde, ausgehend von einer einzelnen Bakterienkolonie, eine Übernachtskultur (ÜNK) in 3 mL Medium bei 130 rpm und der entsprechenden Temperatur (meist 37°C) bebrütet. Die entstandene Bakteriensuspension wurde mittels zweimaliger Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT für jeweils 1 min sedimentiert. Zur Resuspension wurden 150  $\mu\text{L}$  des P1-Puffers hinzupipettiert und gevortext. Dieser Puffer ist EDTA-haltig, was, durch Komplexierung von zweiwertigen Kationen ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), zur Destabilisierung der Bakterienzellwand führt. Des Weiteren kommt es durch die zugesetzte RNase A (siehe Herstellerangaben) zur Degradation eines Großteils der bakteriellen RNA. Im nächsten Schritt wurden 150  $\mu\text{L}$  des P2-Puffers hinzugegeben und durch Invertieren vorsichtig gemischt. Durch diesen Puffer kommt es zur sogenannten alkalischen Lyse. Das enthaltene SDS löst als Detergenz die Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellwände. Die Natronlauge denaturiert chromosomale und Plasmid-DNA sowie Proteine. Entscheidend an diesem Punkt ist die Inkubationsdauer, die in der Praxis ca. 1-2 min betrug. Bei einer zu langen Inkubationsdauer kommt es zur irreversiblen Denaturierung der Plasmid-DNA, bei einer zu kurzen zur ineffizienten Lyse und damit niedrigen Ausbeute.

Nach der Inkubation wurden zur Neutralisation 150  $\mu\text{L}$  des P3-Puffers hinzupipettiert und wieder durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Neutralisiert wird mit saurem Kaliumacetat. Kaliumdodecylsulfat ist in Wasser wesentlich schlechter löslich als Natriumdodecylsulfat (SDS) und fällt somit unter den herrschenden hohen Salzkonzentrationen aus. Denaturierte Proteine, hochmolekulare RNA, denaturierte chromosomale DNA und bakterieller Zelldebris bilden in Anwesenheit von Kaliumdodecylsulfat unlösliche Komplexe und werden zusammen mit dem Salz präzipitiert. Die kleineren Plasmidmoleküle bleiben in Lösung und können durch Neutralisation der Lösung wieder renaturieren [122]. Dabei hat die *supercoiled*-Konformation des Plasmids dafür gesorgt, dass sich die Einzelstränge bei der Denaturierung räumlich nicht weit voneinander entfernt haben.

Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut für 2 min zentrifugiert. Wenn kein Sediment mehr sichtbar war, wurde mit der Lösung weiter gearbeitet.

Im nächsten Schritt wurde eine Ethanol-Fällung, deren Prinzip in Abschnitt 2.3.6.3 beschrieben worden ist, wie folgt durchgeführt:

Auf die Lösung wurde zunächst 1 mL Ethanol 96 % gegeben, invertiert und für 25 min bei 17.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 500  $\mu\text{L}$  Ethanol 70 % durch kurzes Umschütteln gewaschen. Anschließend wurde für 5 min bei 17.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und der restliche Ethanol durch Verdunsten bei 37°C entfernt. Das getrocknete Sediment wurde je nach Anwendung in 30-50  $\mu\text{L}$  EB-Puffer oder Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Restriktionsverdau (Linearisierung der Plasmid-DNA, Abschnitt 2.3.8.1) durch Größenvergleich im Agarosegel (Abschnitt 2.3.5).

### 2.3.9.2 Plasmid-Midi-Präparation

Die bei dieser Variante zugrunde liegenden Prinzipien entsprechen denen der alkalischen Lyse in Abschnitt 2.3.9.1. Um jedoch aufgereinigte Plasmid-DNA zu erhalten, werden anschließend die gleichen Methoden wie unter Abschnitt 2.3.6.3 verwendet, mit dem Unterschied, dass die Plasmid-DNA mittels Isopropanol gefällt wird. Durch die Verwendung eines größeren Ausgangskulturvolumens und dementsprechend größerer Silica-Gelmembran-Säulen kann insgesamt eine größere Ausbeute an Plasmid gewonnen werden.

Zunächst wurde eine Vorkultur angesetzt, indem eine einzelne Bakterienkolonie von der Selektionsplatte abgenommen und in 2-5 mL Medium (NI, LB) überimpft wurde. Dieser Ansatz wurde für 8 h bei 300 rpm und der entsprechenden Temperatur (in der Regel 37°C) wachsen gelassen. Aus dieser Vorkultur wurden Verdünnungen von 1:500 bis 1:1000 in 25 mL Selektionsmedium für *high copy*-Plasmide und in 100 mL Selektionsmedium für *low copy*-Plasmide angesetzt.

*low copy*-Plasmide mit einem colE1-Origin, die in Gegenwart von Chloramphenicol kultiviert wurden, wurden wie *high copy*-Plasmide behandelt. Da durch den Translationsinhibitor

Chloramphenicol die Nachlieferung des Rop(*repressor of primer*)-Proteins inhibiert wird, das mitverantwortlich für die Kontrolle der Kopienzahl des Plasmids ist. Dies führt zu einer erhöhten Replikation (*relaxed replication*) und dadurch zur Erhöhung der Kopienzahl [122]. Die angesetzten Verdünnungen wurden bei 300 rpm und meist 37°C für 12-16 h geschüttelt, bis ungefähr eine Zelldichte von  $3-4 \times 10^9$  erreicht war. Auf diese Weise sollte eine Überladung der Säule vermieden werden. Im nächsten Schritt wurden die Bakteriensuspensionen durch Zentrifugation bei 5.300 rpm und 4°C für 15 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in 4 mL bzw. 10 mL P1-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden 4 mL bzw. 10 mL P2-Puffer hinzugegeben, durch Invertieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 4 mL bzw. 10 mL vorgekühltem P3-Puffer, invertieren und Inkubation für 15 min bzw. 20 min auf Eis, konnte bei 13.000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert werden. Der Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde unverzüglich in ein neues Gefäß überführt und erneut bei 13.000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Wenn kein Sediment mehr zu sehen war, wurde mit der Lösung weiter gearbeitet. Im nächsten Schritt wurde die Silica-Gelmembran-Säule durch Zugabe von 4 mL bzw. 10 mL QBT-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die Probe auf die Säule überführt und nach dem Durchlauf mit  $2 \times 10$  mL bzw.  $2 \times 30$  mL QC-Puffer gewaschen. Eluiert wurde mit 5 mL bzw. 15 mL QF-Puffer.

Die im Eluat enthaltene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 3,5 mL bzw. 10,5 mL Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation bei 10.000 rpm und RT für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 2 mL bzw. 5 mL Ethanol 70 % gewaschen und bei 10.000 rpm (RT) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Sediment getrocknet und in 50  $\mu$ L EB-Puffer aufgenommen [4].

### 2.3.10 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Um das Einschleusen von DNA in eine Bakterienzelle (Transformation) zu ermöglichen, gibt es mehrere experimentelle Ansätze. In den folgenden Abschnitten werden zwei, in dieser Arbeit angewandte, Möglichkeiten genauer beschrieben.

#### 2.3.10.1 CaCl<sub>2</sub>-Methode

Eine Möglichkeit, um die DNA-Aufnahmebereitschaft von Zellen (Kompetenz) zu erhöhen ist die Vorbehandlung dieser mit zweiwertigen Kationen bei niedrigen Temperaturen. Der genaue Mechanismus dabei ist bis heute ungeklärt, und die Optimierung der Bedingungen dieser Methode ist auf empirische Experimente zurückzuführen [190].

Zur Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode [33] wurde eine 1:100 Verdünnung einer Übernachtskultur (ÜNK) in 50 mL Medium (NI, LB) angesetzt und bei 130 rpm

und 37°C bis zu einer  $OD_{546\text{nm}}$  von 0,4 bis 0,6 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in ein, auf Eis vorgekühltes, Gefäß überführt und bei 5.500 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10-15 mL vorgekühlter 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5.500 rpm, 4°C, 5 min) wurde das Sediment in 1 mL 100 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und auf Eis im Kühlschrank gelagert. Die Suspension hält sich auf Eis für mehrere Tage, wobei die Kompetenz ihr Maximum nach ca. 12-24 h erreicht [143]. Dies hängt allerdings vom verwendeten Bakterienstamm ab. Je nach Stamm wurden die kompetenten Zellen sofort für die Transformation eingesetzt oder erst nach 18-24 h.

### 2.3.10.2 Transformation nach Hanahan

Für die Transformation nach Hanahan [69] wurden 80  $\mu\text{L}$  der, mittels  $\text{CaCl}_2$ -Methode hergestellten, kompetenten Zellen mit 5-10  $\mu\text{L}$  eines Ligationsansatzes oder 1-50 ng Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und auf Eis für 30 min inkubiert. Hierbei kommt es zur Anlagerung der DNA an die Zytoplasmamembran.

Anschließend wurden die Bakterien für 1-2 min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Dieser Hitzeschock führt zu einer erhöhten Fluidität der Membran, wodurch die Aufnahme der DNA in die Zelle erleichtert wird.

Die Bakterienzellen wurden nochmals für 5 min auf Eis gestellt und dann in 1 mL Medium (NI, LB) überführt. Ohne Zugabe des Selektionsantibiotikums wurde diese Suspension für 1 h bei 130 rpm und 37°C geschüttelt. In dieser Regenerations-Phase kommt es zur Ausprägung der Plasmid-vermittelten Resistenz.

Abschließend wurden 50 und 200  $\mu\text{L}$  der Bakteriensuspension auf Antibiotikum-haltigen Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht bebrütet. Als Kontrolle dienten je nach Anwendung folgende Ansätze:

- 80  $\mu\text{L}$  kompetente Zellen: Überprüfung der Lebensfähigkeit (kein Selektionsdruck)
- 80  $\mu\text{L}$  kompetente Zellen + pBR322: Überprüfung der Kompetenz
- 80  $\mu\text{L}$  kompetente Zellen + Plasmid geschnitten: Überprüfung der Vollständigkeit des Restriktionsverdaus
- 80  $\mu\text{L}$  kompetente Zellen + Plasmid dephosphoryliert: Überprüfung der Phosphatase
- 80  $\mu\text{L}$  kompetente Zellen + Plasmid dephosphoryliert und ligiert: Überprüfung der Phosphatase
- 80  $\mu\text{L}$  kompetente Zellen + Plasmid geschnitten und ligiert: Überprüfung der Ligase

### 2.3.10.3 Herstellung kompetenter Zellen mittels $\text{CaCl}_2$ -Methode zur Lagerung

Bei Stämmen mit denen verschiedene Transformationen mittels  $\text{CaCl}_2$ -Methode durchgeführt werden sollten, wurde die Durchführung der Herstellung kompetenter Zellen mittels  $\text{CaCl}_2$  so abgewandelt, dass die Bakterienzellen bei  $-80^\circ\text{C}$  lagerfähig waren und damit jeder Zeit eingesetzt werden konnten.

Dabei wurde die Kultur wie in Abschnitt 2.3.10.1 beschrieben inkubiert und nach Ernte für 10 min auf Eis gestellt. Durch Zentrifugation für 10 min bei 5.500 rpm und  $4^\circ\text{C}$  wurde sedimentiert, und das Sediment in 10 mL eiskaltem TFB1-Puffer (Tab. 2.3) resuspendiert. Nach weiteren 10 min auf Eis wurde unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen sedimentiert. Dieses Sediment wurde in 2 mL eiskaltem TFB2-Puffer (Tab. 2.3) resuspendiert, für 10 min auf Eis gestellt, abschließend á 200  $\mu\text{L}$  aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Kamen diese Bakterienzellen für Transformationen zum Einsatz, musste das Auftauen auf Eis erfolgen.

### 2.3.10.4 Herstellung kompetenter Zellen für die Elektroporation

Aus einer Übernachtskultur (ÜNK) wurde eine 1:100 Verdünnung in 50 mL Medium (NI, LB für *E. coli*, SOB für Salmonellen) hergestellt und bei 200 rpm und  $37^\circ\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,5 bis 0,7 geschüttelt. Die Zellsuspension wurde in ein sauberes Gefäß überführt und 30 min auf Eis gestellt. Durch Zentrifugation für 15 min bei 7.000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  wurden die Bakterienzellen sedimentiert. Das Sediment wurde in 10 mL kaltem Wasser resuspendiert und unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen erneut sedimentiert.

Dieser Waschschrift ist erforderlich, um die Bakterienzellen vollständig von anhaftenden Salzen zu befreien, die sich auf die Elektroporation störend auswirken könnten und wurde noch einmal mit 5 mL kaltem Wasser wiederholt.

Abschließend wurde das Sediment in 500  $\mu\text{L}$  kaltem Wasser resuspendiert. Die kompetenten Bakterienzellen wurden auf Eis gelagert und direkt für die Elektroporation eingesetzt. Sollten die kompetenten Zellen für einen späteren Einsatz gelagert werden, musste bei der Durchführung mit 10 % Glycerin anstelle von kaltem Wasser gearbeitet werden. Dabei wurde das Sediment abschließend in 2 mL 10 % Glycerin resuspendiert, á 200  $\mu\text{L}$  aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

### 2.3.10.5 Elektroporation

Die Elektroporation ist ursprünglich für das Einschleusen von DNA in eukaryotische Zellen entwickelt [151], aber längst auch für die Transformation in Bakterienzellen optimiert worden [201].

Mittlerweile ist die Elektroporation das gebräuchlichste und effizienteste Transformationsverfahren. Hierbei wird ausgenutzt, dass, durch kurzfristiges Anlegen einer elektrischen Spannung und Entstehung eines elektrischen Feldes, in der Membran eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle induziert wird, so dass innerhalb des elektrischen Impulses DNA ins Zellinnere diffundieren kann.

Für die Durchführung wurden 50  $\mu\text{L}$  der für die Elektroporation hergestellten, kompetenten Zellen mit 1-50 ng DNA vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis gestellt. Zu beachten war bei diesem Schritt, dass auch die DNA-Lösung möglichst keine bzw. nur eine geringe Salzkonzentration aufwies (Abschnitt 2.3.6.3), da es sonst durch das Leiten des Stroms, zu einem Kurzschluss kommt.

Bei der Einstellung des Genepulsers wurden folgende Parameter gewählt: 2,5 kV/ 200  $\Omega$ / 25  $\mu\text{F}$ / 3,5-4,5 ms. Der Transformationsansatz wurde in die Elektroporationsküvette überführt und der Impuls gegeben. Schnellstmöglich wurde dieser Ansatz in 1 mL Medium (NI, LB für *E. coli*, SOC für Salmonellen) pipettiert und für 1 h bei 130 rpm und 37°C geschüttelt.

Die regenerierten, transformierten Bakterienzellen wurden wie in Abschnitt 2.3.10.2 auf Selektionsagarplatten ausplattiert. Es konnten die gleichen Kontrollen, wie unter Abschnitt 2.3.10.2 beschrieben, verwendet werden. Zusätzlich wurde die Überlebensquote der kompetenten Zellen nach Elektroporation durch Ausimpfen ohne Selektionsdruck kontrolliert.

Da Elektroporationsküvetten teuer sind, wurden diese nach Reinigung mehrfach (2-3x) verwendet. Gereinigt wurde, indem zunächst mit 0,1 N HCl-Lösung für 5 min inkubiert wurde. Anschließend wurde die Küvette mit 96 % Ethanol gewaschen. Nach Verwerfen und dem vollständigem Verdunsten des Ethanols wurden die Küvetten erneut eingesetzt.

### 2.3.11 Konjugation

Die bakterielle Konjugation ist neben der Transformation und der viralen Transduktion eine der Möglichkeiten zur DNA-Übertragung bei Prokaryoten. Die bakterielle Konjugation erlaubt über direkten Zell-Zell-Kontakt den unidirektionalen DNA-Transfer von einem Donorbakterium in einen Rezipienten [109, 211]. Damit die Konjugation ablaufen kann, muss das Donorbakterium ein sogenanntes konjugatives Plasmid, das die für die Konjugation nötigen Gene (z.B. F-Pili) trägt, enthalten. Zu dieser Gruppe gehören F(*fertility*)- und R(*resistance*)-Plasmide, die nach einer bestimmten Nomenklatur eingeteilt werden.

Für die Übertragung des Plasmids pBP507 durch Konjugation wurde der Stamm CN600SN, der das RP1 Plasmid enthält, verwendet. Für die Übertragung von pBP591 wurde hingegen der *E. coli*-Stamm S17-1 verwendet, der RP4 chromosomal integriert trägt. RP1 und RP4 gehören zu den sogenannten Plasmiden der Inkompatibilitätsgruppe P (IncP), welche promiskuitiv sind und sich durch ein breites Wirtsspektrum (*broad host range*) auszeichnen [29].

Für die Durchführung wurden Übernachtskulturen der Rezipienten-Stämme in 3 mL Medium (NI) bei 130 rpm und 37°C geschüttelt. Die Donor-Stämme, die zunächst über Transforma-

tion mittels  $\text{CaCl}_2$ -Methode die Plasmide pBP507 bzw. pBP591 erhalten haben, wurden in 3 mL Medium (NI) mit  $30 \mu\text{g/mL}$  Gentamicin kultiviert. Zur Entfernung des Antibiotikums wurden die Übernachtskulturen der Donor-Stämme für 1 min bei 13.000 rpm und RT sedimentiert und in 3 mL Medium (NI) resuspendiert. Donor und Rezipient wurden im Verhältnis 1:2 gemischt und 6 h bei RT ruhig stehen gelassen. Zur Selektion der Transkonjuganten wurden  $200 \mu\text{L}$  des Gemisches auf M9-Agarplatten, die noch Glukose und  $30 \mu\text{g/mL}$  Gentamicin enthielten, ausplattiert und bei  $37^\circ\text{C}$  bebrütet. Unter diesen Minimal-Bedingungen konnten die Donor-Stämme nicht wachsen.

### 2.3.12 DNA-Sequenzierung

Das Verfahren zur DNA-Sequenzierung wurde 1977 von Sanger et al. entwickelt [191]. Dieses Didesoxyverfahren (Kettenabbruchverfahren, Terminationsverfahren) basiert auf der durch eine Polymerase katalysierten Synthese einer Population von basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten, die nach ihrer Größe elektrophoretisch getrennt werden können. Das in dieser Arbeit genutzte, abgewandelte Verfahren wird als *Cycle-Sequencing* bezeichnet.

Hierbei ermöglicht eine thermostabile DNA-Polymerase die *in vitro*-Vervielfältigung des zu sequenzierenden DNA-Bereichs analog einer PCR-Reaktion (Abschnitt 2.3.3). Im Gegensatz zur PCR befindet sich in der Reaktion nur ein *Primer*, es wird also lediglich linear und nicht exponentiell amplifiziert. In einer Mischung aus DNA-Matrize, *Primer*, thermostabiler DNA-Polymerase und einem dNTP/ddNTP-Gemisch wird ein thermisches Profil durchlaufen, bestehend aus *Primer*-Denaturierung, *Primer*-Hybridisierung und DNA-Synthese.

Die 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs) sind die sogenannten Terminatoren [122]. Aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am C3-Atom des Zuckers, sind diese nicht in der Lage eine Phosphodiesterbindung auszubilden, so dass ihr Einbau zum Kettenabbruch führt. Da dieser Syntheseabbruch statistisch auftritt, kommt es zur Bildung von DNA-Fragmenten aller möglichen Kettenlängen mit definiertem 5'-Ende.

Zur Detektion sind die ddNTPs mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, jeweils eine der vier Basen mit einem spezifischen Farbstoff. Dadurch kann die Reaktion in einem Gefäß stattfinden und das Reaktionsgemisch als Ganzes aufgetrennt werden. Die Absorptionsspektren der basenspezifischen Fluorochrome unterscheiden sich genügend voneinander, so dass sie bei Anregung photometrisch eindeutig erfasst werden können. Die DNA-Fragmente werden nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe eines automatischen DNA-*Sequencers* (Tab. 2.1) detektiert, analysiert und direkt in einem Computer gespeichert. Die Umsetzung der Farbsignale in die Basenabfolge erfolgt mit Hilfe dieses Computers und entsprechender Software (ABI-CE1, Version 3.0, Perkin Elmer Corporation, Foster City, USA).

Bei der Durchführung von DNA-Sequenzierungen wurde zwischen Plasmiden und DNA-Fragmenten als Matrize unterschieden. Die allgemeinen Protokolle für Sequenzierproben und -programme sind in den Tabellen 2.23 und 2.24 aufgeführt.

## 2 Material und Methoden

Reaktionsansatz (20 $\mu\text{L}$ )	Methode
x $\mu\text{L}$ PCR-Fragment (20-100 ng) 2,5 $\mu\text{L}$ 5x Puffer 1 $\mu\text{L}$ <i>Primer</i> [10 pmol/ $\mu\text{L}$ ] 3 $\mu\text{L}$ Ready Reaction Mix (BigDye®) ad 20 $\mu\text{L}$ dH <sub>2</sub> O	Initial-Denaturierung: 96°C 2 min  Denaturierung: 96°C 10 s <i>Annealing</i> : x°C 5 s Analog der PCR für das Fragment Extension: 60°C 4 min 25 Zyklen  Abschluss: 4°C Pause

**Tabelle 2.23:** *Cycle Sequencing*-Protokoll für DNA-Fragmente

Reaktionsansatz (20 $\mu\text{L}$ )	Methode
x $\mu\text{L}$ Plasmid (1-1,5 $\mu\text{g}$ ) 2,5 $\mu\text{L}$ 5x Puffer 1 $\mu\text{L}$ DMSO 1 $\mu\text{L}$ <i>Primer</i> [10 pmol/ $\mu\text{L}$ ] ad 17 $\mu\text{L}$ dH <sub>2</sub> O  Zugabe nach Initial-Denaturierung: 3 $\mu\text{L}$ Ready Reaction Mix (BigDye®)	Initial-Denaturierung: 96°C 5 min  Denaturierung: 96°C 30 s <i>Annealing</i> : x°C 15 s Analog der PCR für das Fragment Extension: 60°C 4 min 30 Zyklen  Abschluss: 4°C Pause

**Tabelle 2.24:** *Cycle Sequencing*-Protokoll für Plasmid-DNA

Nach dem *Cycle* wurden die Ansätze durch eine Ethanol-fällung (Abschnitt 2.3.6.3) aufgereinigt. Zu dem 20  $\mu\text{L}$  *Cycle*-Ansatz wurden 80  $\mu\text{L}$  Wasser, 10  $\mu\text{L}$  3 M Natriumacetat-Lösung und 250  $\mu\text{L}$  Ethanol (96 %) in dieser Reihenfolge hinzupipettiert und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde für 25 min bei 15.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und das Pellet mit 400  $\mu\text{L}$  Ethanol 70 % gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 15.000 rpm und RT wurde der Überstand wieder entfernt und der restliche Ethanol bei 37°C verdunsten gelassen. Das Präzipitat wurde in 20  $\mu\text{L}$  Hi-Di™ Formamid aufgenommen und sequenziert.

### 2.3.13 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Das *luc*-Gen aus *Photinus pyralis* ist ein häufig verwendetes Reporter-gen, das für das Enzym Luciferase codiert. Unter der Kontrolle von Promotoren zu untersuchender Gene kann es für Expressionsstudien genutzt werden. Die Luciferase ist in der Lage ihr Substrat Luciferin durch Elektronenübertragung unter Verbrauch von ATP in Gegenwart von Magnesium und Sauerstoff zu oxidieren. Dabei wird unter anderem Licht ( $h \bullet \nu$ ) freigesetzt (Abb. 2.4).

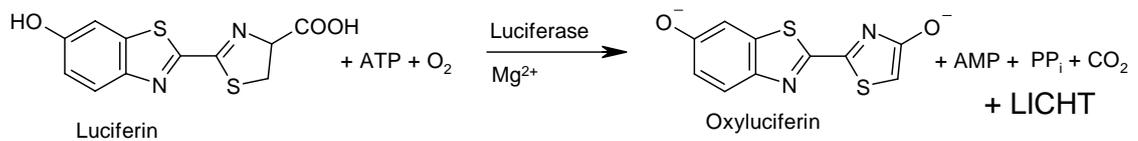


Abbildung 2.4: Luciferase-Reaktion

Diese Reaktion läuft in wenigen Sekunden ab. Zur Durchführung wurde das Luciferase Assay System von Promega verwendet, in dem das Lumineszenzsignal für eine Minute stabil gehalten wird.

Für das *Screening* auf Funktionalität der entwickelten Reportergensysteme wurden Proben aus Übernachtskulturen gezogen. Bei der Durchführung der Messreihen wurden 1:100 Verdünnungen aus Übernachtskulturen in 10 mL Medium (NI) angesetzt und bis auf eine OD<sub>546nm</sub> von 0,4-0,65 wachsen gelassen. Entscheidend für die Auswahl der Höhe der OD<sub>546nm</sub> war die Fragestellung des Versuchs (Abschnitte 3.12 und 3.13). Wurden Proben unter Zugabe von Substanzen vermessen, wurden diese bei definierter OD<sub>546nm</sub> hinzugegeben (Abschnitte 3.11, 3.12.2, 3.12.3, 3.12.5 und 3.13.1). Um Proben, von verschiedenen Stämmen oder unter verschiedenen Bedingungen, direkt miteinander vergleichen zu können, mussten diese am selben Tag bei exakt der gleiche OD<sub>546nm</sub> entnommen werden. Dabei wurden aus einem Ansatz immer drei Proben entnommen.

Um die Luciferase-Aktivität zu bestimmen, wurden 90  $\mu\text{L}$  Probe mit 10  $\mu\text{L}$  Puffer (1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/ 20 mM EDTA, pH 7,8) gevortext und bei -80°C eingefroren (> 10 min). Auf die wieder aufgetauten Proben wurden 300  $\mu\text{L}$  Lysis-Mix (1,5 mg Lysozym [58.100 U/mg Protein], 1mg BSA, 80  $\mu\text{L}$  5x CCLR ad 300  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O) gegeben, gevortext und für 1 h stehen gelassen. Dieser Mix dient nicht nur dem Aufschluss der Zellen, sondern stabilisiert zusätzlich die Luciferase für Stunden. In der Regel wurden dreimal 2,5  $\mu\text{L}$  aus der gleichen Probe entnommen und direkt nach Zugabe von 25  $\mu\text{L}$  LAR (Luciferase Assay Reagent: Substrat + Puffer) in einem Luminometer (Tab. 2.1) bei OD<sub>560nm</sub> vermessen. Ausnahmen bildeten die Validierungen und ausgewählte Messungen (Abschnitt 3.11.2).

### 2.3.14 Berechnung des RLU/OD Quotienten

Zur Untersuchung der Expression von *acrAB* und *acrEF* wurden die entsprechenden Stämme mit den entwickelten Reportergenplasmiden (Tab. 2.9) transformiert. Dabei wurde angenommen, dass die Luciferase-Aktivität, gemessen als emittiertes Licht, proportional zum Ansprechen des jeweiligen Promotors ist.

Die erhaltenen RLU-Werte (*relative light units*) wurden zunächst auf die OD<sub>546nm</sub> bezogen. Der daraus resultierende Quotient RLU/OD<sub>546nm</sub> entspricht der spezifischen Aktivität von

*pacrAB-luc* bzw. *pacrEF-luc*.

Für den Vergleich von parallel gezogenen Proben (Messreihen) wurden die Quotienten aufeinander bezogen. Dabei wurde der Wildtyp bzw. die Probe ohne Zugabe von Substanzen auf 100 % gesetzt. Der berechnete Wert wurde RLU/OD<sub>546nm</sub> % genannt und beschreibt die Veränderung in der Expression von *acrAB* bzw. *acrEF* im Vergleich zum Ausgangszustand.

### 2.3.15 Die statistische Auswertung der spezifischen Luciferase-Aktivitäten

Bei der Bestimmung der Luciferase-Aktivität (Abschnitt 2.3.13) wurden pro Anzucht für jeden Stamm neun RLU-Werte erhalten (Dreifachbestimmung). Für die Ermittlung der spezifischen Luciferase-Aktivitäten wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet. Die relative Standardabweichung musste mindestens unter 20 % liegen, ergab in der überwiegenden Anzahl der Fälle Werte unter 10 %. Dieser Mittelwert wurde zur Bildung des RLU/OD Quotienten benutzt.

Aufgrund der dreifachen Bestimmung sind für jeden Stamm drei RLU/OD Quotienten in den Ergebnis-Tabellen in Kapitel 3 aufgeführt, wobei die jeweiligen relativen Standardabweichungen übersichtshalber nicht mit aufgeführt wurden.

Aus diesen drei RLU/OD Quotienten konnte wiederum der entsprechende Quotient für die spezifische Luciferase-Aktivität RLU/OD % (Abschnitt 3.11.4) als Mittelwert mit einer Standardabweichung erhalten werden, der in den Tabellen und Graphiken in Kapitel 3 dargestellt wird.

Um die Signifikanz bei  $\alpha = 0,05$  der RLU/OD %-Unterschiede zwischen zwei Proben zu überprüfen, wurde der t-Test (Vergleich der Mittelwerte: zweiseitig ( $\mu_1 \neq \mu_2$ ), heteroskedastisch) durchgeführt, der p-Wert berechnet und in Kapitel 3 jeweils mit aufgeführt.

Zur weiteren Überprüfung der so erhaltenen Ergebnisse wurde der p-Wert parallel mit Hilfe des U-Testes (Mann-Whitney-Test, nicht-parametrisch) bestimmt. Die daraus resultierenden Werte sind nur im Falle einer Abweichung die Signifikanz betreffend in Kapitel 3 mit aufgeführt.

### 2.3.16 Berechnung des RLU/KBE Quotienten

Eine Variante des in Abschnitt 2.3.14 beschriebenen Quotienten stellt der RLU/KBE bzw. RLU/KBE % Quotient dar, der analog berechnet wird.

Hier wird der luminometrisch erfasste RLU-Wert auf die KBE/mL bezogen. Die Probenziehung zur KBE-Bestimmung (Abschnitt 2.2.2) erfolgte parallel, d.h. bei der gleichen OD<sub>546nm</sub>, wie die Probenziehung zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität.

### 2.3.17 Komplementations-Assay: MarR

Der Komplementationeffekt beruht auf der Wiederherstellung des "normalen" Phänotyps durch Einbringen und Expression des ursprünglichen, unveränderten Gens in das Bakterium. Dadurch ist es möglich die Ursachen (Mutationen in bestimmten Genen), die für einen bestimmten Phänotyp verantwortlich sind, ausfindig zu machen. Voraussetzung dafür ist, dass das eingebrachte Gen dominant ist.

Für die MarR-Komplementation wurde das Plasmid pBP591 verwendet. Das in diesem Vektor inserierte *marR* steht unter der Kontrolle des TEM-1-Promotors (*pbla*,  $\beta$ -Lactamase). Nach Übertragung von pBP591 und von pBP507 als Ausgangs-Kontrolle in die entsprechenden Stämme durch Konjugation (Abschnitt 2.3.11), wurde eine MHK-Bestimmung der Transkonjuganten durchgeführt. Dabei wurde so vorgegangen wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, mit der Ausnahme, dass zum McFarland-Standard 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Gentamicin (Abb. 2.5) als Selektionsdruck für die Plasmide hinzugefügt wurde.

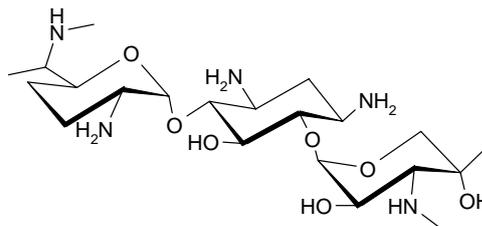
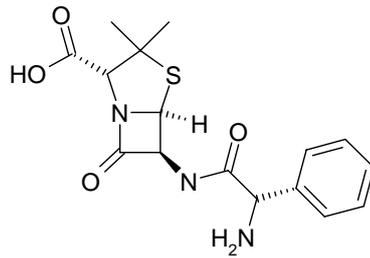


Abbildung 2.5: Gentamicin

### 2.3.18 Komplementations-Assay: MarA

Ausgehend vom gleichen Prinzip wie in Abschnitt 2.3.17 wurde für die MarA-Komplementation das Überexpressions-Plasmid pPHB338 verwendet. Das hierin enthaltene *marA* steht unter der Kontrolle des induzierbaren Arabinose-Promotors (*araC-paraB*). Nach Transformation der entsprechenden Stämme mit pPHB338 und pBR322 als Kontrolle, wurden MHK-Bestimmungen (Abschnitt 2.2.3) durchgeführt, allerdings wurde hier dem McFarland-Standard 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin (Abb. 2.6) als Selektionsdruck zugesetzt.



**Abbildung 2.6:** Ampicillin

Des Weiteren wurden immer drei Ansätze parallel untersucht:

1. ohne Zusatz
2. Zugabe von 15 mM L-Arabinose (Induktion des Promotors)
3. Zugabe von 15 mM D-Glukose (Repression des Promotors)

Durch den vorgeschalteten Arabinose-Promotor kann die Überexpression von *marA* insofern gesteuert werden, als dass bei Zugabe von L-Arabinose eine Induktion erfolgt und bei Zugabe von D-Glukose x H<sub>2</sub>O eine Repression [116].

## 2.4 Molekularbiologische Methoden: Proteine

In diesem Teil wird die Bestimmung der Gesamt-Proteinmenge beschrieben, die als Bezugsgröße für die spezifische Aktivität der Reportergenplasmide verwendet wurde. Dabei wurden die 1 mL Proben parallel zu den Proben für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität (Abschnitt 2.3.13) gezogen.

### 2.4.1 Proteinisolierung

Die 1 mL Proben wurden für 5 min bei 17.000 rpm und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 500  $\mu$ L 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen (gevortext) und unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden durch Zugabe von 500  $\mu$ L 0,3 M NaOH und 15 min Inkubation auf dem Wasserbad bei ca. 90°C die Zellen aufgeschlossen. Die Proben wurden abzentrifugiert für 10 min bei 17.000 rpm und 4°C. Die Proben für die Proteinbestimmung in Abschnitt 2.4.2 wurden direkt aus dem Überstand entnommen.

### 2.4.2 Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration

Das Prinzip des *RC DC Protein Assays* beruht auf der Lowry-Reaktion. Hierbei wird ausgenutzt, dass Proteine mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex ausbilden (Biuret-Reaktion). Die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen des Komplexes werden zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert und bilden nun mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz einen instabilen blauen Komplex [143]. Dessen Absorptionsmaximum kann bei 750 nm bestimmt werden und dient als Maß für die Proteinmenge.

Bei jeder Durchführung wurde, parallel zu den Proben, eine Standardverdünnungsreihe von BSA in 0,3 M NaOH hergestellt. Dabei wurden folgende Konzentrationen hergestellt: 0, 35, 50, 80, 100, 120, 150, 180, 200 und 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Zu 25  $\mu\text{L}$  Probe bzw. Standard wurden 125  $\mu\text{L}$  *RC Reagent I* pipettiert, gevortext und für 1 min bei RT inkubiert. Als nächstes wurden darauf 125  $\mu\text{L}$  *RC Reagent II* pipettiert, gevortext und für 5 min bei 15.000 rpm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt. Auf das Sediment wurden 127  $\mu\text{L}$  *RC Reagent A'* (5  $\mu\text{L}$  *DC Reagent S* auf 250  $\mu\text{L}$  *DC Reagent A*) gegeben, gevortext und für 5 min bei RT inkubiert, bis sich der Niederschlag vollständig gelöst hatte. Nach Zugabe von 1 mL *DC Reagent B* wurde sofort gevortext. Die Proben wurden 15 min bei RT stehen gelassen und anschließend bei 750 nm vermessen. Dabei war der gebildete Komplex für ca. eine Stunde stabil. Die Auswertung der Proteinmenge erfolgte über die Geradengleichung der Standardkurve.

### 2.4.3 Berechnung des RLU/Proteinmenge Quotienten

Die Bestimmung des RLU/Proteinmenge Quotienten bzw. des RLU/Proteinmenge Quotienten % erfolgte analog zu Abschnitt 2.3.14 und 2.3.16.

Die zugrunde gelegte Proteinmenge für den Quotienten war dabei nicht die mg/mL Angabe, sondern die Menge [mg], die in den 90  $\mu\text{L}$  Probe zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität (Abschnitt 2.3.13) enthalten sind.

Die statistische Auswertung wurde wie in Abschnitt 2.3.15 für den RLU/OD Quotienten beschrieben durchgeführt.

## 2.5 Methoden der Bioinformatik

### 2.5.1 Multiples Alignment mit ClustalW

Zur vergleichenden Analyse von zwei Nuklein- oder Aminosäuresequenzen werden sogenannte paarweise Sequenzalignments eingesetzt. Das grundlegende Prinzip zur Konstruktion eines

optimalen Alignments funktioniert vereinfacht so, dass man zunächst die Sequenzen paart und die Qualität der Übereinstimmung berechnet. Dann verschiebt man die eine gegen die andere Sequenz und schaut, ob sich die Bewertung (*score*) verbessert. Das macht man solange, bis die optimal bewertete Anpassung gefunden wurde.

Eine Standardsoftware für ein Multiples Sequenz-Alignment (Vergleich mehrerer Sequenzen gleichzeitig) ist ClustalW [31, 214]. Hier beruht das Prinzip auf einer sogenannten Heuristik. Zunächst werden alle paarweisen Alignments und deren Bewertungen (*scores*) berechnet. Aus den so ermittelten Bewertungen wird ein Baum ("Guide-Tree") berechnet, der die Reihenfolge festlegt, in der die paarweisen Alignments kombiniert werden. Sodann werden sukzessive die am nächsten benachbarten Sequenzpaare auf den äußersten Baumzweigen unter Verwendung eines speziellen Algorithmus (DP-Verfahren: *dynamic programming*) miteinander verglichen. Jedes neu hinzugekommene Alignment wird analysiert und als Grundlage für ein Sequenzprofil verwendet. Schließlich werden alle verbleibenden Profile und Sequenzen aneinander zum vollständigen Alignment angepasst. Vor Beginn kann eine Reihe von Parametern festgelegt werden [59, 112]. In dieser Arbeit wurde bei der Erstellung von Alignments ClustalW *online* auf der Internetseite vom EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatic Institute) mit den dort vorgegeben Parametern genutzt.

### 2.5.2 Energieminimierungen von 3D-Strukturmodellen

Die Energieminimierung basiert auf der Annahme, dass die berechnete Struktur eines Moleküls nur dann die biologisch relevante sein kann, wenn sie die geringste Potentialenergie aufweist. Über die Berechnung der Potentialenergien lässt sich so im Prinzip eine Optimierung eines Molekülmodells erreichen. Dabei wird die Geometrie des Moleküls iterativ so verändert, dass die Molekülenergie von Mal zu Mal verringert wird, bis ein (allerdings häufig nur lokales) Energieminimum erreicht wird. Um diese komplexe Aufgabe zu lösen, werden verschiedene mathematische Algorithmen verwendet, bei denen alle Atompositionen gleichzeitig oder nacheinander variiert werden [3].

Mitunter ist die so optimierte Molekülstruktur allerdings trotzdem nicht die "richtige", denn manchmal ist die biologisch aktive Konformation eines Moleküls nicht die, die am globalen oder überhaupt an einem Minimum der Potentialenergie liegt [3].

Die Atomkoordinaten der Proteine wurden ausschließlich aus der RCSB protein data bank (PDB) [23] bezogen. Die Strukturdaten werden dort in einem speziell zur Beschreibung von Biopolymeren entwickelten Datenformat abgespeichert (PDB-Format), das auch als Eingabeformat für die weitere Untersuchung der Proteine verwendet wurde. Für MarA wurde die PDB ID: 1BL0 [181] und für MarR die PDB ID: 1JGS [7] verwendet.

Dabei wurden zunächst bei der MarR-Struktur die Einträge zu den gebundenen Salicylsäure-Molekülen manuell aus der Datei entfernt. Des Weiteren mussten für die MarR-Struktur Aminosäureaustausche manuell vorgenommen werden, um die Struktur für WT zu erhalten (Tab. 2.25).

Anschließend wurden die Strukturen (MarA, MarR) der Punktmutanten durch manuelle Veränderung der einzelnen Aminosäuren vorbereitet (Tab. 2.25). Als Kontrollen für die Ergebnisse der MarR-Berechnungen wurden zusätzlich zwei MarR-Punktmutanten (R73C und R94C) mitgeführt, bei denen die Ursache für den Funktionsverlust beschrieben ist [7]. Im ersten Bearbeitungsschritt wurden die Ausgangsstrukturen für MarA und MarR und die Strukturen mit den veränderten Aminosäuren (Punktmutanten) äquilibriert, d.h. in eine wässrige Umgebung (Wasserbox) gerechnet, um das Milieu, indem die beiden Proteine natürlicherweise vorliegen, zu simulieren.

Im nächsten Schritt wurden dann sowohl für die Ausgangsstrukturen als auch für die der Punktmutanten Energieminimierungen durchgeführt, wobei in dieser Arbeit dazu das Programm-Paket SYBYL<sup>®</sup> (von Tripos Associated Inc., St. Louis, MO, USA) eingesetzt wurde. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2.26 aufgeführt. Soweit keine Angaben zu Parametern und Einstellungen gemacht wurden, wurden die Standardeinstellungen des Programms verwendet. Für die Visualisierung und Bearbeitung der entstandenen Bilder der Strukturen wurde das Programm USCF-Chimera verwendet (MarA: chimera beta version 1 build 2199 2006/01/24, MarR: chimera 1.2304.win32 unter Windows XP).

<b>MarA</b>	PDB ID: 1BL0
WT	keine Veränderung
MIII300S16	I58N eingefügt
MIVa300S32	N21Y eingefügt
<b>MarR</b>	PDB ID: 1JGS
WT	G103S, Y137H eingefügt
WT3-1-M26	G103S, Y137H, A53P eingefügt
WT3-1-M27	G103S, Y137H, L33P eingefügt

**Tabelle 2.25:** Liste der Strukturen, für die Energieminimierungen durchgeführt wurden

Betriebssystem	Red Hat Linux 7.2
Prozessor	2x Intel(R) Xeon(TM) CPU 3.20 GHz
Programm ( <i>molecular modelling</i> )	SYBYL <sup>®</sup> 7.2
Minimierungsmethode	Powel-Methode
Initial Optimization	Simplex
Termination	Gradienten 0,005 kcal/mol×Å
Max. Iterationen	50.000
Minimize Details	Default
Force Field	Tripos
Dielectric Constant	1
NB-Cut off	8 Å

**Tabelle 2.26:** Einstellungen und Parameter zur Energieminimierung mit SYBYL<sup>®</sup>

Zur Analyse der Ähnlichkeit zweier Molekülstrukturen können diese so überlagert werden, dass sich einander entsprechende Punkte der beiden Strukturen so nahe wie möglich kommen (Superposition). Der durchschnittliche Abstand zwischen den entsprechenden Punkten ist dann ein Maß für die Strukturähnlichkeit. Üblicherweise wird für eine solche Betrachtung der RMSD-Wert (*root-mean-square deviation*) berechnet [112]:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N_{\text{atoms}}} d_i^2}{N_{\text{atoms}}}}$$

Dabei ist  $N_{\text{atoms}}$  die Anzahl der Atome über die ein RMSD gemessen wird und  $d_i$  die Distanz der Koordinaten der Atome  $i$  in den beiden Strukturen bei Überlagerung [108].

In dieser Arbeit wurden sogenannte RMSD *fittings* durchgeführt bei denen die Überlagerung des Proteinrückgrats (*backbone*), der  $C_{\alpha}$ -Atome, der Seitenketten oder der gesamten Struktur erfolgte. Die für diese vier Superpositionen berechneten RMSD-Werte dienten als Maß für die Ähnlichkeit der Ausgangsstrukturen zu den entsprechenden Punktmutanten.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klonierung des Reportersystems pPHB331

Zur Konstruktion des Reportergenplasmids pPHB331, das für Expressionsuntersuchungen der AcrAB/TolC-Effluxpumpe in *E. coli* entwickelt wurde, musste zunächst ein PCR-Fragment generiert werden. Hierfür sollte der Promotor *pacrAB* der Effluxpumpe *in frame* mit dem Reportergen *luc* (Luciferase) fusioniert werden. Dazu wurden *pacrAB* und *luc* in zwei getrennten Ansätzen mittels PCR amplifiziert (Abschnitt 2.3.3, Tab. 2.11 und 2.12). Im nächsten Schritt wurden die beiden erhaltenen DNA-Fragmente mittels SOEing-PCR fusioniert (Abschnitt 2.3.4, Tab. 2.20). Das entstandene Fragment wurde, da durch die äußeren *Primer* die entsprechenden Schnittstellen eingeführt worden sind, für die Insertion in den Klonierungsvektor mit *Pst*I geschnitten (Abschnitt 2.3.8.1).

Als Klonierungsvektor diente das Plasmid pBR322 (4361 bp, Tab. 2.9). Dieses Plasmid enthält zwei Gene, die für Antibiotikaresistenzfaktoren codieren. Das eine Gen (*tetA*) codiert für eine Tetracyclin-spezifische Effluxpumpe und stammt aus dem natürlich vorkommenden *Salmonella* Plasmid pSC101. Das andere Gen (*bla*) codiert für die  $\beta$ -Lactamase TEM-1 und stammt aus dem Transposon Tn3. Des Weiteren enthält pBR322 einen *colE1*-Replikationsursprung (*ori*), den die DNA-Polymerase erkennt und so das Plasmid autonom, d.h. unabhängig vom bakteriellen Genom, replizieren kann. Der *colE1-ori* stammt von einem natürlichen Plasmid, das den Bakterien Resistenz gegenüber Colicinen (*Coli*-spezifische Bacteriocine) verleiht. Die Kopienzahl von pBR322 ist durch das Genprodukt des Gens *rop* beschränkt auf 15-20 Kopien pro Zelle. pBR322 fehlen die Mobilisierungsgene (*mob*), aber die sogenannte *bom* Sequenz (*basis of mobility*), eine Erkennungsstelle für die Mobilisierungsproteine, und die *nic* Sequenz, an der ein Einzelstrangsnitt vor dem Transfer bzw. der Mobilisierung erfolgt, sind noch vorhanden [28, 18].

Für die Insertion des Fusionsgens *pacrAB-luc* wurde pBR322 mit *Pst*I (Schnittstelle bei 3612bp) linearisiert (Abschnitt 2.3.8.1). Die 5'-Phosphatenden wurden anschließend mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (Abschnitt 2.3.8.2). Im Ligationsansatz wurden das geschnittene und dephosphorylierte Plasmid pBR322 und das geschnittene Fusionsgen (*pacrAB-luc*) zusammengefügt (Abschnitt 2.3.8.4). Transformiert wurde mit diesem Ligationsansatz der *E. coli*-K12-Stamm DH5 $\alpha$  (Tab. 2.10, Abschnitt 2.3.10).

Das rekombinante Reportergenplasmid pPHB331 (Abb. 3.1) weist eine theoretische Größe von 6400 bp auf und trägt noch das Tetracyclinresistenzgen (*tetA*), hat jedoch die Ampicillinresistenz (*bla*) durch das Einbringen des Fusionsgens verloren. Daher konnten positive

Klone nach Replikaplattierung (Ausstempeln) auf sowohl 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tetracyclin (Wachstum) als auch 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin (kein Wachstum) identifiziert und die Plasmide anschließend isoliert werden (Abschnitt 2.3.9.1).

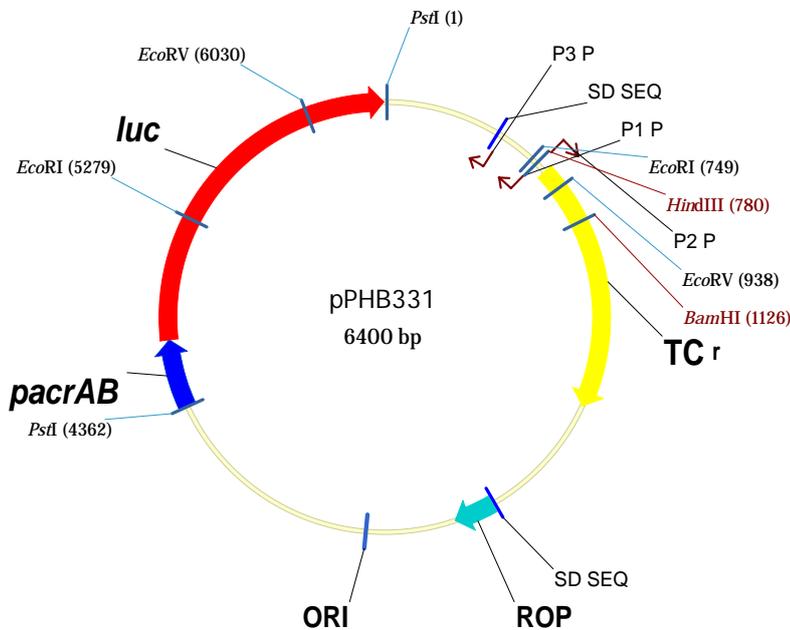


Abbildung 3.1: Vektorkarte von pPHB331

## 3.2 Charakterisierung von pPHB331

Zur Charakterisierung des rekombinanten Reportergenplasmids pPHB331 wurden drei unterschiedliche Methoden eingesetzt:

1. Um zunächst funktionelle Klone ausfindig zu machen, wurde die Luciferase-Aktivität von Übernachtskulturen bestimmt (Abschnitt 2.3.13). Damit konnten alle Klone ausgeschlossen werden, deren Genprodukt von *luc* entweder nicht vorhanden oder defekt war. Solche funktionsunfähigen Reportergenprodukte könnten durch Punktmutationen, die durch Ungenauigkeiten bei der PCR auftreten, entstanden sein.
2. Durch verschiedene Restriktionsansätze (Abschnitt 2.3.8.1) und anschließende gelelektrophoretische Auftrennung (Abschnitt 2.3.5) wurden die Größe des Plasmids, die Existenz des inserierten Fragments und die Orientierung überprüft (Datenblatt A.5,

Abb. A.1). Die im Folgenden angegebenen Größen sind die zu erwartenden, theoretisch ermittelten Werte.

Linearisiert wurde mit *Bam*HI, wobei ein 6400 bp Fragment auftrat. Nach Spaltung mit *Pst*I konnten die Banden für den Vektor pBR322 (4361 bp) und das Fusionsfragment *pacrAB-luc* (2039 bp) identifiziert werden. Zur Überprüfung der Orientierung wurde mit *Eco*RV geschnitten, wobei, durch die asymmetrische Lage einer der Schnittstellen innerhalb des *pacrAB-luc*-Anteils, zwei mögliche Kombinationen auftreten konnten. Bei Vorliegen der gewünschten Orientierung, die in der Vektorkarte von pPHB331 (Abb. 3.1) angegeben ist, entstanden die Fragmentgrößen 1308 bp und 5092 bp, für die umgekehrte Orientierung hingegen 2606 bp und 3794 bp. Beide Orientierungen traten bei dieser Klonierung auf.

3. Zur genaueren Charakterisierung des Reportergenplasmids wurden verschiedene Bereiche sequenziert (Abschnitt 2.3.12). Mit den *Primern* *acr1* und *acr2* konnte der gesamte Promotorbereich (*pacrAB*) erfasst werden. Die Sequenz für den Promotor aus dem *E. coli*-Stamm WT entsprach einer für einen *E. coli*-K12-Stamm angegebenen Sequenz [182] und ist im Datenblatt A.1 aufgeführt. Mit dem *Primer* *luc\_O3'* wurde aus dem *luc*-Gen in 3'-Richtung in den Vektor pBR322 hineinsequenziert, wodurch auf die Orientierung nochmals Rückschlüsse gezogen werden konnten. Auf die vollständige Sequenzierung von *luc* wurde verzichtet, da die Funktionalität durch die Bestimmung der Luciferase-Aktivität schon erwiesen war.

### 3.3 Umklonierung des Reportergensystems pPHB331 zu pPHB335

Um Untersuchungen der Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe auch in *E. coli*-Stämmen mit hochgradiger Tetracyclinresistenz durchführen zu können, musste die Selektion des Reportergenplasmids über eine andere Resistenz erfolgen.

Dafür wurde das Gen für die Kanamycinresistenz (codiert für die Tn5 Neomycin Phosphotransferase) mit *Xba*I aus dem Plasmid pKD4 (Tab. 2.9) herausgeschnitten (Abschnitt 2.3.8.1) und nach anschließender Extraktion aus einem Agarosegel als 1405 bp Fragment isoliert (2.3.6.2). Die Linearisierung des Plasmids pPHB331 erfolgte mit *Bam*HI über die Restriktionsschnittstelle (1126 bp) innerhalb des Gens *tetA* (Tetracyclinresistenz). Für die Insertion des Kanamycinresistenzgens in den linearisierten Vektor mussten, sowohl für das Fragment, als auch für den Vektor, *blunt ends* mit dem *Large* (Klenow) Fragment generiert werden (Abschnitt 2.3.8.3). Das so vorbereitete Plasmid pPHB331 (Tab. 2.9) wurde im nächsten Schritt dephosphoryliert (Abschnitt 2.3.8.2) und mit dem Kanamycinresistenzgenfragment ligiert (Abschnitt 2.3.8.4). Mit diesem Ligationsansatz wurde DH5 $\alpha$  transformiert (Tab. 2.10, Abschnitt 2.3.10).

Das rekombinante Reportergenplasmid pPHB335 (theoretisch 7805 bp, Abb. 3.2) trägt das

Gen für die Kanamycinresistenz und das Fusionsfragment *pacrAB-luc* für Promotoraktivitätsuntersuchungen. Das Tetracyclinresistenzgen (*tetA*) ist durch die Insertion des Kanamycinresistenzgens an dieser Stelle verloren gegangen. Daher konnten positive Klone nach Replikaplattierung (Ausstempeln) auf sowohl 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamycin (Wachstum) als auch 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tetracyclin (kein Wachstum) identifiziert und die Plasmide anschließend isoliert werden (Abschnitt 2.3.9.1).

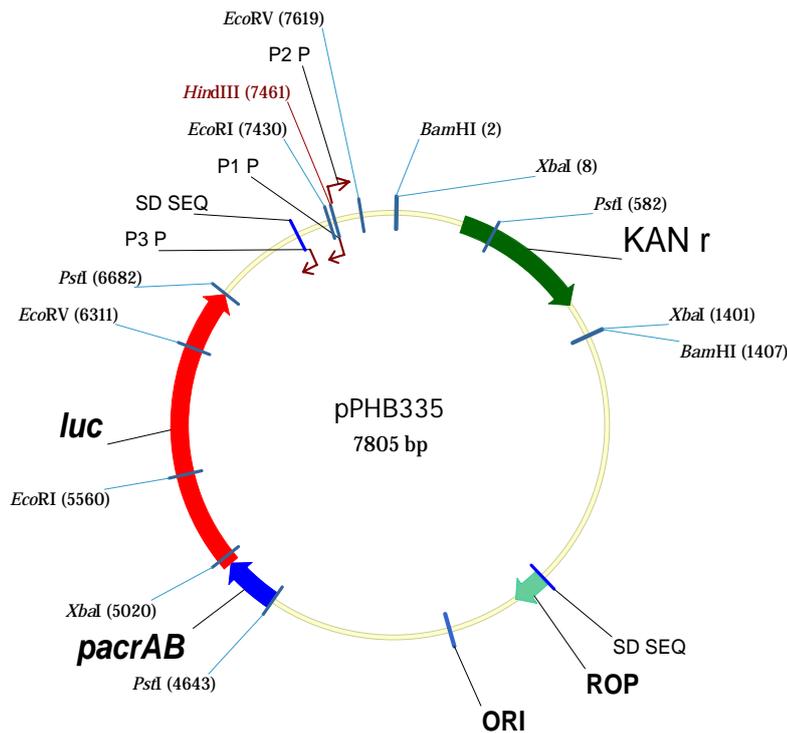


Abbildung 3.2: Vektorkarte von pPHB335

### 3.4 Charakterisierung von pPHB335

Zur Charakterisierung des Reporterplasmids pPHB335 wurden verschiedene Restriktionen durchgeführt (Abschnitt 2.3.8.1) und die Fragmentgrößen anschließend nach Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.5) analysiert (Datenblatt A.5, Abb. A.2 und A.3). Die im Folgenden angegebenen Größen sind die zu erwartenden, theoretisch ermittelten Werte.

Zur Überprüfung der Größe wurde mit *HindIII* linearisiert (7805 bp). Nach Spaltung mit *BamHI* konnten das inserierte Fragment (1405 bp) und der Vektor (6400 bp) aufgetrennt werden. Um die Orientierung des eingeführten Kanamycinresistenzgens zu ermitteln, wur-

de mit *Pst*I geschnitten. Hierbei entstanden, wie unter Verwendung der Vektorkarte von pPHB335 (Abb. 3.2) zu erkennen, drei Fragmente mit den Größen 1705 bp, 2039 bp und 4061 bp. Bei entgegengesetzter Orientierung des Inserts wurden die Größen 1958 bp, 2039 bp und 3808 bp erhalten. Beide Orientierungen traten bei dieser Klonierung auf.

### 3.5 Klonierung des Reportergensystems pPHB333

Aufgrund der uneinheitlichen Datenlage bezüglich der Sequenz des Promotors der Gene für die AcrEF/TolC-Effluxpumpe, musste *pacrEF* zunächst untersucht werden. Unter Verwendung der Primer *pacrEF*-Ia5' /-Ib5' /-IIa3' und -IIb3' in verschiedenen Kombinationen wurde *pacrEF* aus dem Stamm WT (Tab. 2.10) amplifiziert (Abschnitt 2.3.3, Tab. 2.18) und anschließend sequenziert (Abschnitt 2.3.12). Die dadurch erhaltene Sequenz für WT weist im Vergleich zur für einen *E. coli*-K12-Stamm angegebene Sequenz [182] 22 Basenpaaraustausche auf (Datenblatt A.2).

Zur Konstruktion eines Reporterplasmids für Untersuchungen der Aktivität des Promotors von *acrEF* in *E. coli* wurde analog zu Abschnitt 3.1 vorgegangen. Im ersten Schritt wurden der Promotor *pacrEF* und das Reporterogen *luc* in zwei getrennten PCR-Ansätzen amplifiziert (Abschnitt 2.3.3, Tab. 2.13 und 2.14). Die Fusion der beiden DNA-Fragmente erfolgte *in frame* mittels SOEing-PCR (Abschnitt 2.3.4, Tab. 2.21). Über die mit den Primern eingeführten *Pst*I-Schnittstellen wurde das Fusionsfragment in den, mit *Pst*I geschnittenen und dephosphorylierten, Vektor pBR322 ligiert (Abschnitte 2.3.8.1, 2.3.8.2, 2.3.8.4). Mit diesem Ligationsansatz wurde DH5 $\alpha$  transformiert (Tab. 2.10, Abschnitt 2.3.10).

Das rekombinante Reporterplasmid pPHB333 (Abb. 3.3) weist eine theoretische Größe von 6616 bp auf und trägt zu Selektionszwecken das Tetracyclinresistenzgen (*tetA*). Die Ampicillinresistenz (*bla*) hingegen ist durch die Insertion verloren gegangen. Daher konnten positive Klone nach Replikaplattierung (Ausstempeln) auf sowohl 10  $\mu$ g/mL Tetracyclin (Wachstum) als auch 100  $\mu$ g/mL Ampicillin (kein Wachstum) identifiziert und die Plasmide anschließend isoliert werden (Abschnitt 2.3.9.1).

### 3.6 Charakterisierung von pPHB333

Zur Charakterisierung des rekombinanten Reporterplasmids pPHB333 wurden wie in Abschnitt 3.2 drei unterschiedliche Methoden eingesetzt:

1. Um zunächst funktionelle Klone ausfindig zu machen, wurde die Luciferase-Aktivität von Übernachtskulturen bestimmt (Abschnitt 2.3.13). Hierbei musste beachtet werden, dass *acrEF* in den meisten Stämmen nur sehr schwach exprimiert wird, wodurch kein

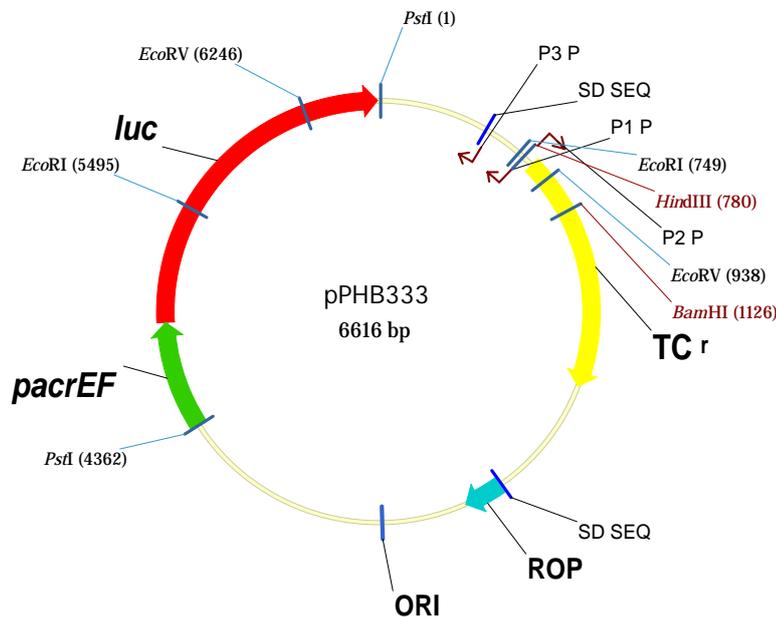


Abbildung 3.3: Vektorkarte von pPHB333

sehr starkes Signal in Form der RLU erwartet werden konnte. Die erhaltenen RLU-Werte waren jedoch relativ zur Hintergrundaktivität (Abschnitt 3.11) signifikant unterschiedlich.

- Das *Screening* erfolgte durch verschiedene Restriktionsansätze (Abschnitt 2.3.8.1) und anschließende gelelektrophoretische Auftrennung (Abschnitt 2.3.5). Hierbei wurden die Größe des Plasmids, die Existenz des inserierten Fragments und die Orientierung überprüft (Datenblatt A.5, Abb. A.4). Die im Folgenden angegebenen Größen sind die zu erwartenden, theoretisch ermittelten Werte.

Linearisiert wurde mit *Bam*HI, wobei ein 6616 bp Fragment auftrat. Nach Verdau mit *Pst*I konnten die Banden für den Vektor pBR322 (4361 bp) und das Fusionsfragment *pacrEF-luc* (2255 bp) identifiziert werden. Zur Überprüfung der Orientierung wurde mit *Eco*RV geschnitten, wobei, durch die asymmetrische Lage der Schnittstelle innerhalb des Inserts (*pacrEF-luc*), zwei mögliche Kombinationen auftreten konnten. Für die gewünschte Orientierung, die in der Vektorkarte von pPHB333 (Abb. 3.3) angegeben ist, entstanden die Fragmentgrößen 1308 bp und 5308 bp, für die umgekehrte Orientierung hingegen 2825 bp und 3791 bp. Beide Orientierungen traten bei dieser Klonierung auf.

- Um das Reporterplasmid vollständig zu überprüfen, wurde das komplette Fusionsfragment *pacrEF-luc* sequenziert (Abschnitt 2.3.12, Datenblatt A.2). Damit sollte ausgeschlossen werden, dass es durch Mutationen in *luc* zu den niedrigen RLU-Werten kommt.

### 3.7 Klonierung des MarA-Überexpressionsplasmids pPHB338

Für die Überexpression von *marA* in *E. coli*-Stämmen wurde das Plasmid pPHB338 konstruiert. Zunächst wurden *marA* aus dem Stamm WT (Tab. 2.10) und der Arabinose-Promotor (*araC-paraB*) aus dem Plasmid pKD46 [40] (Tab. 2.9) mittels PCR einzeln amplifiziert (Abschnitt 2.3.3, Tab. 2.15 und 2.16). Im nächsten Schritt wurde über SOEing-PCR *in frame* ein Fusionsfragment generiert, in dem das *marA*-Gen unter der Kontrolle des Arabinose-Promotors (*araC-paraB*) steht (Abschnitt 2.3.4, Tab. 2.22).

Die über die entsprechenden *Primer* eingeführten Schnittstellen für *NheI* konnten zur Insertion in pBR322 genutzt werden. Der Klonierungsvektor pBR322 wurde dafür ebenfalls mit *NheI* geschnitten (Schnittstelle 229 bp, Abschnitt 2.3.8.1) und zudem mit Alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (Abschnitt 2.3.8.2). Nach Ligation (Abschnitt 2.3.8.4) und damit Insertion des Fusionsfragments (*araC-paraB-marA*) in pBR322 erfolgte die Transformation von DH5 $\alpha$ -Zellen (Tab. 2.10, Abschnitt 2.3.10).

Die entstandenen positiven Klone wurden durch Replikaplattierung auf 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin (Wachstum) und 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tetracyclin (kein Wachstum) identifiziert. Anschließend wurde eine Plasmidisolierung durchgeführt (Abschnitt 2.3.9.1), wodurch das 6045 bp (theoretisch) große rekombinante Plasmid pPHB338 (Abb. 3.4) erhalten werden konnte. Dieses Überexpressionsplasmid pPHB338 trägt zur Selektion noch das Ampicillinresistenzgen (*bla*), hat jedoch durch das Einbringen des Fusionsfragments die Tetracyclinresistenz (*tetA*) verloren.

### 3.8 Charakterisierung von pPHB338

Zur Charakterisierung von pPHB338 wurden folgende Methoden durchgeführt:

1. Zunächst wurde durch Linearisierung mit *PvuI* und anschließender Gelelektrophorese eine Größenbestimmung (6045 bp) durchgeführt. Mittels Restriktionsverdau mit *EcoRV* konnte dann die Orientierung des Fragments überprüft werden (Abschnitt 2.3.8.1). Für die Orientierung, die der Vektorkarte in Abbildung 3.4 entspricht, wurden zwei Fragmente mit den Größen 5687 bp und 358 bp, bei entgegengesetzter Orientierung von *araC-paraB-marA* 4635 bp und 1410 bp, erhalten (Datenblatt A.5, Abb. A.5). Beide Orientierungen traten auf. Die angegebenen Größen entsprechen den zu erwartenden, theoretisch ermittelten Werten.
2. Zur genaueren Charakterisierung des Überexpressionsystems wurden *marA* (Datenblatt A.3) und ein großer Bereich des Arabinose-Promotors sequenziert (Abschnitt 2.3.12).

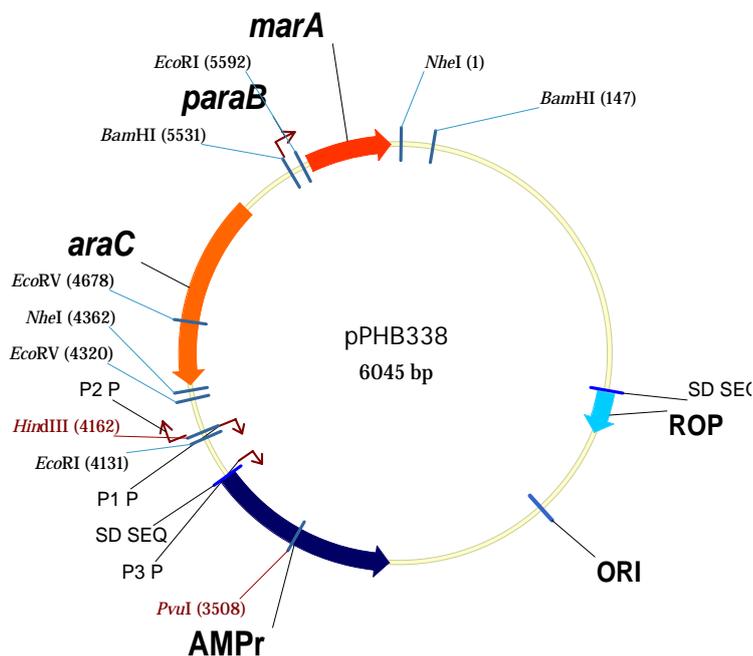


Abbildung 3.4: Vektorkarte von pPHB338

### 3.9 Umklonierung des MarA-Überexpressionsplasmids pPHB338 zu pPHB1838

Für die gleichzeitige Überexpression von *marA* und Quantifizierung der Aktivität des Promotors von *acrAB* musste *araC-paraB-marA* in das Plasmid pACYC184 umkloniert werden. Grund dafür ist die Tatsache, dass zwei Plasmide mit dem gleichen *ori* nicht kompatibel sind, d.h. nicht in der gleichen Zelle coexistieren können. Da der Klonierungsvektor pACYC184 das Replicon *rep* (p15A) anstelle des *colE1-oris* besitzt, ist es möglich pPHB335 und pPHB1838 zusammen in einer Zelle zu halten und die entsprechenden Messungen durchzuführen.

Durch Restriktion von pPHB338 mit *NheI* wurde *araC-paraB-marA* nach anschließender Extraktion aus einem Agarosegel gewonnen (Abschnitte 2.3.8.1 und 2.3.6.2). Der Vektor pACYC184 wurde innerhalb des Chloramphenicolresistenzgens mit *NcoI* geschnitten (Schnittstelle 3945 bp). Die Enden sowohl des Fragments als auch des Vektors wurden mit dem *Large* (Klenow) Fragment zu glatten (*blunt*) Enden aufgefüllt (Abschnitt 2.3.8.3). Nach Dephosphorylierung (Abschnitt 2.3.8.2) des Klonierungsvektors wurde *araC-paraB-marA* mit pACYC184 ligiert (Abschnitt 2.3.8.4). Kompetente DH5 $\alpha$ -Zellen wurden mit diesem Ligationsansatz transformiert (Tab. 2.10, Abschnitt 2.3.10).

Das rekombinante Plasmid pPHB1838 (Abb. 3.5) weist eine theoretische Größe von 5921 bp auf und ist Tetracyclin-resistent. Die Chloramphenicolresistenz ist durch die Insertion von

*araC*-*paraB*-*marA* verloren gegangen. Daher konnten positive Klone durch Replikplattierung (Ausstempeln) auf 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tetracyclin (Wachstum) und 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Chloramphenicol (kein Wachstum) identifiziert und die Plasmide anschließend isoliert werden (Abschnitt 2.3.9.1).

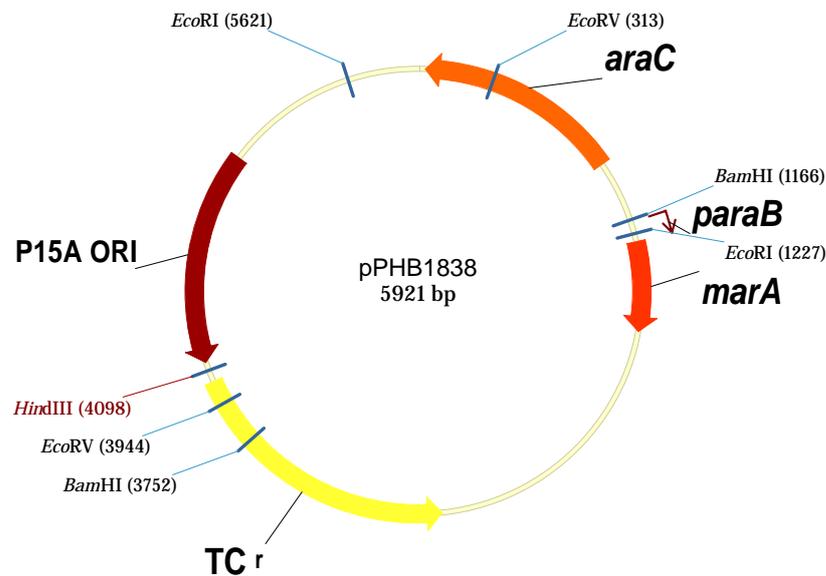


Abbildung 3.5: Vektorkarte von pPHB1838

### 3.10 Charakterisierung von pPHB1838

Zur Charakterisierung des Überexpressionsvektors pPHB1838 wurde dieser mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten (Abschnitt 2.3.8.1) und die Fragmente anschließend nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Abschnitt 2.3.5) analysiert (Datenblatt A.5, Abb. A.6). Die im Folgenden angegebenen Größen sind die zu erwartenden, theoretisch ermittelten Werte.

Die Größenabschätzung erfolgte mittels Linearisierung durch *HindIII* (5921 bp). Die Orientierung des umklonierten Fragments *araC*-*paraB*-*marA* konnte durch einen *EcoRI*-Verdau ermittelt werden. Hierbei entstanden, durch die asymmetrische Lage der Schnittstelle innerhalb von *araC*-*paraB*-*marA*, zwei mögliche Kombinationen zweier Fragmente. Bei Verwendung der für pPHB1838 angegebenen Vektorkarte in Abbildung 3.5 wurden zwei Fragmente von 4394 bp und 1527 bp, bei entgegengesetzter Orientierung des Inserts 5167 bp und 754 bp, erhalten. Bei dieser Klonierung traten beide Orientierungen auf.

### 3.11 Entwicklung der optimalen Messbedingungen für die Reportergensysteme

In Abschnitt 2.3.13 wurde bereits die Bestimmung der Luciferase-Aktivität beschrieben, die nach Transformation (Abschnitt 2.3.10) der verschiedenen Stämme mit den Reportergensystemen pPHB331, pPHB335 und pPHB333, durchgeführt wurde. Im Folgenden sollen nun die Kontroll-Messungen, die im Vorfeld zur Festlegung der Messbedingungen erforderlich waren, beschrieben werden.

#### 3.11.1 Null-Kontrolle

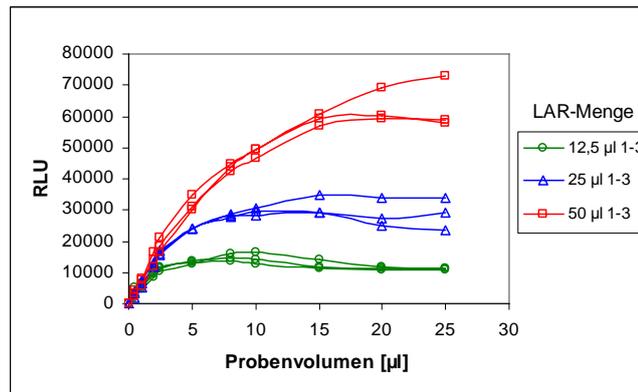
Um das Ausmaß der Hintergrundaktivität zu bestimmen, wurden sowohl Messungen mit dem Klonierungsvektor pBR322 als auch mit pBR322-luc durchgeführt (Tab. 2.9). Dazu wurden verschiedene Stämme mit diesen beiden Vektoren (DH5 $\alpha$ , MI, MII und MIII) transformiert (Abschnitt 2.3.10.2) und die Luciferase-Aktivität (Abschnitt 2.3.13) bestimmt. Hierbei konnten RLU-Werte für pBR322 von  $0,045 \pm 18 \%$  und für pBR322-luc von  $1,1 \pm 39 \%$  erhalten werden.

#### 3.11.2 LAR- und Probenvolumen

Bei der Ermittlung des geeigneten Volumens von Probe und LAR (Luciferase Assay Reagent) wurde nach einem Konzentrationsbereich gesucht, in dem eine lineare Korrelation zwischen der Aktivität (Luciferase-Konzentration in der Probe) und der Substratmenge (Luciferin, ATP) besteht. So sollte gewährleistet werden, dass das Ausmaß der Luciferase-Aktivität vollständig erfasst wird.

Für die Bestimmung des linearen Bereichs wurden verschiedenen Probenvolumina (0,5-25  $\mu\text{L}$ ) drei unterschiedliche Mengen LAR (12,5, 25 und 50  $\mu\text{L}$ ) zugesetzt. Dabei wurden Proben von dem Stamm verwendet, mit dem die höchsten RLU-Werte erzielt werden konnten (WT3-1-M21 mit pPHB335). Die Ergebnisse der Dreifach-Bestimmungen sind der Abbildung 3.6 zu entnehmen.

Aufgrund der Ergebnisse wurden in dieser Arbeit die Bestimmungen der Luciferase-Aktivität mit einem Probenvolumen von 2,5  $\mu\text{L}$  und einem LAR-Volumen von 25  $\mu\text{L}$  durchgeführt. Bei einem Probenvolumen unter 2,5  $\mu\text{L}$  wurde eine schlechtere Reproduzierbarkeit aufgrund von Pipettierungenauigkeiten beobachtet. Da sich bei einem eingesetzten Volumen LAR von 25  $\mu\text{L}$  die für WT3-1-M21 erhaltenen Werte schon fast außerhalb des linearen Bereichs befinden, wurde bei der Vermessung der *mar*-Mutanten (Abschnitt 3.12.6) der Versuch sowohl



**Abbildung 3.6:** Ermittlung der einzusetzenden Mengen Probe und LAR

mit 25 µL als auch mit 50 µL LAR durchgeführt. Hierbei konnte jedoch für die RLU/OD % Werte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. So war eine Reduktion der LAR-Menge auf 25 µL im Vergleich zu der vom Hersteller (Promega) empfohlenen Menge von 100 µL möglich.

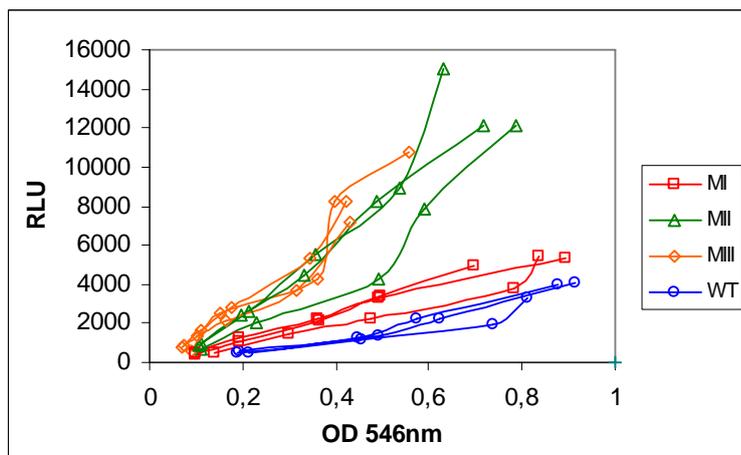
#### 3.11.3 Zeitpunkt der Probenziehung

Um den Zeitpunkt der Probenziehung für die Messungen mit den Reportergenplasmiden definieren zu können, wurden für verschiedene Stämme bei verschiedenen ODs (546 nm) Proben gezogen und der Verlauf der Graphen betrachtet. In Abbildung 3.7 sind jeweils Ergebnisse von Dreifach-Bestimmungen für die Stämme WT, MI, MII und MIII zu sehen. Diese Messungen wurden unabhängig von einander an unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

Zu erkennen ist, dass bei höheren OD-Werten bestehende Unterschiede in den absoluten RLU-Werten stärker ausgeprägt sind. Gleichzeitig nehmen bei steigender Zelldichte jedoch auch die relativen Standardabweichungen zu. Bei der Beurteilung wurde eine Messung (untere grüne Linie) für MII als Ausreißer betrachtet, was Wiederholungen der Messung bestätigten.

Unter Berücksichtigung des Wachstumsverhaltens von Bakterien wurde der OD-Bereich zwischen 0,4-0,65 für geeignet bestimmt. Zum Einen, da sich die *E. coli*- Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase (linearer Bereich) befinden und hier eine lineare Korrelation zwischen dem OD<sub>546nm</sub>-Wert und dem gemessenen absoluten RLU-Wert besteht [146]. Zum Anderen, da in diesem Bereich Unterschiede zwischen Stämmen deutlich zu erkennen sind mit relativen Standardabweichungen von in der Regel < 10 % (immer < 20 %).

Entscheidend war bei den folgenden Messungen, dass für zu vergleichende Stämme oder Bedingungen die Proben am gleichen Tag bei möglichst exakt der gleichen OD<sub>546nm</sub> gezogen wurden.



**Abbildung 3.7:** Bestimmung der Luciferase-Aktivität verschiedener Stämme bei unterschiedlichen ODs.

#### 3.11.4 Ermittlung der spezifischen Luciferase-Aktivität

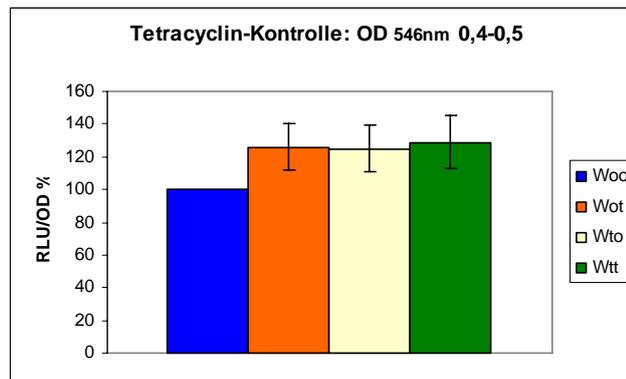
Um Schwankungen der RLU-Werte, die aufgrund von unterschiedlich hohen Bakterienzellen hervorgerufen werden, möglichst gering halten zu können, wurde die sogenannte spezifische Luciferase-Aktivität ermittelt. Hierzu ergaben sich für die absolute Luciferase-Aktivität (RLU-Wert) drei Bezugsgrößen:

1.  $OD_{546nm}$ : In erster Linie wurde mit dem RLU/OD Quotienten gearbeitet, wodurch eine gute Reproduzierbarkeit und schnelle Messung gewährleistet war. Wie in Abschnitt 3.11.3 beschrieben, wurde dabei in einem Bereich gearbeitet, in dem eine lineare Korrelation zwischen RLU-Wert und  $OD_{546nm}$  besteht. Die genaue Berechnung, die für zu vergleichende Proben durchgeführt wurde, ist in Abschnitt 2.3.14 erläutert.
2. KBE: Bei den Versuchen mit Fluorchinolonen wurde zusätzlich die KBE zum Zeitpunkt der Probenentnahme bestimmt (Abschnitt 2.2.2) und der entsprechende RLU/KBE Quotient (Abschnitt 2.3.16) berechnet. Die Ergebnisse dazu sind in Abschnitt 3.12.2 beschrieben.
3. Proteinmenge: Zur weiteren Überprüfung wurde der RLU-Wert auf die Proteinmenge bezogen (Abschnitt 2.4.3). Die Bestimmung der gesamten Proteinmenge (Abschnitt 2.4) wurde dabei exemplarisch für einigen Messreihen durchgeführt (Abschnitte 3.12.2, 3.12.3, 3.12.2, 3.12.5 und 3.12.7).

### 3.11.5 Selektionsdruck

Da Plasmide bei Abwesenheit des Selektionsdrucks den Bakterien keinen Vorteil, sondern meist einen Nachteil bezüglich der Wachstumsgeschwindigkeit, bringen, können sie nach mehreren Generationen aus der Zelle ausgeschleust werden. Die Tendenz dazu und damit die Geschwindigkeit ist Plasmid-abhängig.

Für die Versuche mussten zunächst für den zu vermessenden Stamm Übernachtskulturen angeimpft werden. Ausgehend aus diesen Übernachtskulturen wurden die Kulturen zur Probenziehung angesetzt. Zur Ermittlung der Selektionsbedingungen bei der Versuchsdurchführung wurden dabei verschiedene Ansätze inkubiert. Im einfachsten Fall wurde weder zur Übernachtskultur noch zur Versuchsanzucht Tetracyclin gegeben. Bei zwei Proben wurde entweder bei der Übernachtskultur oder bei der Versuchsanzucht Tetracyclin zur Selektion verwendet. Bei einer Probe wurde während des gesamten Versuchs mit Tetracyclin selektiert. In Abbildung 3.8 sind die Ergebnisse für pPHB331 und die Tetracyclinzugabe zu sehen.



**Abbildung 3.8:** Untersuchungen zum Selektionsdruck. Woo: keine Tetracyclinzugabe zur ÜNK und Versuchsanzucht, Wot: keine Tetracyclinzugabe zur ÜNK, aber Zugabe zur Versuchsanzucht, Wto: Tetracyclinzugabe zur ÜNK, jedoch nicht zur Versuchsanzucht, Wtt: Zugabe von Tetracyclin sowohl zur ÜNK als auch zur Versuchsanzucht.

**t-Test:**  $p_{Wot, Wto}$ : 0,94,  $p_{Wot, Wtt}$ : 0,82,  $p_{Wto, Wtt}$ : 0,76,  $p_{Woo, Wot}$ : 0,085,  $p_{Woo, Wto}$ : 0,097,  $p_{Woo, Wtt}$ : 0,088.

**U-Test:**  $p_{Woo, Wot}$ : 0,037,  $p_{Woo, Wto}$ : 0,037,  $p_{Woo, Wtt}$ : 0,037.

Hier wird ersichtlich, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Proben Wot, Wto und Wtt gibt. Die Probe Woo zeigt jedoch im Vergleich zu den anderen drei Ansätzen (Wot, Wto und Wtt) bei Überprüfung auf Signifikanz einen Unterschied.

Daher wurde für die Versuchsdurchführung die Variante gewählt, bei der zur Übernachtskultur Tetracyclin hinzugegeben wurde und bei der Versuchsanzucht nicht. Hier wird der Tatsache Rechnung getragen, dass die Übernachtskultur über einen sehr langen Zeitraum wächst, wo-

durch der Plasmidverlust wahrscheinlicher ist, was die gemessenen Werte bestätigen. Durch den Verzicht während der Anzucht der Kultur, aus der Proben gezogen werden sollten, sollte ein Effekt des Selektionsantibiotikums auf das Expressionsverhalten der Pumpen verhindert werden. Denn bei Tetracyclin handelt es sich um ein Substrat [208] und Induktor [198] der Effluxpumpe AcrAB/TolC (Abschnitt 1.5).

Bei Stämmen, die sehr langsam wuchsen und bei Stämmen, die sich in den RLU/OD %-Werten gerade eben signifikant unterschieden, wurden Kontrollversuche durchgeführt. Dabei wurde auch während der Versuchsanzucht Tetracyclin (pPHB331, pPHB333) bzw. Kanamycin (pPHB335) hinzugegeben (Abschnitte 3.12.1, 3.12.3, 3.12.4 und 3.12.6).

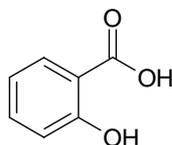
#### 3.11.6 Funktionalität der Reporterplasmide

Durch Vermessung der Übernachtskulturen positiver Klone konnte schon gezeigt werden, dass ein erhöhtes Lichtsignal durch die Reporterensysteme entsteht.

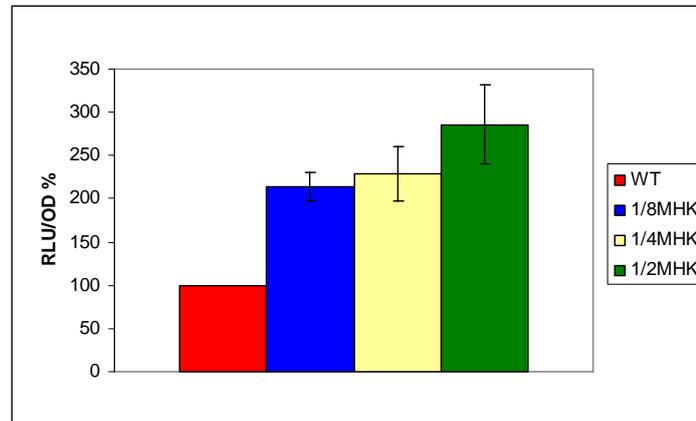
Nun musste jedoch noch bewiesen werden, dass eine Veränderungen in der Aktivität von *pacrAB* bzw. *pacrEF* und damit in der Expression von *luc* tatsächlich in Zusammenhang mit der Regulation des *acrAB*- bzw. *acrEF*-Operons steht.

Dafür wurde die spezifische Luciferase-Aktivität unter aus der Literatur [34, 65] bekannten Bedingungen untersucht, bei denen eine Erhöhung der RLU-Werte zu erwarten war.

Zunächst wurde für die Reporterensysteme pPHB331 und pPHB335 die aus der Literatur bekannte Induktion der Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe in *E. coli* durch Salicylsäure gemessen [34] (Abschnitt 1.5.3.1). Zur Untersuchung wurde der Wildtyp WT verwendet, wobei ein uninduzierter Versuchsansatz als Bezugsgröße diente. Drei weiteren Ansätzen wurden unterschiedliche Konzentrationen (0,125, 0,25 und 0,5 mg/mL) von Salicylsäure (Abb. 3.9) hinzugegeben, abgeleitet von der MHK 1 mg/mL. Die Ergebnisse sind für pPHB331 der Tabelle 3.1 und Abbildung 3.10 und für pPHB335 der Tabelle 3.2 und Abbildung 3.11 zu entnehmen.



**Abbildung 3.9:** Salicylsäure



**Abbildung 3.10:** Messung mit pPHB331: RLU/OD % von WT uninduziert im Vergleich zu drei unterschiedlichen Konzentrationen von Salicylsäure.

**t-Test:**  $p_{WT, 1/8 SAL} = 0,0015$ ,  $p_{WT, 1/4 SAL} = 0,018$ ,  $p_{WT, 1/2 SAL} = 0,019$ ,  
 $p_{1/8 SAL, 1/4 SAL} = 0,47$ ,  $p_{1/8 SAL, 1/2 SAL} = 0,1$ ,  $p_{1/4 SAL, 1/2 SAL} = 0,15$ .

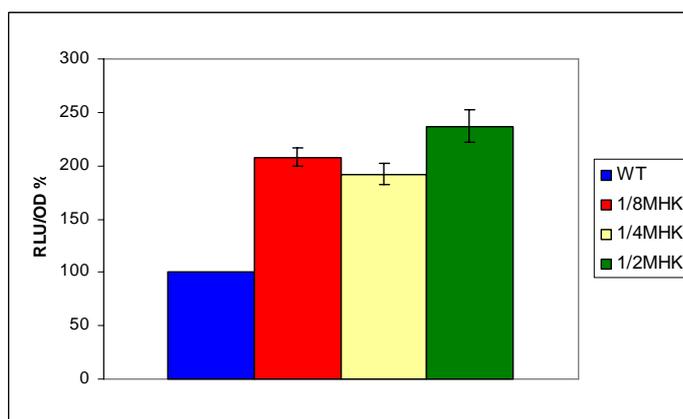
**U-Test:**  $p_{1/8 SAL, 1/2 SAL} = 0,0495$ .

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %
WT	2995	3173	2384	<b>100</b>
WT + 1/8 SAL	6645	6568	5057	<b>214 ± 8</b>
WT + 1/4 SAL	7899	6508	5223	<b>229 ± 31</b>
WT + 1/2 SAL	8984	7495	7691	<b>286 ± 45</b>

**Tabelle 3.1:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % für WT mit pPHB331 nach Zugabe von 1/8, 1/4 und 1/2 MHK Salicylsäure (SAL).

### 3 Ergebnisse

Für das Reporterplasmid pPHB331 ist für alle drei Konzentrationen eine deutliche Erhöhung in der Aktivität von *pacrAB* auf über 200 % zu erkennen. Dabei ist der erhaltene RLU/OD % Quotient für die höchste Konzentration 0,5 mg/mL Salicylsäure am ausgeprägtesten, während die beiden Werte bei Zugabe von 0,125 und 0,25 mg/mL Salicylsäure sich, bei Betrachtung der angegebenen Standardabweichungen, nicht stark voneinander unterscheiden. Für alle drei Werte ergibt sich kein signifikanter Unterschied zueinander, mit Ausnahme der Proben 0,125 mg/mL im Vergleich zu 0,5 mg/mL Salicylsäure-Zusatz (U-Test).



**Abbildung 3.11:** Messung mit pPHB335: RLU/OD % von WT uninduziert und im Vergleich zu drei unterschiedlichen Konzentrationen von Salicylsäure.

**t-Test:**  $p_{WT, 1/8 SAL} = 0,0021$ ,  $p_{WT, 1/4 SAL} = 0,0037$ ,  $p_{WT, 1/2 SAL} = 0,004$ ,  $p_{1/8 SAL, 1/4 SAL} = 0,1$ ,  $p_{1/8 SAL, 1/2 SAL} = 0,056$ ,  $p_{1/4 SAL, 1/2 SAL} = 0,017$ .

**U-Test:**  $p_{1/8 SAL, 1/2 SAL} = 0,0495$ .

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %
WT	2698	3484	3091	<b>100</b>
WT + 1/8 SAL	5603	6945	6688	<b>208 ± 9</b>
WT + 1/4 SAL	4897	6971	5987	<b>192 ± 10</b>
WT + 1/2 SAL	6581	7681	7671	<b>237 ± 15</b>

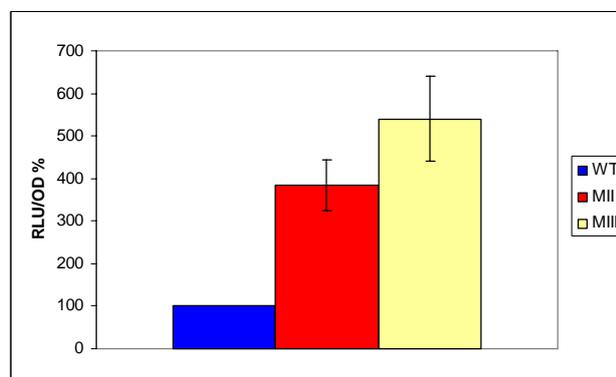
**Tabelle 3.2:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % für WT mit pPHB335 nach Zugabe von 1/8, 1/4 und 1/2 MHK Salicylsäure (SAL).

Für das Reporterplasmid pPHB335 ergibt sich ein zu pPHB331 vergleichbares Bild. Bei allen drei zugegebenen Konzentrationen der Salicylsäure zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Aktivität von *pacrAB*. Dabei ist der Effekt insgesamt etwas weniger stark ausgeprägt als

### 3.11 Entwicklung der optimalen Messbedingungen für die Reportergensysteme

bei pPHB331. Des Weiteren ist wieder die stärkste Erhöhung mit der höchsten Salicylsäurekonzentration erreicht worden, für die sich signifikante Unterschiede zu den anderen beiden Konzentration zeigen ließen.

Eine weitere Möglichkeit der Überprüfung des Reportergenplasmids pPHB331 erfolgte durch Messungen mit den *in vitro* selektierten  $\Delta marR$ -Mutanten MII und MIII (Tab. 2.10). Durch die in der Literatur beschriebenen Effekte von *marR*-Deletionen, konnte eine Erhöhung der Aktivität von *pacrAB* erwartet werden [65] (Abschnitt 1.5.3.1). Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 und Abbildung 3.12 dargestellt.



**Abbildung 3.12:** Messung mit pPHB331: RLU/OD % von MII und MIII im Vergleich zu WT.

**t-Test:**  $p_{WT, MII}$ : 0,014,  $p_{WT, MIII}$ : 0,017,  $p_{MII, MIII}$ : 0,095.

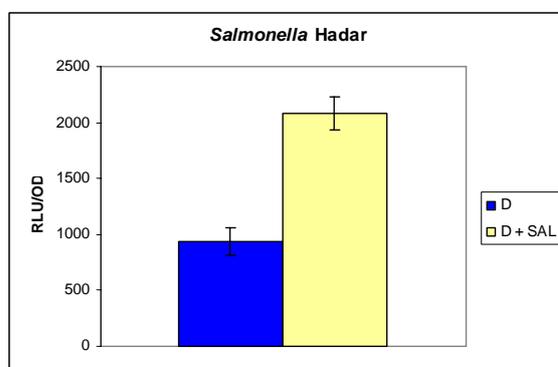
Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %
WT	2545	2532	2405	100
MII	11472	8608	8667	384 ± 59
MIII	11383	13363	15545	540 ± 100

**Tabelle 3.3:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von WT und den  $\Delta marR$ -Mutanten MII und MIII.

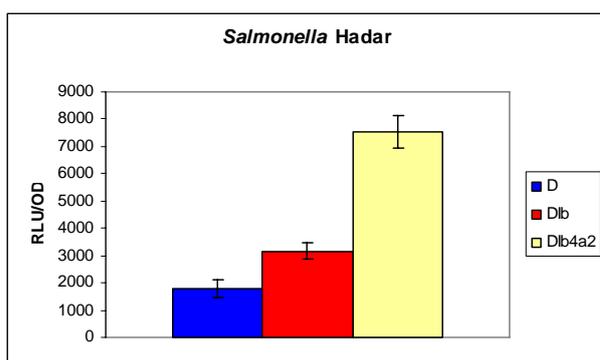
Aus den RLU/OD % Quotienten für die drei Stämme wird ersichtlich, dass die Aktivität von *pacrAB* in MII und MIII im Vergleich zum Ausgangsstamm WT mehrfach erhöht ist. Dabei ist ein Unterschied zwischen den beiden Mutanten zu erkennen, der mit den gewählten statistischen Verfahren nicht als signifikant anzusehen ist, jedoch bei Wiederholungen immer wieder auftritt.

### 3.11.7 Funktionalität des Reportergenplasmids pPHB331 in *Salmonella* Hadar

Um zu prüfen, ob das Reportergenplasmid pPHB331, das zu Untersuchungen der Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe eingesetzt wird, auch in *Salmonellen* funktionsfähig ist, wurden Einfachbestimmungen unter den gleichen Gesichtspunkten wie in Abschnitt 3.11.6 durchgeführt. Zum Einen wurde die Induktion der Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe mit 0,5 mg/mL Salicylsäure (1/2 MHK) [177] in dem *Salmonella* Hadar-Stamm D (Tab. 2.10) vermessen (Abb. 3.13). Des Weiteren wurde der Stamm Dlb4a2 vermessen, von dem bekannt war, dass die Expression von *acrAB* im Vergleich zum Wildtyp D erhöht ist (Dissertation: Silke Schmidt in Vorbereitung) (Abb. 3.14).



**Abbildung 3.13:** Messung mit pPHB331: RLU/OD des *Salmonella* Hadar-Stamm D uninduziert und nach Zugabe von Salicylsäure.



**Abbildung 3.14:** Messung mit pPHB331: RLU/OD Quotient von Dlb4a2 im Vergleich zu den Kontrollstämmen D und Dlb (Tab. 2.10).

### 3.12 Messungen der Promotoraktivität von *pacrAB*

In den folgenden Abschnitten sind alle Messungen und deren Ergebnisse, die mit pPHB331 oder pPHB335 hinsichtlich der Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe durchgeführt wurden, beschrieben. pPHB331 wurde mit 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tetracyclin und pPHB335 mit 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamycin selektiert. Die Auswertung der Daten erfolgte wie in Abschnitt 2.3.15 beschrieben.

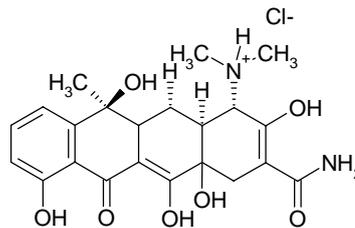


Abbildung 3.15: Tetracyclin

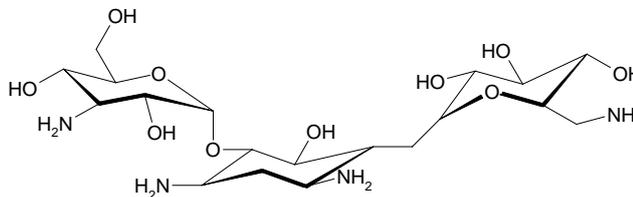


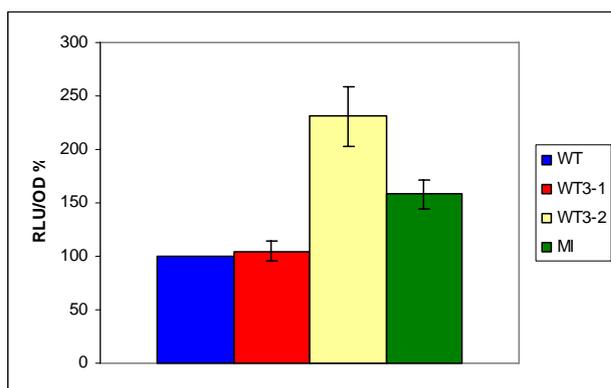
Abbildung 3.16: Kanamycin

#### 3.12.1 Einfluss von *gyrA*-Mutationen auf die Expression von *acrAB* in *E. coli*

Um zu untersuchen, ob unterschiedliche *gyrA*-Mutationen einen Einfluss auf die Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe haben, wurden die Stämme WT, WT3-1, WT3-2 und MI (Tab. 2.10) mit pPHB331 transformiert (Abschnitt 2.3.10.2). Der Ausgangsstamm WT diente dabei als Bezugsgröße für den ermittelten RLU/OD % Quotienten (Abschnitt 2.3.14). Bei WT3-1 und WT3-2 handelt es sich um *in vitro* generierte Mutanten. MI wurde hingegen *in vitro* auf Nalidixinsäure selektiert [16, 75]. In Tabelle 3.4 und Abbildung 3.17 sind die Ergebnisse dargestellt.

### 3 Ergebnisse

Für den Stamm WT3-1, mit der Doppelmutation in *gyrA* (S83L, D87G), konnte keine Veränderung in der Aktivität von *pacrAB* (RLU/OD %) zu WT ermittelt werden. Die *gyrA*-Einzelmutation S83L in MI alleine bewirkte einen geringen, aber signifikanten Effekt. Für die *gyrA*-Einzelmutation D87G in WT3-2 hingegen konnte eine deutliche, signifikante Erhöhung in der Aktivität von *pacrAB* auf  $231 \pm 28$  % gezeigt werden.



**Abbildung 3.17:** Messung mit pPHB331: RLU/OD % des Ausgangsstamm WT im Vergleich zu den *gyrA*-Mutanten WT3-1 (S83L, D87G), WT3-2 (D87G) und MI (S83L).

t-Test:  $p_{WT, WT3-1}$ : 0,44,  $p_{WT, MI}$ : 0,017,  $p_{WT, WT3-2}$ : 0,015.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD 4	RLU/OD %
WT	2545	2532	2405	2444	100
WT3-1	2872	2407	2564	ND	105 ± 9
WT3-2	ND	5679	5006	6401	231 ± 28
MI	ND	4134	3434	4094	158 ± 13

**Tabelle 3.4:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von WT und den *gyrA*-Mutanten WT3-1, WT3-2, MI.

Um durch den geringen, aber deutlichen Effekt bei MI, die Möglichkeit des Plasmidverlusts, durch den fehlenden Selektionsdruck als Einflussgröße auf die Werte ausschließen zu können, wurde der Versuch unter Zugabe von Tetracyclin zur Versuchszucht erneut durchgeführt. Die Ergebnisse sind der Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %
WT	3456	2695	2245	100
WT3-1	2483	3328	2997	109 ± 33
WT3-2	9320	9695	7170	316 ± 45
MI	3517	3219	3300	123 ± 23

**Tabelle 3.5:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von WT und den *gyrA*-Mutanten WT3-1, WT3-2, MI unter Zugabe von 10 µg/mL Tetracyclin.

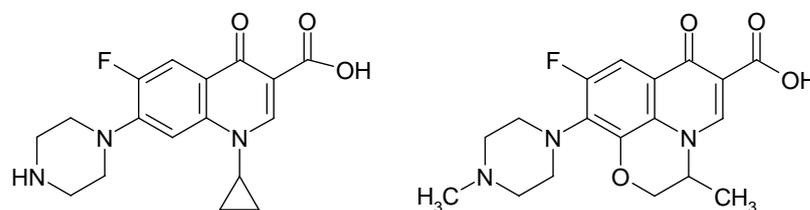
**t-Test:**  $p_{WT, MI}$ : 0,15,  $p_{WT, WT3-2}$ : 0,014,  $p_{WT, WT3-1}$ : 0,67.

**U-Test:**  $p_{WT, MI}$ : 0,037.

Hier konnten die schon gezeigten Unterschiede zwischen WT und MI bzw. WT3-2 als signifikant bestätigt werden.

### 3.12.2 Einfluss von Fluorchinolonen auf die Expression von *acrAB* in *E. coli*

Bei den Untersuchungen zum Einfluss von Fluorchinolonen (GyrA-Inhibitoren) auf die AcrAB/TolC-Effluxpumpe in *E. coli* wurde zunächst mit 0,008 µg/mL Ciprofloxacin (CIP) und 0,06 µg/mL Ofloxacin (OFL) gearbeitet (Abb. 3.18). Diese Konzentrationen entsprechen den 1/2 MHK-Werten. Die Zugabe des jeweiligen Chemotherapeutikums erfolgte bei einer  $OD_{546nm}$  zwischen 0,06-0,08. Als Ausgangsstamm wurde WT ohne Zugabe von CIP oder OFL verwendet, auf den anfangs die gemessenen RLU/OD Werte bezogen wurden. Das eingesetzte Reporterplasmid war pPHB331.

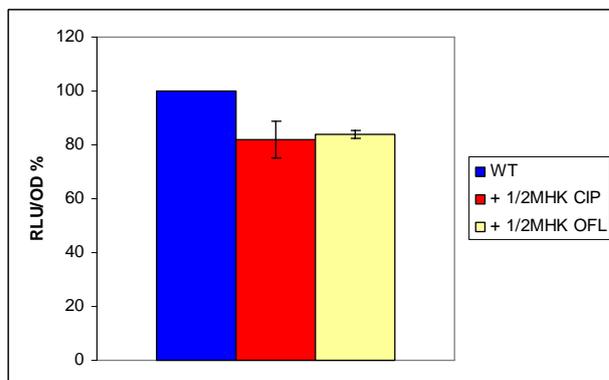


**Abbildung 3.18:** Ciprofloxacin (links) und Ofloxacin (rechts)

In Tabelle 3.6 und Abbildung 3.19 sind die aus diesen Messungen hervorgegangenen Werte und RLU/OD % Quotienten dargestellt.

### 3 Ergebnisse

Sowohl für den unter Ciprofloxacin- als auch unter Ofloxacin-Zugabe gewachsenen WT zeigt sich eine, wenn auch geringe, signifikante Abnahme in der Aktivität von *pacrAB* um ca. 15 %.



**Abbildung 3.19:** Messung mit pPHB331: RLU/OD % von WT in An- und Abwesenheit von Ciprofloxacin (CIP) bzw. Ofloxacin (OFL).  
t-Test:  $p_{WT, CIP}$ : 0,047,  $p_{WT, OFL}$ : 0,003.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %
WT	2740	3269	2440	<b>100</b>
WT + CIP	2376	2420	2078	<b>82 ± 7</b>
WT + OFL	2306	2665	2072	<b>84 ± 2</b>

**Tabelle 3.6:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von WT in An- und Abwesenheit von Ciprofloxacin bzw. Ofloxacin.

Parallel zur  $OD_{546nm}$ -Bestimmung und Probenziehung für die luminometrischen Vermessungen, wurden 100  $\mu$ L Proben für die KBE-Bestimmung entnommen (Abschnitt 2.2.2). So konnten zum Vergleich die RLU/KBE % Quotienten (Abschnitt 2.3.16) bestimmt werden. Diese Werte sind in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Stamm	RLU/KBE 1	RLU/KBE 2	RLU/KBE 3	RLU/KBE %
WT	$3,425 \times 10^{-3}$	$1,362 \times 10^{-4}$	$1,22 \times 10^{-4}$	<b>100</b>
WT + CIP	$5,94 \times 10^{-3}$	$6,04 \times 10^{-4}$	$1,039 \times 10^{-3}$	<b>489 ± 342</b>
WT + OFL	$5,765 \times 10^{-3}$	$2,22 \times 10^{-4}$	$2,072 \times 10^{-3}$	<b>676 ± 885</b>

**Tabelle 3.7:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/KBE der einzelnen Messungen, sowie der RLU/KBE % von WT in An- und Abwesenheit von Ciprofloxacin bzw. Ofloxacin.

Zu erkennen ist, dass der RLU/KBE % Quotient, aufgrund der großen Schwankungen der Messwerte und der daraus resultierenden hohen Standardabweichung, keine brauchbare Größe zur Beschreibung der Veränderung der spezifischen Luciferase-Aktivität darstellt. Es konnten keine reproduzierbaren Daten ermittelt werden.

Ebenfalls parallel während dieses Versuchs wurden Proben ( $2 \times 1$  mL) für die Proteinbestimmung gezogen (Abschnitt 2.4). Die berechneten RLU/Proteinmenge % Quotienten sind in Tabelle 3.8 aufgeführt (Abschnitt 2.4.3).

Stamm	RLU/ Proteinmenge 1	RLU/ Proteinmenge 2	RLU/ Proteinmenge 3	RLU/ Proteinmenge %
WT	274	285	259	100
WT + CIP	222	196	198	75 ± 6
WT + OFL	227	260	215	86 ± 5

**Tabelle 3.8:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/Proteinmenge der einzelnen Messungen, sowie der RLU/Proteinmenge % von WT in An- und Abwesenheit von Ciprofloxacin bzw. Ofloxacin.

**t-Test:**  $p_{WT, CIP}$ : 0,019,  $p_{WT, OFL}$ : 0,033.

Durch die ermittelten Werte konnten die Ergebnisse zum RLU/OD % Quotienten bestätigt werden. Auch hier zeigten die Proben, denen die Fluorchinolone zugesetzt wurden, eine vergleichbare Abnahme der Aktivität von *pacrAB* gegenüber der Kontrolle (WT ohne Zugabe).

In einem weiteren Versuch zum Einfluss von Fluorchinolonen wurde der Stamm MII (Tab. 2.10), ein aufgrund von *gyrA*-, *parC*- und *marR*-Mutationen gegenüber Fluorchinolonen resistenter Stamm, untersucht. Wieder wurde als Ausgangsstamm WT mitgeführt. MII [75] wurde ohne und mit Zugabe von 1/2 MHK Ciprofloxacin, was in diesem Fall 0,5  $\mu\text{g/mL}$  entspricht, vermessen. Die daraus resultierenden Einzelwerte sowie die RLU/OD % und RLU/Proteinmenge % Quotienten sind der Tabelle 3.9 zu entnehmen.

Im Vergleich zu WT zeigt MII eine aufgrund der *marR*-Deletion erwartete signifikante Erhöhung der Promotoraktivität (*pacrAB*) (Abschnitt 3.12.6). Eine signifikante Abnahme durch Ciprofloxacin konnte sowohl für den RLU/OD % als auch RLU/Proteinmenge % Quotienten gezeigt werden.

### 3 Ergebnisse

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %	RLU/ Proteinmenge %
WT	2533	2129	2938	<b>100</b>	100
MII	6639	7371	8540	<b>300 ± 43</b>	279 ± 26
MII + CIP	6277	5327	6610	<b>241 ± 14</b>	178 ± 4

**Tabelle 3.9:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % und RLU/Proteinmenge % von WT und MII in An- und Abwesenheit von Ciprofloxacin.

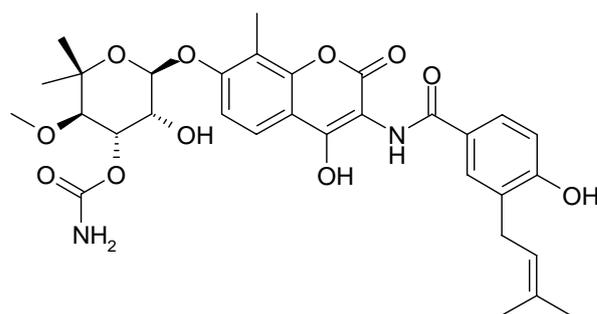
**t-Test:** (RLU/OD %)  $p_{WT, MII}$ : 0,015,  $p_{MII, CIP}$ : 0,13,

(RLU/Proteinmenge %)  $p_{MII, CIP}$ : 0,019.

**U-Test:** (RLU/OD %)  $p_{MII, CIP}$ : 0,0495

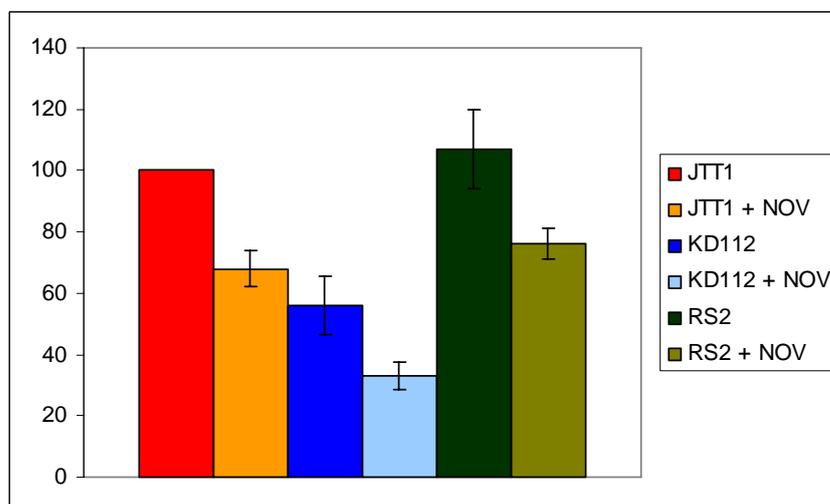
#### 3.12.3 Einfluss des Superspiralisierungsgrads auf die Expression von *acrAB* in *E. coli*

Zur Ermittlung, ob der Superspiralisierungsgrad einen Einfluss auf die Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe hat, wurde mit den Stämmen JTT1, KD112 und RS2 gearbeitet (Tab. 2.10). Im Vergleich zu ihrem Ausgangsstamm JTT1 zeigt die *gyrB*-Mutante KD112 einen verringerten und die *topA*-Mutante RS2 einen erhöhten negativen Superspiralisierungsgrad [16]. Da KD112 eine chromosomal codierte Tetracyclinresistenz besitzt, wurde mit dem Reporterplasmid pPHB335 gearbeitet. Parallel wurden Messungen mit 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  des GyrB-Inhibitors Novobiocin (NOV, Abb. 3.20) durchgeführt, der einen verringerten negativen Superspiralisierungsgrad bewirkt [16]. Bei allen drei Stämmen betrug der für Novobiocin bestimmte MHK-Wert 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Abbildung 3.20:** Novobiocin

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.10 und der Abbildung 3.21 dargestellt.



**Abbildung 3.21:** Messung mit pPHB335: RLU/OD % von KD112 und RS2 im Vergleich zum Wildtyp JTT1 in An- und Abwesenheit von Novobiocin (NOV).

**t-Test:** (RLU/OD %)  $p_{\text{JTT1, RS2}}$ : 0,47,  $p_{\text{JTT1, KD112}}$ : 0,015,  $p_{\text{JTT1, NOV}}$ : 0,012,  $p_{\text{KD112, NOV}}$ : 0,032,  $p_{\text{RS2, NOV}}$ : 0,043.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %	RLU/ Proteinmenge %
JTT1	1743	1423	1672	<b>100</b>	100
JTT1 + NOV	1179	1059	1035	<b>68 ± 6</b>	61 ± 3
KD112	805	906	990	<b>56 ± 9</b>	61 ± 8
KD112 + NOV	516	545	515	<b>33 ± 4</b>	27 ± 5
RS2	1636	1704	1781	<b>117 ± 13</b>	129 ± 25
RS2 + NOV	1298	1167	1224	<b>76 ± 5</b>	55 ± 10

**Tabelle 3.10:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % und RLU/Proteinmenge % von JTT1, der *gyrB*-Mutante KD112 und der *topA*-Mutante RS2 in An- und Abwesenheit von Novobiocin.

**t-Test:** (RLU/Proteinmenge %)  $p_{\text{JTT1, RS2}}$ : 0,18,  $p_{\text{JTT1, KD112}}$ : 0,012,  $p_{\text{JTT1, NOV}}$ : 0,0015,  $p_{\text{KD112, NOV}}$ : 0,0052,  $p_{\text{RS2, NOV}}$ : 0,024.

**U-Test:** (RLU/Proteinmenge %)  $p_{\text{JTT1, RS2}}$ : 0,037.

### 3 Ergebnisse

Zum Einen ist den Daten zu entnehmen, dass zwischen JTT1 und RS2 keine Veränderung hinsichtlich der Aktivität von *pacrAB* aufgetreten ist, KD112 jedoch im Vergleich zu JTT1 eine deutliche Abnahme von fast 50 % aufweist. Zum Anderen konnte der Effekt, der durch die *gyrB*-Mutation (KD112) hervorgerufen wurde, auch für den GyrB-Inhibitor Novobiocin gezeigt werden. Mit Novobiocin konnte bei allen drei Stämmen eine Reduktion von ca. 40 % der RLU/OD % Quotienten erreicht werden.

Parallel wurde bei dieser Versuchsreihe zur Absicherung der Ergebnisse eine Proteinbestimmung durchgeführt und die RLU/Proteinmenge % Quotienten, sowie die entsprechenden p-Werte ermittelt (Abschnitt 2.4). Diese sind ebenfalls der Tabelle 3.10 zu entnehmen.

Auch wenn die absoluten Werte sich nicht gänzlich gleichen, ist deutlich zu erkennen, dass die Tendenz der Ergebnisse bestätigt werden kann. Eine Ausnahme bildet dabei der Unterschied zwischen JTT1 und RS2, der mittels U-Test als signifikant eingestuft wurde.

Als weitere Absicherung wurde noch eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der auch zur Versuchsanzucht Selektionsdruck in Form von Kanamycin zugegeben wurde. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Tabelle 3.11 aufgelistet.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD %	RLU/ Proteinmenge %
JTT1	1464	1283	<b>100</b>	100
JTT1 + NOV	1130	955	<b>76 ± 2</b>	65 ± 3
KD112	749	520	<b>46 ± 7</b>	37 ± 10
KD112 + NOV	460	284	<b>27 ± 6</b>	19 ± 4
RS2	1384	1584	<b>109 ± 20</b>	116 ± 21
RS2 + NOV	1008	818	<b>67 ± 4</b>	55 ± 2

**Tabelle 3.11:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % und RLU/Proteinmenge % von JTT1, der *gyrB*-Mutante KD112 und der *topA*-Mutante RS2 in An- und Abwesenheit von Novobiocin unter Selektionsdruck (Kanamycin).

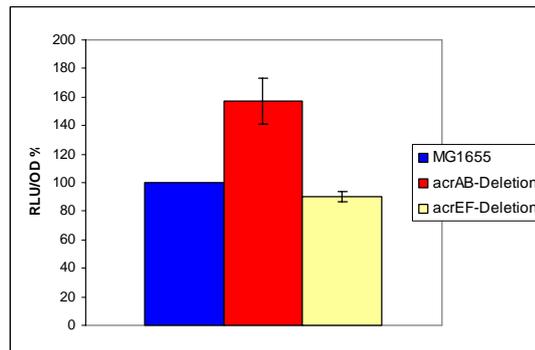
Die erhaltenen Werte bestätigen ebenfalls, die Werte, die sich ohne Zugabe von Kanamycin ergeben haben.

#### 3.12.4 Messungen der Expression von *acrAB* in *E. coli-acrAB*- bzw. *acrEF*-Deletionsmutanten

Aufgrund des stark überlappenden Substratspektrums der AcrAB/TolC- und der homologen AcrEF/TolC-Effluxpumpe wurde angenommen, dass letztere AcrAB bei Funktionsverlust er-

setzt (Abschnitt 1.6.1). Dies könnte möglicherweise zu einer verminderten Expression von *acrAB* zugunsten von *acrEF* führen.

In der folgenden Untersuchung sollten daher *E. coli*-Stämme, bei denen *acrAB* bzw. *acrEF* deletiert ist und damit keine funktionellen Proteine gebildet werden können, vermessen werden. Hierzu wurden der Ausgangsstamm MG1655, die Mutanten MG1655- $\Delta$ *acrAB* und MG1655- $\Delta$ *acrEF* [171] mit pPHB331 transformiert (Abschnitt 2.3.10.2). Die Ergebnisse für diese drei Stämme sind in Tabelle 3.12 und Abbildung 3.22 dargestellt.



**Abbildung 3.22:** Messung mit pPHB331: RLU/OD % von MG1655- $\Delta$ *acrAB* und MG1655- $\Delta$ *acrEF* im Vergleich zu MG1655.

**t-Test:**  $p_{MG1655, \Delta acrEF}$ : 0,041,  $p_{MG1655, \Delta acrAB}$ : 0,025.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %
<b>MG1655</b>	2219	2037	2595	<b>100</b>
<b>MG1655-<math>\Delta</math><i>acrAB</i></b>	3407	3550	3699	<b>157 ± 16</b>
<b>MG1655-<math>\Delta</math><i>acrEF</i></b>	2057	1853	2219	<b>90 ± 4</b>

**Tabelle 3.12:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von MG1655 und den *acrAB*- und *acrEF*-Deletionsmutanten.

Im Vergleich zum Ausgangsstamm MG1655 zeigt die *acrEF*-Deletionsmutante eine sehr geringe Erniedrigung, wohingegen bei der *acrAB*-Deletionsmutante eine geringe Steigerung in der Aktivität von *pacrAB* zu erkennen ist.

Um bei einer so geringen Veränderung im RLU/OD % Quotienten, den möglichen Plasmidverlust ausschließen zu können, wurde eine Wiederholung der Messung mit Tetracyclin als Selektionsantibiotikum in der Versuchsanzucht, durchgeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Tabelle 3.13 aufgeführt.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %
MG1655	1340	1321	1281	100
MG1655- $\Delta$ acrAB	2098	2240	1988	161 $\pm$ 8
MG1655- $\Delta$ acrEF	1299	1527	1505	110 $\pm$ 11

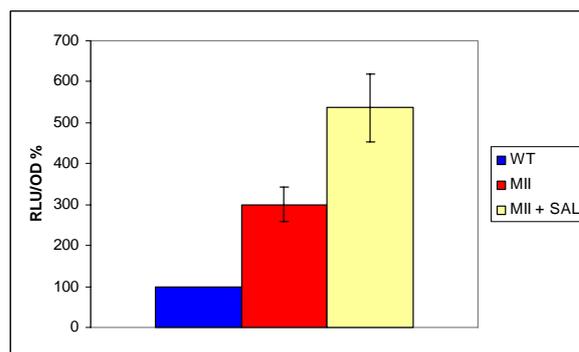
**Tabelle 3.13:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von MG1655, MG1655- $\Delta$ acrAB und MG1655- $\Delta$ acrEF unter Selektionsdruck (Tetracyclin).

**t-Test:**  $p_{MG1655, \Delta acrEF}$ : 0,26,  $p_{MG1655, \Delta acrAB}$ : 0,006.

Die erhaltenen Werte für die RLU/OD % Quotienten konnten das ohne Selektionsdruck erhaltene Ergebnis für die  $\Delta$ acrEF-Mutante nicht bestätigen, jedoch den Unterschied zwischen dem Ausgangsstamm MG1655 und der  $\Delta$ acrAB-Mutante.

### 3.12.5 Induktion der Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe mit Salicylsäure in einer *E. coli*-marR-Deletionsmutante

In einem weiteren Versuch zur Induktion der Expression von *acrAB* durch Salicylsäure wurden Messungen mit der *E. coli*- $\Delta$ marR-Mutante MII (Tab. 2.10) durchgeführt. Hierbei wurde als Ausgangsstamm WT uninduziert mitgeführt, während parallel MII uninduziert und in Anwesenheit von 1/2 MHK (0,5 mg/mL) Salicylsäure vermessen wurde. Verwendet wurde für diese Messreihe das Reporterplasmid pPHB331. Die erhaltenen Einzelwerte (RLU/OD) und RLU/OD % Quotienten sind in der Tabelle 3.14 bzw. in der Abbildung 3.23 dargestellt. In Tabelle 3.14 sind zum direkten Vergleich auch die parallel bestimmten RLU/Proteinmenge % Quotienten mit aufgeführt.



**Abbildung 3.23:** Messung mit pPHB331: RLU/OD % Quotienten von MII in An- und Abwesenheit von 1/2 MHK Salicylsäure im Vergleich zum uninduzierten WT.

**t-Test:**  $p_{WT, MII}$ : 0,012,  $p_{MII, SAL}$ : 0,022.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %	RLU/ Proteinmenge %
WT	2533	2129	2938	<b>100</b>	100
MII	6639	7371	8540	<b>300 ± 43</b>	279 ± 26
MII + SAL	13568	13189	13325	<b>537 ± 83</b>	351 ± 15

**Tabelle 3.14:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % und RLU/Proteinmenge % von WT und MII uninduziert und MII in Anwesenheit von 1/2 MHK Salicylsäure (SAL).

t-Test: (RLU/Proteinmenge %)  $p_{WT, MII}$ : 0,0069,  $p_{MII, SAL}$ : 0,021.

Im Vergleich zum Wildtyp WT ist für MII eine deutliche Erhöhung der Aktivität von *pacrAB* auf ca. 300 % zu erkennen. Durch die Zugabe von Salicylsäure, ein Induktor des *mar*-Operons, konnte eine weitere Steigerung bewirkt werden. Die nach Proteinbestimmung ermittelten RLU/Proteinmenge % Quotienten bestätigen die Ergebnisse, mit der Einschränkung, dass der durch Salicylsäure hervorgerufene Effekt nicht ganz so stark ausgeprägt ist, wie bei den RLU/OD % Quotienten.

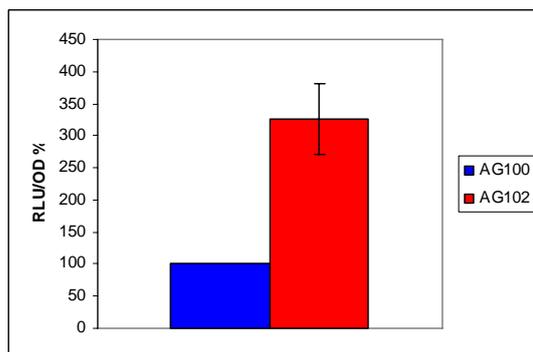
### 3.12.6 Messung der Expression von *acrAB* in verschiedenen *E. coli-mar*-Mutanten

Um das Ausmaß des Einflusses von unterschiedlichen Mutationen in *marR* oder *marO* auf die Expression von *acrAB* zu untersuchen, wurden in den folgenden Versuchen unterschiedliche *E. coli-mar*-Mutanten mit den Reportergensystemen pPHB331 oder pPHB335 transformiert und vermessen.

In einem Versuch zur Untersuchung von Mutationen in *marR* wurde der Wildtyp AG100 und die, aus diesem Stamm hervorgegangene *marR*-Punktmutante AG102 (Tab. 2.10) nach Transformation mit pPHB331 vermessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in der Tabelle 3.15 und der Abbildung 3.24 aufgeführt.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD 4	RLU/OD %
AG100	1025	880	1003	1013	<b>100</b>
AG102	3759	2307	3792	3044	<b>327 ± 55</b>

**Tabelle 3.15:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % vom Wildtyp AG100 und der *marR*-Punktmutante AG102.



**Abbildung 3.24:** Messung mit pPHB331: RLU/OD % Quotienten von AG102 im Vergleich zu AG100.

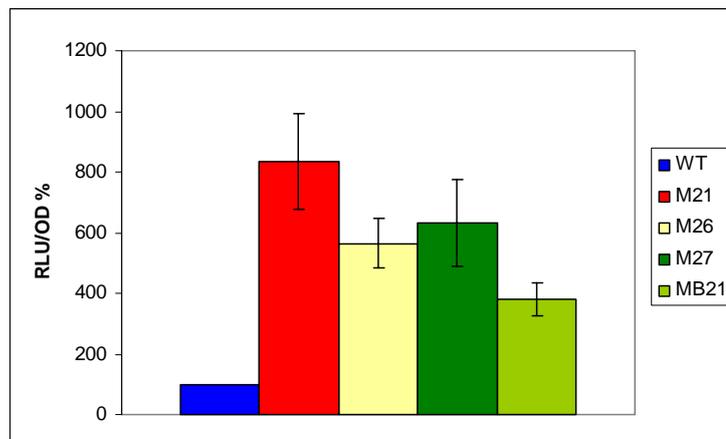
**t-Test:**  $p_{AG100, AG102}$ : 0,0032.

Für die *marR*-Punktmutante AG102 ist, im Vergleich zum Wildtyp AG100, eine deutliche Steigerung der Aktivität von *pacrAB* auf über 300 % bestimmt worden.

In einem weiteren Versuch wurden verschiedene, aus WT3-1 *in vitro* selektierte *mar*-Mutanten untersucht. Aufgrund der hochgradigen Tetracyclinresistenz einiger dieser Mutanten wurde das Reportergenplasmid pPHB335 für die Messungen verwendet. Als Ausgangsstamm diente der Wildtyp WT. Die Ergebnisse der durchgeführten Dreifach-Bestimmungen sind in Tabelle 3.16 und Abbildung 3.25 dargestellt.

Stamm	<i>marR/marO</i>	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %
WT	/	3152	3305	3407	100
WT3-1-M21	<i>marR</i> Δ80	23090	33650	25786	836 ± 158
WT3-1-M26	<i>marR</i> A53P	15050	21267	19610	565 ± 84
WT3-1-M27	<i>marR</i> L33P	14944	25065	22658	632 ± 145
WT3-1-MB21	<i>marO</i> ::19bp	11408	14408	11740	381 ± 48

**Tabelle 3.16:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von WT und den *mar*-Mutanten WT3-1-M21, -M26, -M27 und -MB21.



**Abbildung 3.25:** Messung mit pPHB335: RLU/OD % Quotienten der *mar*-Mutanten WT3-1-M21, -M26, -M27 und -MB21 im Vergleich zu WT.

**t-Test:**  $p_{WT, -MB21}$ : 0,0097,  $p_{WT, -M26}$ : 0,011,  $p_{WT, -M27}$ : 0,024,  $p_{WT, -M21}$ : 0,015,  $p_{-MB21, -M26}$ : 0,041,  $p_{-MB21, -M27}$ : 0,083,  $p_{-MB21, -M21}$ : 0,029,  $p_{-M26, -M27}$ : 0,535,  $p_{-M26, -M21}$ : 0,078,  $p_{-M27, -M21}$ : 0,176.

**U-Test:**  $p_{-MB21, -M27}$ : 0,0495,  $p_{-M26, -M21}$ : 0,0495.

Alle Stämme zeigten im Vergleich zum Wildtyp WT eine deutlich erhöhte Steigerung der Aktivität von *pacrAB* von ca. 380 bis über 800 % je nach Mutation. Untereinander konnte nur für WT3-1-MB21 zu WT3-1-M26, WT3-1-M27 und WT3-1-M21, sowie für WT3-1-M26 zu WT3-1-M21 ein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

Dieser Versuch wurde für WT und WT3-1-M21 wiederholt, wobei dann 50  $\mu$ L LAR bei der luminometrischen Vermessung zur Probe hinzupipettiert wurden. Es konnten die in Tabelle 3.16 erhaltenen Werte bestätigt werden.

Da ein Merkmal von *mar*-Mutanten ein sehr langsames Wachstum ist [194], sollte der Einfluss des fehlenden Selektionsdrucks während der Versuchszucht ausgeschlossen werden. Für die hier getesteten Stämme wurden keine Generationszeiten bestimmt. Es fiel jedoch, durch die Bestimmung bei möglichst identischer  $OD_{546nm}$ , die bis zur Probenziehung unterschiedliche benötigte Zeit auf. Daher wurde mit WT3-1-M21, der Stamm, der die längste Zeit bis zum Erreichen der gewünschten OD gebraucht hat, ein Versuch unter Zugabe von Kanamycin zur Versuchszucht durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.17 aufgelistet.

Durch den Vergleich der resultierenden RLU/OD % Quotienten konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen mit und ohne Zugabe von Kanamycin besteht.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD %
WT3-1-M21	27188	26313	100
WT3-1-M21 + KAN	28277	28561	106 ± 4

**Tabelle 3.17:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von WT3-1-M21 mit und ohne Zugabe von Kanamycin (KAN) als Selektionsdruck für pPHB335.

t-Test:  $p_{WT3-1-M21, KAN} = 0,34$ .

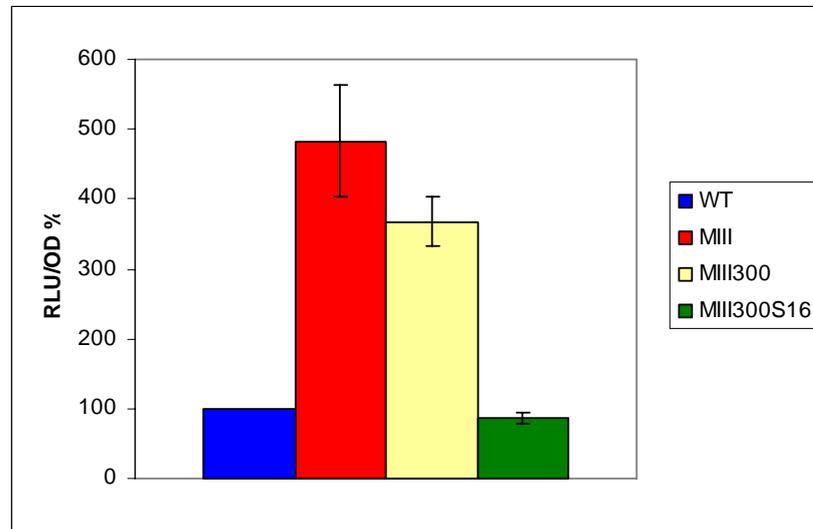
### 3.12.7 Messung der Expression von *acrAB* in *marR*-Deletions- und *marA*-Punktmutanten von *E. coli*

Aus der in Abschnitt 3.12.6 schon erwähnten  $\Delta marR$ -Mutante MIII sind in einem vorangegangenen Experiment nach Wachstum ohne Selektionsdruck, d.h. in Abwesenheit von Fluorchinolonen, über 300 Generationen die beiden phänotypisch unterschiedlichen Stämme MIII300 und MIII300S16 hervorgegangen. Parallel dazu sind unter gleichen Bedingungen aus der  $\Delta marR$ -Mutante MIVa (Tab. 2.10) ebenfalls zwei phänotypisch unterschiedliche Stämme, MIVa300 und MIVa300S32, entstanden. Bei weiterer Charakterisierung durch Schulte & Heisig 2001 [194] konnten für die Mutanten MIII300S16 und MIII300S32, die im Vergleich zu ihren Ausgangsstämmen wieder empfindlicher gegenüber z.B. Tetracyclin geworden sind, zusätzlich je eine unterschiedliche *marA*-Punktmutation durch Sequenzierung identifiziert werden. Um einen möglichen Einfluss dieser *marA*-Punktmutationen auf die Expression von *acrAB* zu untersuchen wurden Messungen mit dem Reportersystem pPHB335 durchgeführt.

Dazu wurden im Folgenden zunächst die Stämme MIII (resistent), MIII300 (resistent) und MIII300S16 (reduzierte Resistenz) im Vergleich zum Wildtyp WT, nach Transformation mit pPHB335, vermessen. Die daraus resultierenden Einzelwerte und RLU/OD % Quotienten sind der Tabelle 3.18 und der Abbildung 3.26 zu entnehmen. In der Tabelle 3.18 sind des Weiteren zum direkten Vergleich die RLU/Proteinmenge % Quotienten mit aufgeführt.

Bei Betrachtung der Daten (RLU/OD % und RLU/Proteinmenge %) ist deutlich zu erkennen, dass die beiden resistenten Stämme MIII und MIII300 im Vergleich zum Wildtyp WT eine Steigerung der Aktivität von *pacrAB* von etwa 400 % aufweisen. Ein Unterschied zwischen diesen beiden Stämmen ist unter Einbeziehung sowohl des RLU/OD % als auch des RLU/Proteinmenge % Quotienten nicht vorhanden. Der mit Hilfe des U-Tests ermittelte p-Wert für den RLU/OD % Quotienten deutet zwar auf einen Unterschied hin, der jedoch unter Berücksichtigung der einzelnen Messungen sowie der anderen p-Werte eher kritisch zu bewerten ist (Abschnitt 4.1.4).

Im Vergleich zu MIII und MIII300 fällt das Niveau der Aktivität von *pacrAB* bei der *marA*-Punktmutante MIII300S16 wieder auf das, des Wildtyps WT zurück. Bei Betrachtung der einzelnen Messungen sowie aller p-Werte scheint es sogar eine Tendenz zu einem etwas niedrigeren Wert verglichen mit WT zu kommen.



**Abbildung 3.26:** Messung mit pPHB335: RLU/OD % Quotienten der Stämme MIII, MIII300 und MIII300S16 im Vergleich zu WT.

**t-Test:** (RLU/OD %)  $p_{WT, MIII}$ : 0,014,  $p_{WT, MIII300}$ : 0,0056,  $p_{MIII, MIII300}$ : 0,11,  $p_{WT, MIII300S16}$ : 0,093.

**U-Test:** (RLU/OD %)  $p_{MIII, MIII300}$ : 0,0495,  $p_{WT, MIII300S16}$ : 0,037.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %	RLU/ Proteinmenge %
WT	3030	2994	2852	100	100
MIII	12992	11454	12683	483 ± 80	460 ± 109
MIII300	11642	9831	11152	368 ± 36	458 ± 34
MIII300S16	2869	2392	2402	86 ± 8	91 ± 6

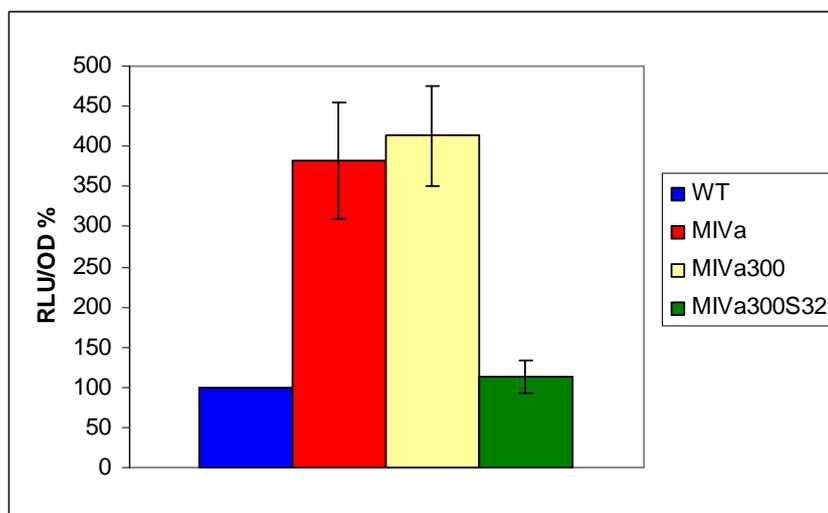
**Tabelle 3.18:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % und RLU/Proteinmenge % von WT, MIII, MIII300 und MIII300S16.

(RLU/Proteinmenge %)  $p_{WT, MIII}$ : 0,029,  $p_{WT, MIII300}$ : 0,003,  $p_{MIII, MIII300}$ : 0,97,  $p_{WT, MIII300S16}$ : 0,122.

**U-Test:** (RLU/Proteinmenge %)  $p_{WT, MIII300S16}$ : 0,037.

### 3 Ergebnisse

Der Versuch wurde ebenso mit den Stämmen MIVa, MIVa300 und MIVa300S32 im Vergleich zu WT durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 3.19 und Abbildung 3.27 dargestellt.



**Abbildung 3.27:** Messung mit pPHB335: RLU/OD % Quotienten der Stämme MIVa, MIVa300 und MIVa300S32 im Vergleich zu WT.

**t-Test:**  $p_{WT, MIVa}$ : 0,022,  $p_{WT, MIVa300}$ : 0,014,  $p_{MIVa, MIVa300}$ : 0,62,  $p_{WT, MIVa300S32}$ : 0,38.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD 4	RLU/OD %
WT	2487	2384	3532	2614	<b>100</b>
MIVa	11537	8682	ND	8336	<b>382 ± 74</b>
MIVa300	11335	10582	11981	ND	<b>413 ± 64</b>
MIVa300S32	3096	3061	3160	ND	<b>114 ± 21</b>

**Tabelle 3.19:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von WT, MIVa, MIVa300 und MIVa300S32.

Bei den Stämmen MIVa und MIVa300 ist deutlich eine Steigerung der Aktivität von *pacrAB* auf 400 % im Vergleich zum Wildtyp WT zu erkennen. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Stämmen konnte nicht gezeigt werden. Hingegen wurde für die *marA*-Punktmutante MIVa300S32 im Vergleich zu MIVa und MIVa300 eine Abnahme in der Aktivität von *pacrAB* auf das Niveau von WT beobachtet.

### 3.12.8 Messung der Expression von *acrAB* in *E. coli-marA*-Punktmutanten in Gegenwart von pPHB1838

Um zu untersuchen, ob eine Komplementation von MarA in den in Abschnitt 3.12.7 beschriebenen *marA*-Punktmutanten MIII300S16 und MIVa300S32 zu einer Erhöhung der Aktivität des Promotors von *acrAB* führt, mussten diese Stämme sowohl das Reportergensystem pPHB335 als auch den Überexpressionsvektor pPHB1838 enthalten. Daher wurden WT als Ausgangsstamm, MIII300S16, MIVa300S32 und MIII (positive Kontrolle) zusätzlich zu dem Reportergenplasmid pPHB335 mit dem Überexpressionsvektor pPHB1838 mittels  $\text{CaCl}_2$ -Methode transformiert (Abschnitt 2.3.10.1). Von den entsprechenden Transformanten wurden Übernachtskulturen in 3 mL LB-Bouillon unter Zugabe von 25  $\mu\text{g/L}$  Kanamycin und 10  $\mu\text{g/L}$  Tetracyclin hergestellt.

Die Anzucht der Stämme zur Probenziehung erfolgte ebenfalls unter diesem Selektionsdruck in 10 mL LB-Bouillon, wobei die weitere Vorgehensweise analog zu der in Abschnitt 2.3.13 Beschriebenen erfolgte.

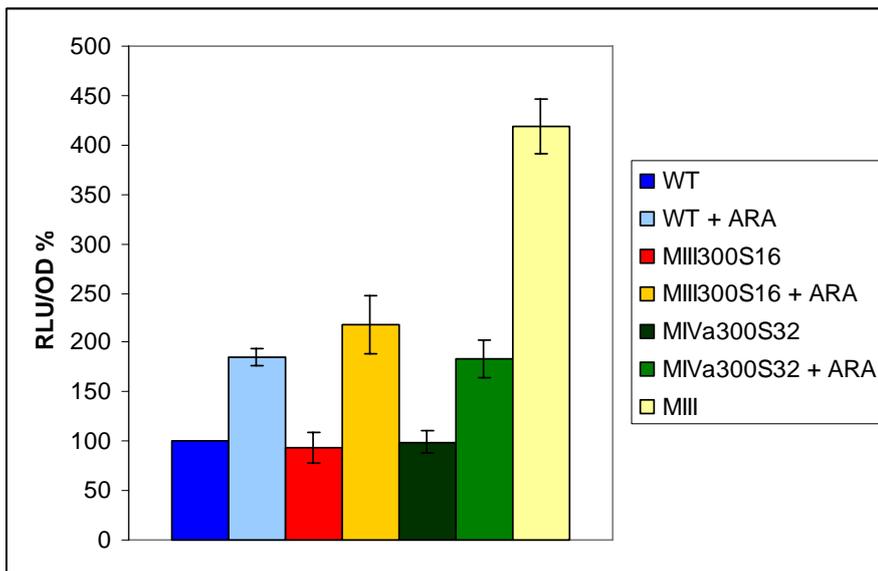
Dabei wurden folgende Ansätze zur Probenziehung inkubiert:

1. Eine Nullkontrolle, die pPHB335 und pPHB1838 ohne Zusatz enthielt
2. Eine Probe, die pPHB335 und pPHB1838 unter Zugabe von 15 mM L-Arabinose enthielt
3. Eine Probe, die pPHB335 und pPHB1838 unter Zugabe von 15 mM D-Glukose enthielt

Die Inkubationsbedingungen mit den beiden verschiedenen Zuckern entsprachen denen, die auch für die MarA-Komplementationsversuche ausgewählt wurden (Abschnitte 2.3.18 und 3.15).

In den Tabellen 3.20, 3.21 und 3.22 sind die erhaltenen Einzelwerte aufgeführt, sowie die RLU/OD % Quotienten mit Bezug auf die Nullkontrolle WT mit pPHB335 und pPHB1838 ohne Zusätze. Des Weiteren sind diese RLU/OD % Quotienten in den Abbildungen 3.28 und 3.29 dargestellt.

Die aufgeführten Ergebnisse zeigen sehr deutlich, dass es bei Induktion des Überexpressionsvektors pPHB1838 mit L-Arabinose in den drei Stämmen WT, MIII300S16 und MIVa300S32 zu einer Erhöhung der Aktivität von *pacrAB* kommt. Dabei wurde jedoch nicht das Niveau von MIII erreicht. MIII diente als Maximumkontrollwert, der bei einer vollständigen Komplementation von MarA in MIII300S16 und ähnlich bei MIVa300S32 zu erwarten gewesen wäre. Dafür wurden drei parallele Ansätze aus drei unterschiedlichen Übernachtskulturen untersucht und auf eine am gleichen Tag angezogene Probe von WT bezogen.



**Abbildung 3.28:** Messung mit pPHB335 und pPHB1838: RLU/OD % Quotienten der Stämme MIII300S16, MIVa300S32 und MIII im Vergleich zu WT (pPHB335 + pPHB1838) in An- und Abwesenheit von L-Arabinose (ARA).

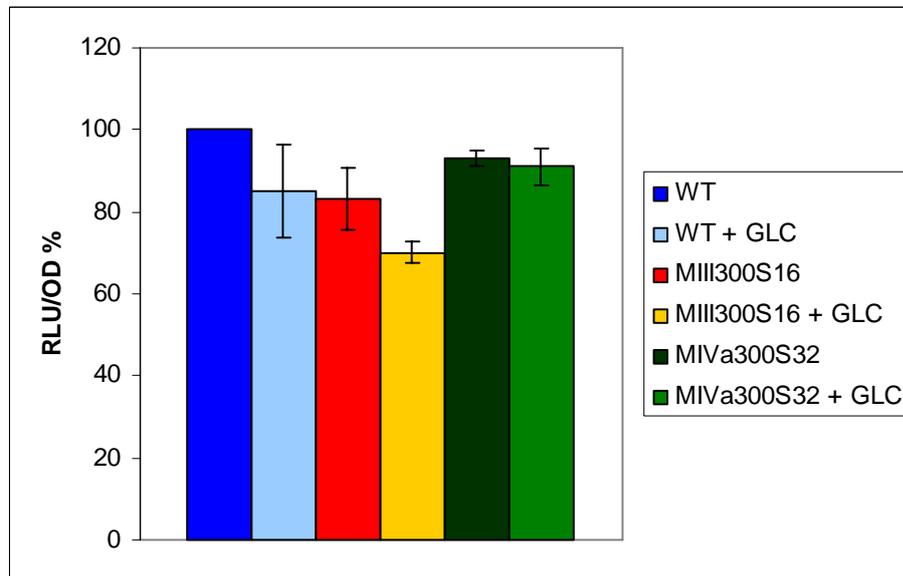
**t-Test:**  $p_{WT, ARA}$ : 0,0033,  $p_{MIII300S16, ARA}$ : 0,0073,  $p_{MIVa300S32, ARA}$ : 0,0052.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD 4	RLU/OD %
WT	4183	3169	2935	4108	100
WT + ARA	8116	5843	5185	ND	185 ± 9
MIII300S16	3168	3181	3051	ND	93 ± 15
MIII300S16 + ARA	8049	7926	6249	ND	218 ± 29
MIVa300S32	3806	3544	ND	3915	99 ± 11
MIVa300S32 + ARA	8253	6056	ND	6667	183 ± 19

**Tabelle 3.20:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von WT, MIII300S16 und MIVa300S32 in An- und Abwesenheit von L-Arabinose (ARA).

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %
WT	4322	ND	ND	100
MIII	17560	17314	19495	419 ± 27

**Tabelle 3.21:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von WT und MIII.



**Abbildung 3.29:** Messung mit pPHB335 und pPHB1838: RLU/OD % Quotienten der Stämme MIII300S16, MIVa300S32 und MIII im Vergleich zu WT (pPHB335 + pPHB1838) in An- und Abwesenheit von D-Glukose (GLC).  
**t-Test:**  $p_{WT, GLC} = 0,15$ ,  $p_{MIII300S16, GLC} = 0,078$ ,  $p_{MIVa300S32, GLC} = 0,53$ .  
**U-Test:**  $p_{WT, GLC} = 0,037$ ,  $p_{MIII300S16, GLC} = 0,0495$ .

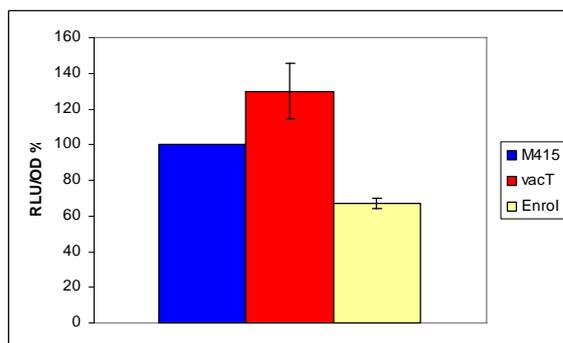
Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %
WT	4108	4183	3829	100
WT + GLC	3501	3055	3673	85 ± 11
MIII300S16	3756	3168	3169	83 ± 7
MIII300S16 + GLC	2995	2854	2632	70 ± 3
MIVa300S32	3915	3806	3567	93 ± 2
MIVa300S32 + GLC	3850	3597	3567	91 ± 4

**Tabelle 3.22:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von WT, MIII300S16 und MIVa300S32 in An- und Abwesenheit von D-Glukose (GLC).

Die Zugabe von D-Glukose hingegen brachte entweder keinen signifikanten Unterschied in der Aktivität von *pacrAB* oder es kam eher zu einer Erniedrigung der Aktivität von *pacrAB*. Diese Werte dienten ebenfalls als Kontrolle, da durch D-Glukose der Arabinose-Promotor (*arac-paraB*) reprimiert wird [67].

#### 3.12.9 Messungen der Expression von *acrAB* in Salmonellen

Im Gegensatz zu seinem Ausgangsstamm M415 wurde in vorangegangenen Experimenten für den durch ungezielte Mutagenese hervorgegangenen Impfstamm *vacT* ein Efflux-Defizit vermutet, was zu einer Empfindlichkeit gegenüber unter anderem Fluorchinolonen führt (Tab. 2.10) [172]. Nach Selektion von *vacT* auf Enrofloxacin ist der, gegen Fluorchinolone wieder resistente Stamm *Enro1* entstanden [70]. Zur Untersuchung, ob in diesem Zusammenhang die AcrAB/TolC-Effluxpumpe eine Rolle spielt, wurden diese drei Stämme mit pPHB331 mittels Elektroporation transformiert (Abschnitte 2.3.10.4 und 2.3.10.5). Die ermittelten Einzelwerte und RLU/OD % Quotienten sind in Tabelle 3.23 und Abbildung 3.30 dargestellt.



**Abbildung 3.30:** Messung mit pPHB331: RLU/OD % Quotienten von *vacT* und *Enro1* im Vergleich zu ihrem Ausgangsstamm M415.

**t-Test:**  $p_{M415, vacT} = 0,077$ ,  $p_{M415, Enro1} = 0,0029$ .

**U-Test:**  $p_{M415, vacT} = 0,037$ .

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %
<b>M415</b>	4446	4215	4882	<b>100</b>
<b><i>vacT</i></b>	6471	5463	5634	<b>130 ± 16</b>
<b>Enro1</b>	3034	2687	3432	<b>67 ± 3</b>

**Tabelle 3.23:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % der Salmonellen M415, *vacT* und *Enro1*.

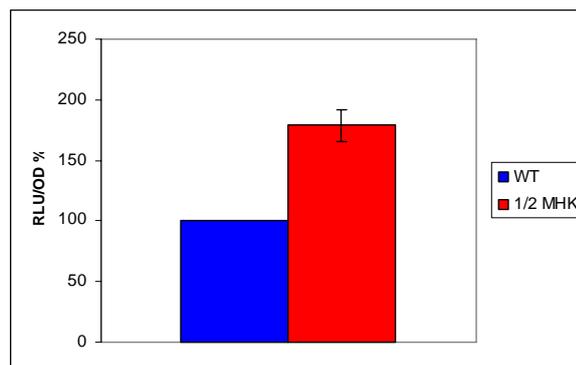
Für den Impfstamm *vacT* konnte ein geringer Unterschied der Aktivität von *pacrAB*, im Vergleich zu seinem Ausgangsstamm M415, in Form einer Erhöhung gezeigt werden. Bei *Enro1* wurde hingegen eine Abnahme zu M415 erhalten.

### 3.13 Messungen der Promotoraktivität von *pacrEF*

In den folgenden Abschnitten sind alle Messungen und deren Ergebnisse, die mit pPHB333 hinsichtlich der Expression der AcrEF/TolC-Effluxpumpe durchgeführt wurden, beschrieben. pPHB333 wurde mit 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Tetracyclin (Abb. 3.15) selektiert. Die Auswertung der Daten erfolgte wie in Abschnitt 2.3.15 beschrieben.

#### 3.13.1 Induktion der AcrEF/TolC-Effluxpumpe mit Salicylsäure in *E. coli*

Zur Ermittlung, ob auch die Expression von *acrEF* durch Salicylsäure induzierbar ist, wurde der Wildtyp WT (Tab. 2.10) mit pPHB333 transformiert und die spezifische Luciferase-Aktivität in Anwesenheit von 1/2 MHK (0,5 mg/mL) Salicylsäure im Vergleich zur uninduzierten Probe vermessen. Die erhaltenen Einzelwerte und RLU/OD % Quotienten sind in Tabelle 3.24 und Abbildung 3.31 dargestellt.



**Abbildung 3.31:** Messung mit pPHB333: RLU/OD % Quotienten von WT in Anwesenheit von 1/2 MHK Salicylsäure im Vergleich zur uninduzierten Probe.  
**t-Test:**  $p_{\text{WT}, 1/2 \text{ SAL}} = 0,0094$ .

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %
WT	2,064	2,02	2,154	100
WT + 1/2 SAL	3,997	3,457	3,674	179 ± 13

**Tabelle 3.24:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von WT mit pPHB333 in An- und Abwesenheit von 1/2 MHK Salicylsäure (SAL).

Bei Vergleich der Aktivität von *pacrAB* mit der von *pacrEF* in Form der einzelnen RLU/OD-Werte wird deutlich, dass für den Promotor von *acrEF* so gut wie keine Aktivität ermittelt werden konnte. Trotzdem wurde ein deutlich signifikanter Unterschied zwischen der uninduzierten und der Probe, der Salicylsäure zugesetzt wurde, erhalten.

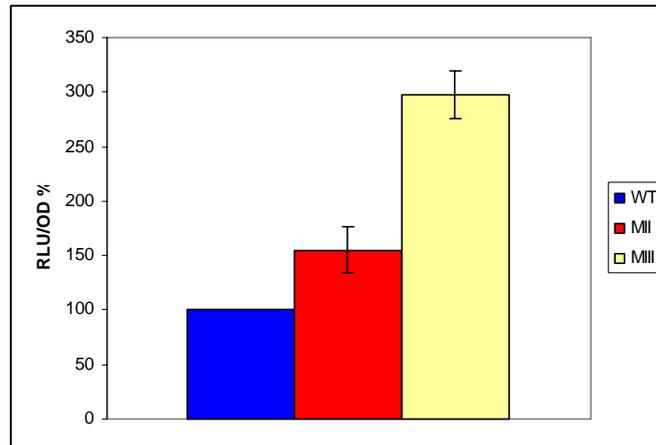
Zur Überprüfung, ob tatsächlich auf diesem niedrigen Niveau die Luciferase-Aktivität nicht mit einer Hintergrundaktivität verwechselt wurde, wurden von diesen Proben noch größere Volumina vermessen. Dabei konnte eine weitere Steigerung der RLU-Werte erreicht werden, diese blieben aber insgesamt unter 10. Damit konnte zumindest die Funktionalität des Reportersystems bestätigt werden.

### 3.13.2 Messungen der Expression von *acrEF* in *E. coli-acrAB*- bzw. *acrEF*-Deletionsmutanten

Um zu untersuchen, ob es nach Deletion von *acrAB* als Kompensationsmechanismus zu einer erhöhten Expression von *acrEF* kommt, wurden die mit pPHB333 transformierten Stämme MG1655, MG1655- $\Delta$ *acrAB* und MG1655- $\Delta$ *acrEF* vermessen. Hierbei konnte insgesamt keine Aktivität von *pacrEF* festgestellt werden. Es wurden RLU-Werte von 0,4-0,6 gemessen, die nach Erhöhung des Probenvolumens auf 25  $\mu$ L Werte von 0,8-1,1 ergaben.

### 3.13.3 Messung der Expression von *acrEF* in verschiedenen *E. coli-mar*-Mutanten

Zur Untersuchung, ob eine globale Regulation von *acrEF* durch das *mar*-Operon vorhanden ist, sollte die Expression von *acrEF* in *marR*-Deletionsmutanten gemessen werden. Um dies mit pPHB333 durchführen zu können, wurden die  $\Delta$ *marR*-Mutanten MII und MIII (Tab. 2.10) ausgewählt, da diese keine hochgradige Tetracyclinresistenz aufweisen, so dass auf das Plasmid noch selektiert werden konnte. Die ermittelten Einzelwerte und RLU/OD % Quotienten sind in Tabelle 3.25 und Abbildung 3.32 dargestellt.



**Abbildung 3.32:** Messung mit pPHB333: RLU/OD % Quotienten von MII und MIII im Vergleich zu WT.

**t-Test:**  $p_{WT, MII}$ : 0,045,  $p_{WT, MIII}$ : 0,004.

Stamm	RLU/OD 1	RLU/OD 2	RLU/OD 3	RLU/OD %
WT	1,564	1,831	2,014	100
MII	2,307	3,275	2,809	155 ± 21
MIII	4,272	5,635	6,304	298 ± 7

**Tabelle 3.25:** Spezifische Luciferase-Aktivitäten: RLU/OD der einzelnen Messungen, sowie der RLU/OD % von WT und den  $\Delta marR$ -Mutanten MII und MIII.

Bei Betrachtung der einzelnen RLU/OD-Werte im Vergleich zu denen, die mit pPHB331 oder pPHB335 für die Aktivität von *pacrAB* ermittelt wurden, wird wieder deutlich, dass die Aktivität von *pacrEF* sehr schwach ist. Doch auch bei der generell schwachen Expression von *acrEF* ist im Vergleich zum Ausgangsstamm WT eine leichte Erhöhung der Aktivität des Promotors von *acrEF* bei den  $\Delta marR$ -Mutanten zu erkennen. Bei Vermessung von größeren Probenvolumina konnte eine weitere Erhöhung in den RLU-Werten festgestellt werden. Jedoch konnte ab einem bestimmten Probenvolumen durch eine weitere Erhöhung keine Steigerung der Werte mehr erreicht werden. Die Werte blieben insgesamt unter 10 RLU.

#### 3.14 MarR-Komplementation

Der Verlust der Funktion des Repressors des *mar*-Operons MarR und damit die "ungebremste" Expression des globalen Aktivators MarA, kann durch Einbringen einer intakten Plasmid-codierten Kopie von MarR in die Zellen kompensiert werden.

Zur Untersuchung, ob für das gesamte phänotypische Ausmaß, was sich in den MHK-Werten widerspiegelt, die *marR*-Deletion in verschiedenen *E. coli*-Stämmen verantwortlich gemacht werden kann, musste mit Hilfe des Plasmids pBP591 eine Komplementation durchgeführt werden. Dieses Plasmid trägt eine Kopie des *marR*-Gens aus dem Stamm WT unter der Kontrolle des Promotors des Ampicillin-Resistenzgens *bla*.

Für die Komplementation von MarR wurde wie in Abschnitt 2.3.17 beschrieben vorgegangen. Dabei wurden die Stämme WT, MIII, MIII300, MIII300S16, MIVa, MIVa300 und MIVa300S32 untersucht (Tab. 2.10). Die MHK-Bestimmungen wurden für Tetracyclin (Abb. 3.15) und Chloramphenicol (Abb. 3.33) durchgeführt. Die ermittelten MHK-Werte sind in Tabelle 3.26 aufgelistet.

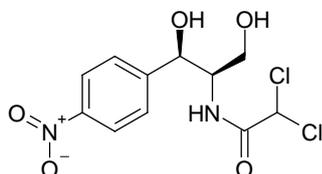


Abbildung 3.33: Chloramphenicol

Stamm	Plasmid	TC [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	CLM [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
WT	pBP507	1-2	8
	pBP591	0,5-1	4
MIII	pBP507	2-4	16
	pBP591	0,5	4
MIII300	pBP507	2-4	16
	pBP591	0,5	2
MIII300S16	pBP507	0,5-1	2-4
	pBP591	0,5-1	2
MIVa	pBP507	2-4	16
	pBP591	0,5	2-4
MIVa300	pBP507	2-4	16
	pBP591	0,5	4
MIVa300S32	pBP507	0,5	2
	pBP591	0,5	2

**Tabelle 3.26:** Komplementation von MarR: MHK-Bestimmung von Tetracyclin (TC) und Chloramphenicol (CLM)

Die für den Ausgangsstamm WT ermittelten MHK-Werte wurden als Bezugsgröße für die anderen Stämme genommen. Die  $\Delta marR$ -Mutanten MIII300S16 und MIVa300S32, die noch zusätzlich eine *marA*-Punktmutation besitzen, zeigten MHK-Werte, die deutlich unter denen von WT lagen. Die MHK-Werte der  $\Delta marR$ -Mutanten MIII, MIII300, MIVa und MIVa300 hingegen lagen über denen von WT, diese Stämme sind resistenter. Durch Überexpression des intakten *marR* aus WT (pBP591) konnte der Ausgangszustand (WT-Niveau) für diese letzteren vier Stämme wieder hergestellt, d.h. das nicht funktionsfähige MarR komplementiert und damit für die Resistenzerhöhung verantwortlich gemacht werden.

### 3.15 MarA-Komplementation

Aufgrund von Ergebnissen vorangegangener Experimente (Abschnitt 3.14 und [194]) sollte untersucht werden, ob die zusätzlichen *marA*-Punktmutationen in den *E. coli*-Stämmen MIII300S16 und MIVa300S32 für die, trotz *marR*-Deletion, wiedererlangte Empfindlichkeit gegenüber verschiedener Antibiotika verantwortlich ist.

Dafür wurde mit dem Überexpressionsvektor pPHB338 eine Komplementation von MarA wie in Abschnitt 2.3.18 beschrieben mit den *E. coli*-Stämmen WT, MIII, MIII300S16, MIVa und MIVa300S32 durchgeführt (Tab. 2.10). Die MHK-Werte wurden für Chloramphenicol (Abb. 3.33) und Novobiocin (Abb. 3.20) in Müller Hinton Bouillon und für Chloramphenicol zusätzlich in LB-Bouillon bestimmt.

Die Ergebnisse für Chloramphenicol mit den drei verschiedenen Ansätzen, mit und ohne

### 3 Ergebnisse

15 mM L-Arabinose bzw. D-Glukose, sind in den Tabellen 3.27 und 3.29 aufgeführt. Die Ergebnisse für Novobiocin mit den drei verschiedenen Ansätzen, mit und ohne 15 mM L-Arabinose bzw. D-Glukose, sind der Tabelle 3.28 zu entnehmen.

Stamm	Plasmid	CLM [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	CLM [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] + ARA	CLM [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] + GLC
WT	pBR322	4-8	4-8	4-8
	pPHB338	4-8	8-16	4-8
MIII	pBR322	32	32	32
	pPHB338	32	32	32
MIII300S16	pBR322	1-2	1-2	1-2
	pPHB338	8	16	8
MIVa	pBR322	32	32	32
	pPHB338	32	32	32
MIVa300S32	pBR322	4-8	4-8	4-8
	pPHB338	8-16	16	16

**Tabelle 3.27:** Komplementation von MarA: MHK-Bestimmung von Chloramphenicol (CLM) in Müller Hinton Bouillon in An- und Abwesenheit von 15 mM L-Arabinose (ARA) bzw. D-Glukose (GLC)

Stamm	Plasmid	NOV [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	NOV [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] + ARA	NOV [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] + GLC
WT	pBR322	64	64	64
	pPHB338	64	128	64
MIII	pBR322	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
	pPHB338	$\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
MIII300S16	pBR322	32	32	32
	pPHB338	128	128	128
MIVa	pBR322	256	256	256
	pPHB338	256	256	256
MIVa300S32	pBR322	32	32	32
	pPHB338	128	128	128

**Tabelle 3.28:** Komplementation von MarA: MHK-Bestimmung von Novobiocin (NOV) in Müller Hinton Bouillon in An- und Abwesenheit von 15 mM L-Arabinose (ARA) bzw. D-Glukose (GLC)

### 3.16 Modellierung der 3D-Struktur von MarR aus verschiedenen *marR*-Punktmutanten

Stamm	Plasmid	CLM [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	CLM [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] + ARA	CLM [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] + GLC
WT	pBR322	8	8	8
	pPHB338	8	16	8
MIII	pBR322	64	64	64
	pPHB338	64	64	64
MIII300S16	pBR322	8	8	8
	pPHB338	16	16	16
MIVa	pBR322	64	64	64
	pPHB338	64	64	64
MIVa300S32	pBR322	8	8	8
	pPHB338	16	16	16

**Tabelle 3.29:** Komplementation von MarA: MHK-Bestimmung von Chloramphenicol (CLM) in LB-Bouillon in An- und Abwesenheit von 15 mM L-Arabinose (ARA) bzw. D-Glukose (GLC)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die  $\Delta marR$ -Mutanten MIII und MIVa keine Veränderung der MHK-Werte bei Überexpression von *marA* erreicht worden ist. Gleiches gilt für WT, mit der Ausnahme, dass bei L-Arabinose-Zugabe ein Effekt in Form einer reproduzierbaren Erhöhung um eine MHK-Stufe zu beobachten war. Bei den *marA*-Punktmutanten MIII300S16 und MIVa300S32 ist in allen Fällen, d.h. ohne Zusatz, mit L-Arabinose und auch mit D-Glukose, eine deutliche Erhöhung in den MHK-Werten um eine reproduzierbare Stufe für Chloramphenicol und zwei Stufen für Novobiocin eingetreten. Es konnte eine Komplementation des durch eine Punktmutation veränderten MarA in diesen beiden Stämmen gezeigt werden, jedoch nicht zurück bis auf das Niveau der Elternstämme MIII bzw. MIVa.

### 3.16 Modellierung der 3D-Struktur von MarR aus verschiedenen *marR*-Punktmutanten

Nach Energieminimierungen mit SYBYL<sup>®</sup> sollten 3D-Strukturmodelle von MarR aus verschiedenen *marR*-Punktmutanten generiert werden, um den Einfluss der jeweiligen Mutation auf die Struktur bzw. Funktion von MarR *in silico* zu untersuchen.

Dazu musste zunächst eine Sequenzierung von *marR* aus WT erfolgen, um mögliche Unterschiede zu *marR* aus einem *E. coli*-K12-Stamm [182] zu identifizieren. Denn für diesen Stamm liegt durch eine Röntgenstrukturanalyse die 3D-Struktur von MarR (PDB ID: 1JGS) vor [7].

Hierbei konnten acht Basenpaaraustausche ermittelt werden (Datenblatt A.3). Unter diesen waren fünf stille Mutationen, während drei zu Aminosäureaustauschen führten. Nach Aus-

tausch der beiden Aminosäuren G103S und Y137H in 1JGS, konnte die Struktur für die Minimierungen genutzt werden. Die Aminosäure S3N, sollte nicht ersetzt werden, da diese in der auskristallisierten Struktur, die erst bei Aminosäure 6 (Leu) beginnt, nicht enthalten war. Die Durchführung der Energieminimierung ist in Abschnitt 2.5.2 beschrieben. Die berechnete dreidimensionale Struktur für WT ist in Abbildung 3.34 dargestellt.

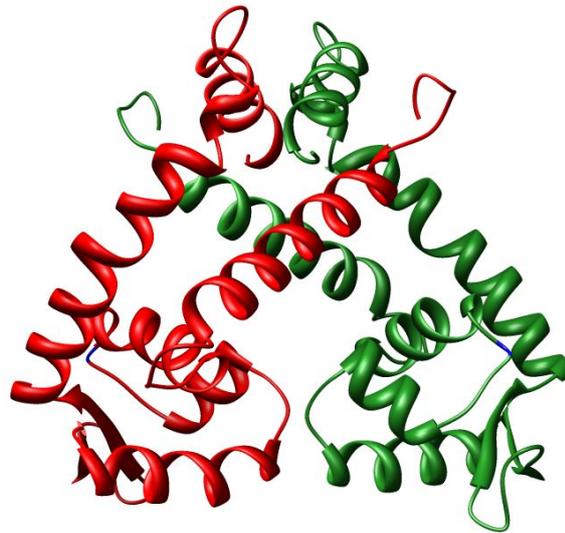


**Abbildung 3.34:** Dreidimensionale Darstellung von MarR aus WT nach Äquilibrierung und Energieminimierung mit SYBYL<sup>®</sup>. Die Monomere sind rot und grün gekennzeichnet.

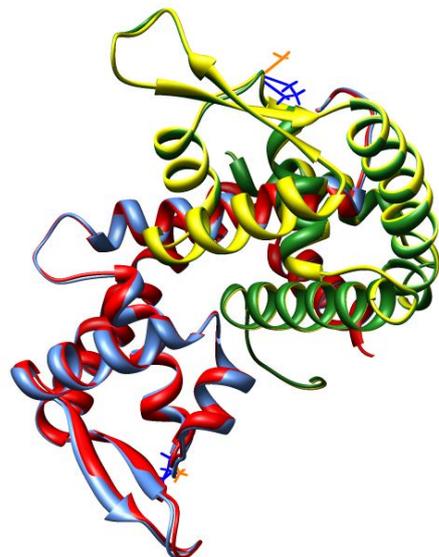
Für WT3-1-M26 sind das RMSD *fitting* mit der Ausgangsstruktur WT in Tabelle 3.30 und die dreidimensionale Struktur mit Kennzeichnung der Mutation A53P in Abbildung 3.35 dargestellt. In den Abbildungen 3.36 und 3.37 wurden die Strukturen von WT und WT3-1-M26 überlagert und ein kleiner Ausschnitt vergrößert.

Überlagerungspunkte	RMSD-Wert
<i>backbone</i>	0,3623 Å
<i>C<sub>α</sub> atoms</i>	0,3489 Å
<i>Side chains</i>	0,4389 Å
<i>All</i>	0,4142 Å

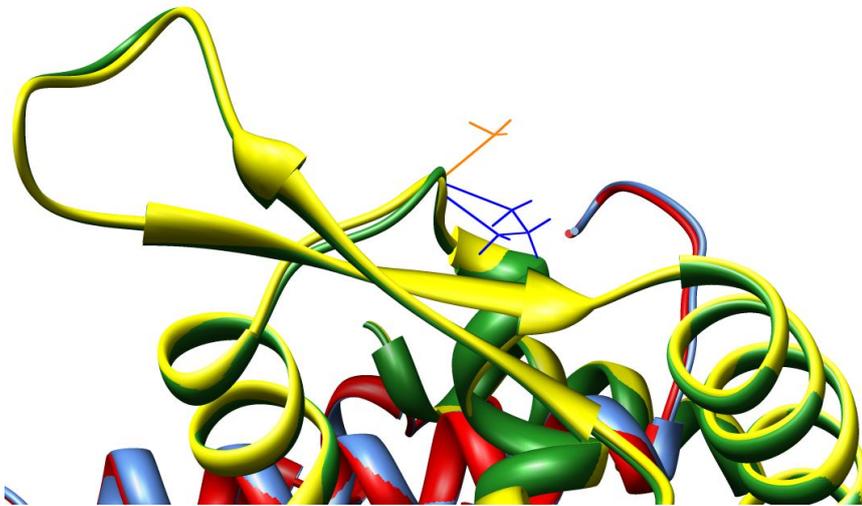
**Tabelle 3.30:** RMSD *fitting*: MarR: Vergleich von WT3-1-M26 mit WT



**Abbildung 3.35:** Dreidimensionale Darstellung von MarR aus WT3-1-M26 nach Äquilibration und Energieminimierung mit SYBYL<sup>®</sup>. Die Monomere sind rot und grün, die Mutation A53P blau gekennzeichnet.



**Abbildung 3.36:** Überlagerung der Struktur von MarR aus WT (rot und grün) mit der aus WT3-1-M26 (hellblau und gelb). Die orange Aminosäure (Alanin) liegt in WT und die blaue (Prolin) in der Punktmutante vor (A53P).

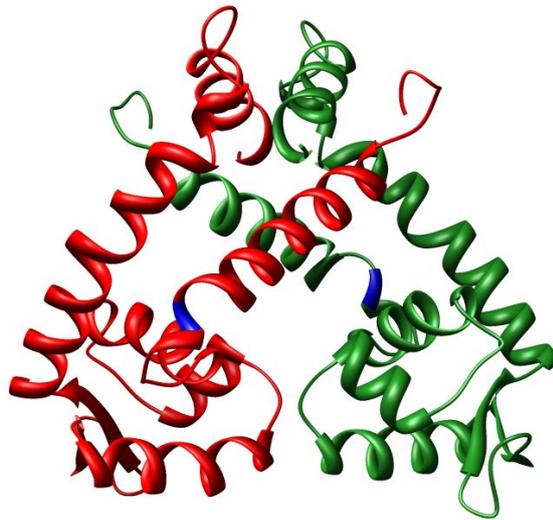


**Abbildung 3.37:** Ausschnitt aus der Überlagerung der Struktur von MarR aus WT (rot und grün) mit der aus WT3-1-M26 (hellblau und gelb). Die orange Aminosäure (Alanin) liegt in WT und die blaue (Prolin) in der Punktmutante vor (A53P).

Für WT3-1-M27 sind das RMSD *fitting* mit der Ausgangsstruktur WT in Tabelle 3.31 und die dreidimensionale Struktur mit Kennzeichnung der Mutation L33P in Abbildung 3.38 dargestellt. In den Abbildungen 3.39 und 3.40 wurden die Strukturen von WT und WT3-1-M27 überlagert und ein kleiner Ausschnitt vergrößert.

Überlagerungspunkte	RMSD-Wert
<i>backbone</i>	0,3547 Å
<i>C<sub>α</sub> atoms</i>	0,3373 Å
<i>Side chains</i>	0,4241 Å
<i>All</i>	0,4007 Å

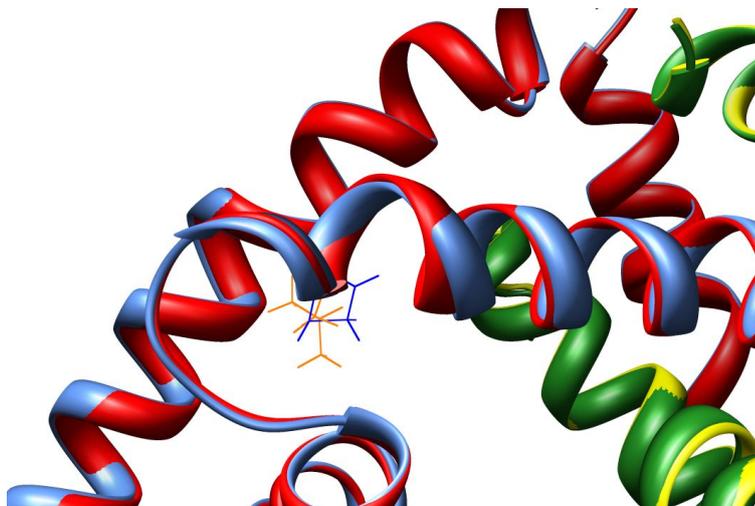
**Tabelle 3.31:** RMSD *fitting*: MarR: Vergleich von WT3-1-M27 mit WT



**Abbildung 3.38:** Dreidimensionale Darstellung von MarR aus WT3-1-M27 nach Äquilibration und Energieminimierung mit SYBYL<sup>®</sup>. Die Monomere sind rot und grün, die Mutation L33P blau gekennzeichnet.



**Abbildung 3.39:** Überlagerung der Struktur von MarR aus WT (rot und grün) mit der aus WT3-1-M27 (hellblau und gelb). Die orange Aminosäure (Leucin) liegt in WT und die blaue (Prolin) in der Punktmutante vor (L33P).



**Abbildung 3.40:** Ausschnitt aus der Überlagerung der Struktur von MarR aus WT (rot und grün) mit der aus WT3-1-M27 (hellblau und gelb). Die orange Aminosäure (Leucin) liegt in WT und die blaue (Prolin) in der Punktmutante vor (L33P).

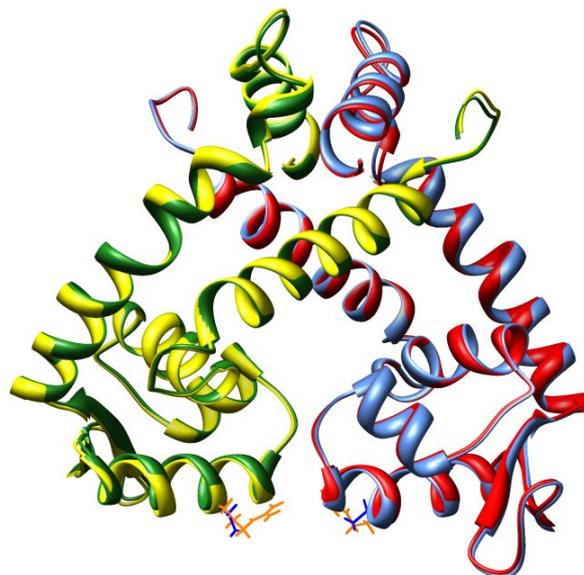
Für die Punktmutante R73C sind das RMSD *fitting* mit der Ausgangsstruktur WT in Tabelle 3.32 und die dreidimensionale Struktur mit Kennzeichnung der Mutation R73C in Abbildung 3.41 dargestellt. In den Abbildungen 3.42 und 3.43 wurden die Strukturen von WT und der Punktmutante R73C überlagert und ein kleiner Ausschnitt vergrößert.

Überlagerungspunkte	RMSD-Wert
<i>backbone</i>	0,3694 Å
<i>C<sub>α</sub> atoms</i>	0,3589 Å
<i>Side chains</i>	0,4525 Å
<i>All</i>	0,4247 Å

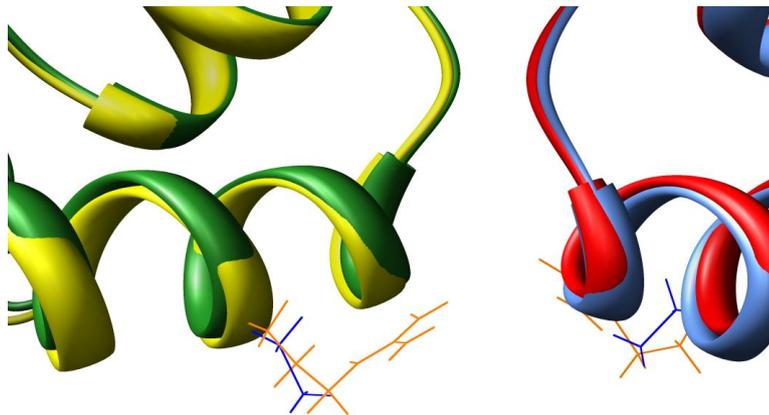
**Tabelle 3.32:** RMSD *fitting*: MarR: Vergleich der Punktmutante R73C mit WT



**Abbildung 3.41:** Dreidimensionale Darstellung von MarR aus der Punktmutante R73C nach Äquilibrierung und Energieminimierung mit SYBYL<sup>®</sup>. Die Monomere sind rot und grün, die Mutation R73C blau gekennzeichnet.



**Abbildung 3.42:** Überlagerung der Struktur von MarR aus WT (rot und grün) mit der aus der Punktmutante R73C (hellblau und gelb). Die orange Aminosäure (Arginin) liegt in WT und die blaue (Cystein) in der Punktmutante vor (R73C).



**Abbildung 3.43:** Ausschnitt aus der Überlagerung der Struktur von MarR aus WT (rot und grün) mit der aus der Punktmutante R73C (hellblau und gelb). Die orange Aminosäure (Arginin) liegt in WT und die blaue (Cystein) in der Punktmutante vor (R73C).

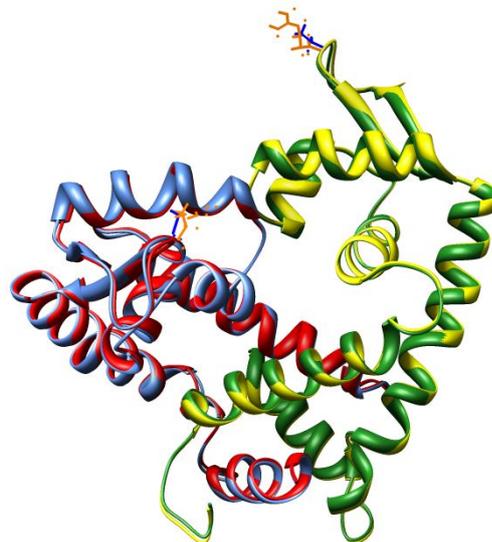
Für die Punktmutante R94C sind das RMSD *fitting* mit der Ausgangsstruktur WT in Tabelle 3.33 und die dreidimensionale Struktur mit Kennzeichnung der Mutation R94C in Abbildung 3.44 dargestellt. In den Abbildungen 3.45 und 3.46 wurden die Strukturen von WT und der Punktmutante R94C überlagert und ein kleiner Ausschnitt vergrößert.

Überlagerungspunkte	RMSD-Wert
<i>backbone</i>	0,3316 Å
<i>C<sub>α</sub> atoms</i>	0,3249 Å
<i>Side chains</i>	0,4145 Å
<i>All</i>	0,3870 Å

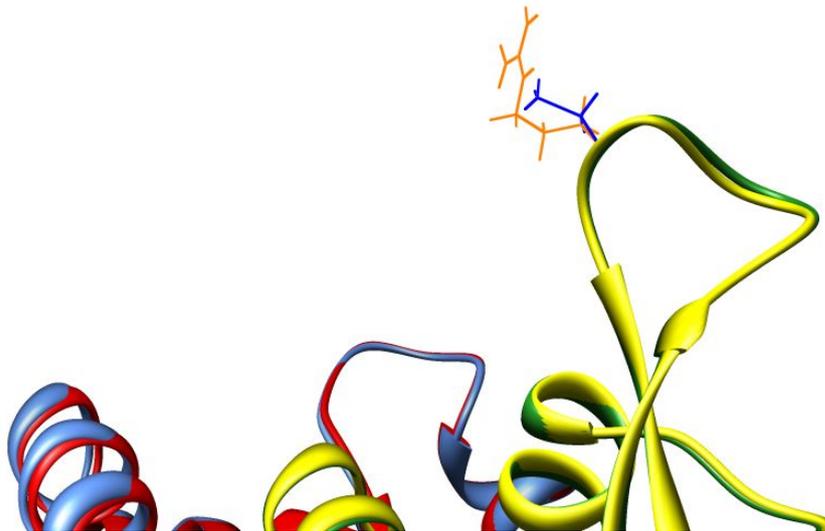
**Tabelle 3.33:** RMSD *fitting*: MarR: Vergleich der Punktmutante R94C mit WT



**Abbildung 3.44:** Dreidimensionale Darstellung von MarR aus der Punktmutante R94C nach Äquilibrierung und Energieminimierung mit SYBYL<sup>®</sup>. Die Monomere sind rot und grün, die Mutation R94C blau gekennzeichnet.



**Abbildung 3.45:** Überlagerung der Struktur von MarR aus WT (rot und grün) mit der aus der Punktmutante R94C (hellblau und gelb). Die orange Aminosäure (Arginin) liegt in WT und die blaue (Cystein) in der Punktmutante vor (R94C).



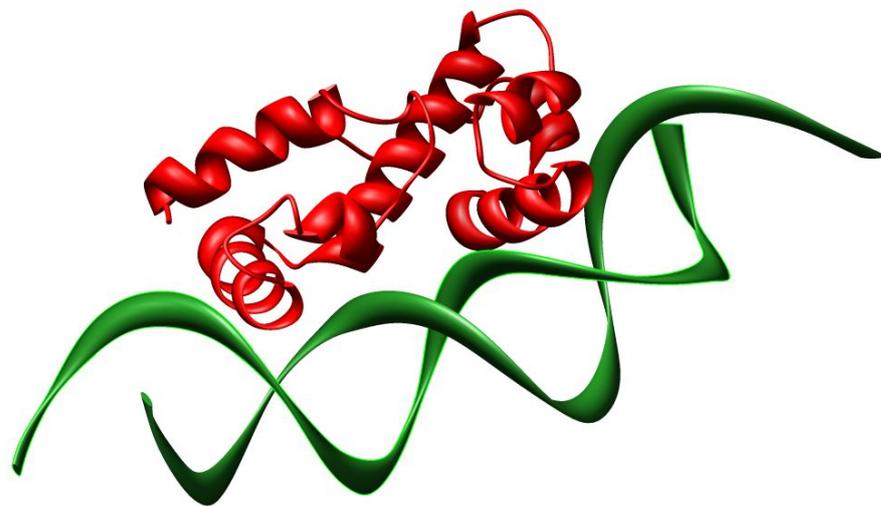
**Abbildung 3.46:** Ausschnitt aus der Überlagerung der Struktur von MarR aus WT (rot und grün) mit der aus der Punktmutante R94C (hellblau und gelb). Die orange Aminosäure (Arginin) liegt in WT und die blaue (Cystein) in der Punktmutante vor (R94C).

### 3.17 Modellierung der 3D-Struktur von MarA aus verschiedenen *marA*-Punktmutanten

Nach Energieminimierungen mit SYBYL<sup>®</sup> sollten 3D-Strukturmodelle von MarA aus verschiedenen *marA*-Punktmutanten generiert werden, um den Einfluss der jeweiligen Mutation auf die Struktur bzw. Funktion von MarA *in silico* zu untersuchen.

Zunächst musste *marA* aus WT sequenziert werden, um mögliche Unterschiede zu dem *marA* aus einem *E. coli*-K12-Stamm [182] zu identifizieren. Für diesen lag mit 1BL0 (PDB ID) eine durch Röntgenstrukturanalyse gewonnene Struktur von MarA inklusive des DNA-Bindebereichs vor [181]. Hierbei konnten fünf Basenpaaraustausche ermittelt werden, die jedoch alle zu stillen Mutationen führten (Datenblatt A.3). Somit konnte die PDB-Datei direkt für die Minimierungen genutzt werden. Die Durchführung der Energieminimierung ist in Abschnitt 2.5.2 beschrieben.

Die berechnete dreidimensionale Struktur von MarA an die DNA gebunden für WT ist in Abbildung 3.47 dargestellt.



**Abbildung 3.47:** Dreidimensionale Darstellung von MarA gebunden an die marbox des *mar*-Operons aus WT nach Äquilibriumierung und Energieminimierung mit SYBYL<sup>®</sup>

Für MIII300S16 sind das RMSD *fitting* mit der Ausgangsstruktur WT in Tabelle 3.34 und die dreidimensionale Struktur von MarA an die DNA gebunden mit Kennzeichnung der Mutation I58N in Abbildung 3.48 dargestellt. In den Abbildungen 3.49 und 3.50 wurden die Strukturen von WT und MIII300S16 überlagert und ein kleiner Ausschnitt vergrößert.

Überlagerungspunkte	RMSD-Wert
<i>backbone</i>	0,6037 Å
<i>C<sub>α</sub> atoms</i>	0,4114 Å
<i>Side chains</i>	0,7176 Å
<i>All</i>	0,6703 Å

Tabelle 3.34: RMSD *fitting*: MarA: Vergleich von MIII300S16 mit WT

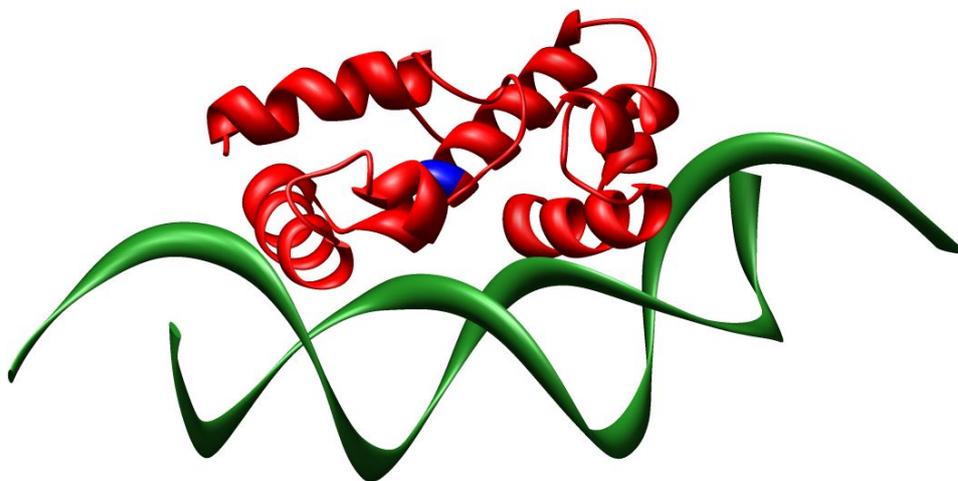
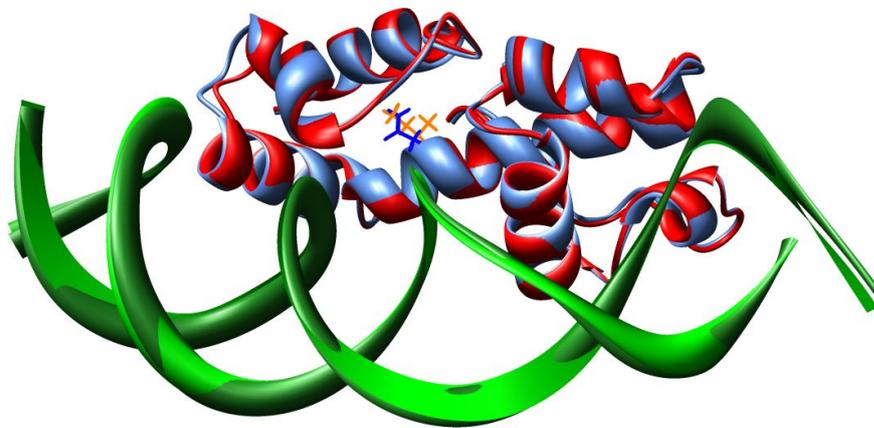
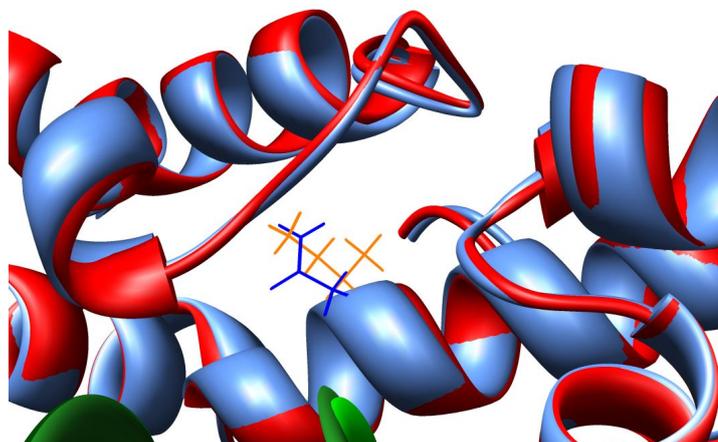


Abbildung 3.48: Dreidimensionale Darstellung von MarA gebunden an die marbox des *mar*-Operons aus MIII300S16 nach Äquilibrierung und Energieminimierung mit SYBYL<sup>®</sup>. In Blau ist die Mutation I58N gekennzeichnet.



**Abbildung 3.49:** Überlagerung der Struktur von MarA aus WT (rot) mit der aus M11300S16 (hellblau). Die orange Aminosäure (Isoleucin) liegt in WT und die blaue (Asparagin) in der Punktmutante vor (I58N).

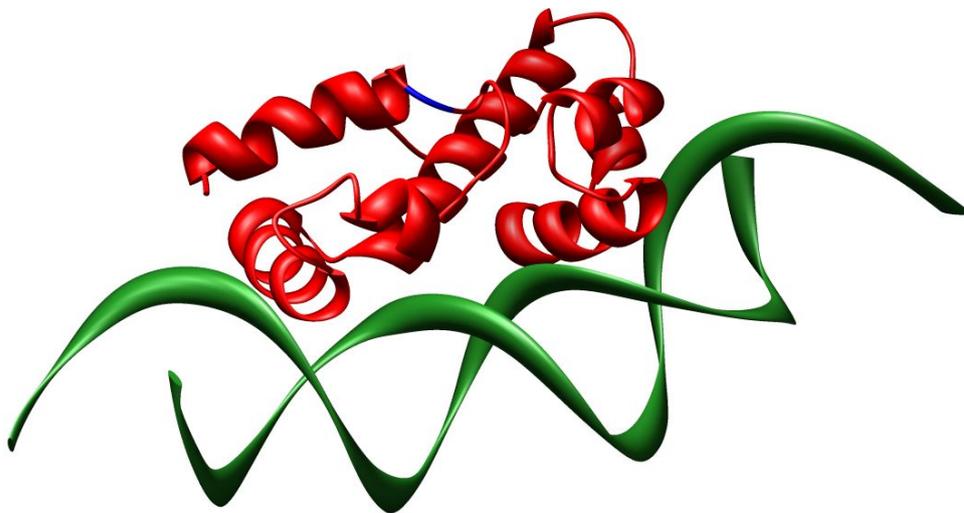


**Abbildung 3.50:** Ausschnitt aus der Überlagerung der Struktur von MarA aus WT (rot) mit der aus M11300S16 (hellblau). Die orange Aminosäure (Isoleucin) liegt in WT und die blaue (Asparagin) in der Punktmutante vor (I58N).

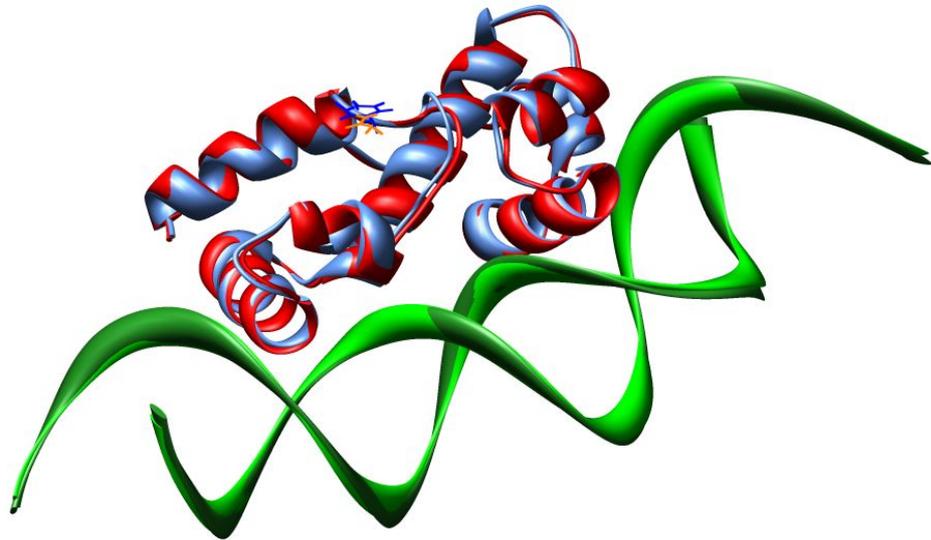
Für MIVa300S32 sind das RMSD *fitting* in Tabelle 3.35 und die dreidimensionale Struktur mit Kennzeichnung der Mutation N21Y in Abbildung 3.51 dargestellt. In den Abbildungen 3.52 und 3.53 wurden die Strukturen von WT und MIVa300S32 überlagert und ein Ausschnitt vergrößert.

Überlagerungspunkte	RMSD-Wert
<i>backbone</i>	0,6215 Å
<i>C<sub>α</sub> atoms</i>	0,4197 Å
<i>Side chains</i>	0,7453 Å
<i>All</i>	0,6933 Å

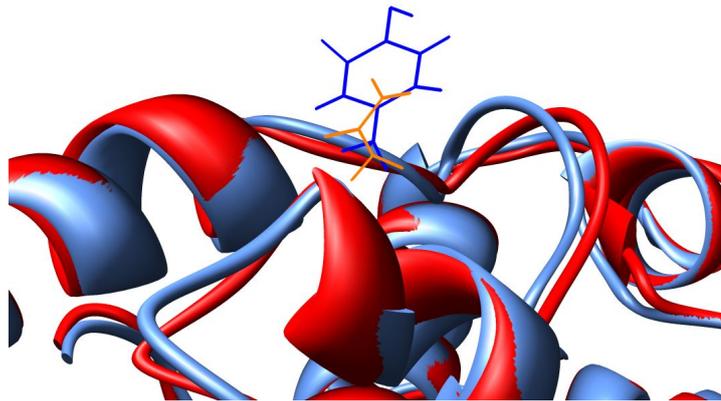
**Tabelle 3.35:** RMSD *fitting*: MarA: Vergleich von MIVa300S32 mit WT



**Abbildung 3.51:** Dreidimensionale Darstellung von MarA gebunden an die marbox des *mar*-Operons aus MIVa300S32 nach Äquilibrierung und Energieminimierung mit SYBYL<sup>®</sup>. In Blau ist die Mutation N21Y gekennzeichnet.



**Abbildung 3.52:** Überlagerung der Struktur von MarA aus WT (rot) mit der aus MIVa300S32 (hellblau). Die orange Aminosäure (Asparagin) liegt in WT und die blaue (Tyrosin) in der Punktmutante vor (N21Y).



**Abbildung 3.53:** Ausschnitt aus der Überlagerung der Struktur von MarA aus WT (rot) mit der aus MIVa300S32 (hellblau). Die orange Aminosäure (Asparagin) liegt in WT und die blaue (Tyrosin) in der Punktmutante vor (N21Y).

### 3.18 Sequenzierung und Alignment von *acrR* aus verschiedenen *E. coli*-Stämmen

Um einerseits den Einfluss von Mutationen im *acrR*-Gen, das für den lokalen Repressor von *acrAB* codiert, in der Betrachtung der mit den Reporterplasmiden ermittelten Daten ausschließen zu können, und andererseits gezielt nach möglichen Mutationen zu suchen, wurde *acrR* aus verschiedenen *E. coli*-Stämmen sequenziert.

Für die Sequenzierung von *acrR* wurde zunächst eine PCR durchgeführt (Tab. 2.17). Für das daraus resultierende DNA-Fragment (*acrR*) konnte mittels *Cycle Sequencing* die Basenabfolge ermittelt werden (Abschnitt 2.3.12). Im Vergleich zu der schon bekannten *E. coli*-K12-Sequenz [182] konnten für WT (Ausgangsstamm) fünf Punktmutationen identifiziert werden (Datenblatt A.4).

Im Vergleich zu WT wurden folgende Stämme hinsichtlich *acrR* untersucht und mittels Alignment ausgewertet (Abschnitt 2.5.1):

WT3-1, WT3-2, MI, MII, MIII, WT4,  
WT3-1-M21, -M26, -M27, -MB21, -MB2, -MB13, -MB33,  
HW2, HW58, HW75, HW83, HW85, HW96.

Für keinen dieser Stämme wurde ein Unterschied zur Sequenz von *acrR* aus WT beobachtet. Bei der Amplifikation von *acrR* aus 4917, KM-F und KM-F-KO konnten hingegen keine brauchbaren PCR-Produkte erhalten werden. Hier wurde bei 4917 ein zu kleines Fragment von zwischen 400 und 500 bp erhalten, während bei KM-F und KM-F-KO überhaupt kein PCR-Produkt entstand. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Hüllen 1998, wonach für alle drei Stämme eine *acrR*-Deletion festgestellt werden konnte [83].

Da keine *acrR*-Mutationen bei der Sequenzierung der verschiedenen *E. coli*-Stämme gefunden werden konnten, wurden diese Ergebnisse in Kapitel 4 nicht diskutiert.

### 3.19 Alignments von *pacrAB* und *pacrEF*

Um die Möglichkeit des Einsatzes des Reporterensystems pPHB331 in Salmonellen im Vorwege zu prüfen, wurde ein Alignment durchgeführt, wobei der *E. coli*-K12-Promotor *pacrAB* [182] mit dem entsprechenden Promotor aus *Salmonella enterica serovar Typhimurium* LT2 [138] verglichen wurde. Hierbei konnten neun Punktmutationen festgestellt werden, die jedoch nicht die RNA-Polymerase-Erkennungssequenzen betrafen. Die Lage der Unterschiede ist im Datenblatt A.1 gekennzeichnet. Die Ähnlichkeit der beiden Promotoren beträgt demnach ca. 94 %.

Bei einem Alignment der beiden *E. coli*-Promotoren *pacrAB* und *pacrEF* (Datenblätter A.1 und A.2) konnte eine Ähnlichkeit von ca. 50 % ermittelt werden. Dabei fiel besonders auf, dass der marbox-Bereich von *pacrAB* (rote Kennzeichnung im Datenblatt A.1), der eigentlich schon im codierenden Bereich von *acrR* liegt, eine hohe Ähnlichkeit mit dem alignierten Bereich in *pacrEF* aufweist. Diese Sequenz ist im Datenblatt A.2 orange gekennzeichnet und wurde mit der für die marbox postulierten Sequenz von Martin et al. 1999 verglichen [129]. Hierbei konnte die Möglichkeit, dass es sich bei diesem Bereich um die Erkennungssequenz von MarA handelt nicht ausgeschlossen werden. Daraus ergibt sich nun zum Einen die von Rodionov et al. 2001 mit Hilfe eines Algorithmus postulierte [184], zum Anderen, die mit Hilfe des Alignments ermittelte mögliche marbox-Sequenz für *pacrEF*.

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel Faktoren, die die Expression der AcrAB/TolC- und der AcrEF/TolC-Effluxpumpe beeinflussen könnten zu untersuchen bzw. zu identifizieren. Hierbei sollten mögliche Zusammenhänge der Expression von *acrAB* bei der Entwicklung der Resistenz gegenüber Fluorchinolonen in *E. coli*, sowie ein möglicher Zusammenhang zwischen AcrAB und AcrEF aufgeklärt werden (Abschnitt 1.7).

Im Vordergrund stand zunächst die Entwicklung von rekombinanten Reporter-genplasmiden als Nachweismethode zur quantitativen Erfassung der Expression der entsprechenden Pumpe *in vivo* über die Messung der Aktivität des jeweiligen Promotors (*pacrAB* bzw. *pacrEF*).

Für den Einsatz dieser Reporter-gen-systeme ergaben sich dabei zwei Schwerpunkte: Einerseits Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Mutationen (z.B. *gyrA*, *marR*, *marA*), andererseits zum Einfluss unterschiedlicher Substanzen (z.B. Fluorchinolone, Salicylsäure) auf die Expression von *acrAB* bzw. *acrEF*.

### 4.1 Die Reporter-gen-systeme pPHB331, pPHB335 und pPHB333

#### 4.1.1 Das Reporter-gen(-system) im Vergleich

Die Schwierigkeit, die Expression eines Gens direkt nachzuweisen, liegt darin, dass z.B. das Genprodukt schwer nachweisbar ist oder keine bekannte Funktion hat. Um detektieren zu können, ob oder in welchem Ausmaß ein bestimmtes Gen exprimiert wird, ist daher die Erfassung transkriptionaler Aktivierung z.B. durch die Verwendung von Reporter-gen-plasmiden oder RT(*real time*)-PCR gebräuchlich [122].

Reporter-gen-plasmide stellen, nach ihrer Konstruktion, eine besonders schnelle und einfache Methode dar.

Zur Konstruktion solcher Systeme wird oftmals der Promotor des zu untersuchenden Gens mit dem Startcodon *in frame* mit einem Gen, das für ein mit hoher Sensitivität nachzuweisendes Protein codiert, kloniert. Bei Aktivierung des entsprechenden Promotors durch den Transkriptionsinitiationskomplex wird das Reporter-gen verstärkt abgelesen. Die Aktivität des Reporter-proteins soll dabei mit der Promotoraktivität korrelieren. Die Auswahl an handelsüblichen Reporter-genen ist recht groß, so dass je nach Problemstellung ein geeignetes

ausgesucht werden kann [143].

Bei dem durch das Reporter gen codierten Protein handelt es sich oft um ein Enzym, z.B. die bakterielle Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT), die  $\beta$ -Galactosidase, verschiedene Luciferasen, die sekretierte Alkalische Phosphatase (SEAP) oder eine  $\beta$ -Lactamase (TEM-1). Diese Enzyme katalysieren Reaktionen, deren jeweiliges Reaktionsprodukt durch verschiedene Verfahren leicht detektiert/quantifiziert werden kann. Andere Reporterproteine ohne Enzymfunktion, die zur Quantifizierung eingesetzt werden, sind z.B. das humane Wachstumshormon (hGH, *human growth hormone*), sowie verschiedene GFP-Varianten (*green fluorescent protein*) [143].

Für den Einsatz sollte ein Reporter gen verschiedene Anforderungen erfüllen: Um eine Hintergrundaktivität ausschließen zu können, sollte sein Genprodukt in der zu untersuchenden Zelle nicht endogen vorhanden sein. Auch sollte die Physiologie der Zellen selbst nicht beeinflusst werden. Zudem sollte das Genprodukt bzw. das umgesetzte Substrat leicht zu identifizieren sein. Des Weiteren sollte der Reporter gen assay möglichst schnell, leicht, sensitiv und kostengünstig sein, sowie über einen weiten Bereich die Detektion von geringen und großen Veränderungen der Expression des Reporter gens linear ermöglichen [113].

Aus folgenden Gründen fiel daher die Wahl für den Einsatz in den zu entwickelnden Reporter systemen auf das *luc*-Gen (codiert für die *firefly*-Luciferase) aus *Photinus pyralis*:

1. Das Enzym Luciferase kommt in Bakterienzellen nicht endogen vor (Nachteil bei z.B. CAT,  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Lactamase).
2. Die Messung ist schnell durchzuführen (im Vergleich zu z.B. CAT,  $\beta$ -Lactamase, GFP und RT-PCR).
3. Die Messung bzw. Probenaufbereitung ist einfach (im Vergleich zu z.B. CAT,  $\beta$ -Lactamase, RT-PCR und hGH).
4. Es muss nicht mit Radioaktivität gearbeitet werden (Nachteil bei z.B. CAT und hGH).
5. Die Sensitivität ist über einen großen Linearitätsbereich (8 Zehnerpotenzen) sehr hoch (im Vergleich zu z.B. CAT, hGH und SEAP). Es können Luciferase-Mengen im Femtogramm-Bereich (Promega-Angabe: bis zu 100 fg Luciferase, bis zu  $10^{-20}$  mol) nachgewiesen werden, d.h. das durch diese Enzymmenge während der Luciferase-Reaktion emittierte Lichtsignal ist noch erfassbar.
6. Die Messungen sind vergleichsweise kostengünstig (im Vergleich zu z.B. RT-PCR u.a.).

Das Reporter gen *luc* codiert für die Luciferase aus dem Glühwürmchen (*firefly*) *Photinus pyralis*. Das eukaryotische *luc*-Gen liegt als intronfreie cDNA vor, dessen Genprodukt keine posttranslationale Modifikation benötigt. So besitzt das Enzym nach der Translation in Prokaryoten seine volle katalytische Aktivität [228].

Die *firefly* Luciferase ist ein 62 kDa großes Enzym, dessen dreidimensionale Struktur von Conti et al. röntgenkristallographisch aufgeklärt werden konnte [36]. Die Luciferase katalysiert die Adenosintriphosphat(ATP)-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin in

Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen und Sauerstoff, unter gleichzeitiger Lichtemission ( $h \cdot \nu$ ) bei einer Wellenlänge von 560 nm (Abb. 2.4).

Die Notwendigkeit der Substratzugabe für die Messung des Biolumineszenzsignals hat, im Vergleich mit der bakteriellen Luciferase aus *Vibrio fischeri*, die durch die Gene *luxA* und *luxB* codiert wird, und eine autonome Biolumineszenz verursacht[143], den Vorteil, dass der Zeitpunkt der Bestimmung der Luciferase-Aktivität frei gewählt werden kann.

Die Messung der transkriptionalen Aktivierung von Genen mit Hilfe von Reportergenplasmiden spiegelt jedoch nicht zwangsläufig die in der Zelle stattfindenden Prozesse wider.

Ein wesentlicher Nachteil besteht z.B. darin, dass die Transkription nicht am ursprünglichen Genlocus stattfindet. So ist zu bedenken, dass neben dem Promotor auch stromabwärts oder weiter stromaufwärts lokalisierte Sequenzabschnitte eine Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen können [111, 120]. Solche Faktoren, die über diese Regionen eines Gens die Genexpression beeinflussen, können mit einem promotorbasierten Reportergenkonstrukt folglich nicht nachgewiesen werden.

Des Weiteren kann sowohl der globale Superspiralisierungsgrad als auch die Transkription benachbarter Gene einen Einfluss auf den lokalen Superspiralisierungsgrad ausüben [205, 50] und dadurch eine für die RNA-Polymerase veränderte Zugänglichkeit von Promotoren verursachen. Dabei betrifft dieser Effekt sowohl den zu untersuchenden Promotor im Plasmid als auch den chromosomal codierten, jedoch lokal mit möglicherweise unterschiedlichen Folgen für die Promotoraktivität. Deshalb können Analysen der Genexpression mittels Reportergenplasmiden zu artifiziellen Ergebnissen führen.

Ein zusätzlicher Nachteil von Reportergenplasmiden ist, dass Transkriptionsfaktoren bei einer hohen Kopienzahl möglicherweise nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Dies kann z.B. durch die Verwendung von *low copy*-Plasmiden gering gehalten bzw. vermieden werden. Die Kopienzahl und die Stabilität des Plasmids können sich zudem unter verschiedenen Wachstumsbedingungen verändern [24, 62]. Dem kann durch Einhaltung gleicher Bedingungen für alle zu vermessenden Proben und den Bezug der erhaltenen Werte auf eine entsprechende Kontrolle entgegengewirkt werden.

### 4.1.2 Entwicklung der Reportergensysteme

Durch die transkriptionale Fusion des Promotors für die jeweilige Effluxpumpe (*pacrAB* bzw. *pacrEF*) mit dem Reportergen *luc* mittels SOEing-PCR, wurde dieses Gen exakt anschließend an das Startcodon (ATG) und damit an der Stelle, an der sich das ursprüngliche Gen befand (*acrA* bzw. *acrE*), positioniert (Abschnitt 3.1). Dadurch wird gewährleistet, dass die Expression von *luc* genau der gleichen Regulation unterliegt wie das ursprüngliche Protein. So sollte eine erhöhte Promotoraktivität (erhöhte Expression von *acrAB* bzw. *acrEF*) zu einer erhöhten Expression von *luc* und damit Bildung von Luciferase führen. Durch Zugabe des Substrats (Luciferin) im Überschuss sollte je nach vorhandener Enzymaktivität ein entspre-

chend hohes Lichtsignal entstehen. So können Veränderungen in der Aktivität des jeweiligen Promotors direkt luminometrisch quantifiziert werden.

Die Klonierung der Reportergensysteme pPHB331 (*pacrAB-luc*, Tab. 2.9) und pPHB333 (*pacrEF-luc*, Tab. 2.9) erfolgte ungerichtet über *Pst*I-Schnittstellen (Abschnitte 3.1 und 3.5). Daher waren zwei unterschiedliche Orientierungen des jeweiligen Fusionsgens relativ zum Vektor pBR322 möglich (Abschnitte 3.2 und 3.6).

Für die Entscheidung mit welcher Orientierung gearbeitet werden sollte, war das Vorhandensein von weiteren Promotoren direkt vor dem Fusionsgen ausschlaggebend. Dabei wurde jeweils die Orientierung ausgeschlossen, bei der der Promotor für die  $\beta$ -Lactamase (*pbla*) in unmittelbarer Nähe vor dem Promotor für die Effluxpumpe (*pacrAB* bzw. *pacrEF*) lag, um Einflüsse des weiteren Promotors auf die Expression über *pacrAB* bzw. *pacrEF* von *luc* zu vermeiden.

Die Umklonierung von pPHB331 zu pPHB335 (*pacrAB-luc*, Tab. 2.9) durch das Einbringen des Gens für die Kanamycinresistenz aus dem Plasmid pKD4 (Tab. 2.9) erfolgte ebenfalls ungerichtet über glatte (*blunt*) Enden (Abschnitt 3.3). So waren auch hier zwei unterschiedliche Orientierungen des Gens innerhalb des Vektors pPHB331 möglich (Abschnitt 3.4).

Bei der Auswahl der Orientierung mit der weiter gearbeitet werden sollte, gab es keine Einflüsse durch andere Promotoren zu beachten. Ausgewählt wurde die Orientierung, die durch die Lage des inserierten Gens für die Kanamycinresistenz, dem Ausgangsplasmid pPHB331 am ähnlichsten ist, d.h. der relativen Orientierung und der Lage des Tetracyclinresistenzgens (*tetA*) entspricht.

Die Auswahl des Klonierungs-/Ausgangsvektors pBR322 für alle drei entwickelten Reportergenplasmide erfolgte hinsichtlich der Kopienzahl. Mit 15-20 Kopien pro Zelle zählt das Plasmid pBR322 inzwischen zu den sogenannten *low copy*-Plasmiden [122]. Dies sollte eine möglichst ähnliche Anzahl von Kopien in den einzelnen Zellen auch bei verschiedenen Stämmen gewährleisten, um Messergebnisse vergleichbar zu machen und Grunddosis-Effekte zu minimieren.

So stehen letztendlich für die Bestimmung der Aktivität des Promotors *pacrAB* stellvertretend für die Expression von *acrAB* die beiden Reportergenplasmide pPHB331 und pPHB335 zu Verfügung. Diese unterscheiden sich durch ihre Resistenzgene (pPHB331:Tetracyclin-Resistenz, pPHB335:Kanamycin-Resistenz) und damit Selektionsmöglichkeiten. Dadurch erweitert sich das Einsatzspektrum, da zu vermessende Bakterienstämme möglicherweise schon Resistenzen gegenüber einem der beiden Antibiotika aufweisen können.

Für die Bestimmung der Aktivität des Promotors *pacrEF* kann das Reportergenplasmid pPHB333 verwendet werden.

### 4.1.3 Die Messbedingungen und Kontrollen

Im Vorwege wurden für die entwickelten Reportersysteme pPHB331, pPHB335 und pPHB333 eine Reihe von Versuchen zur Bestimmung der optimalen Messbedingungen durchgeführt (Abschnitt 3.11).

#### **Null-Kontrolle:**

Zunächst wurde geprüft, ob der eingesetzte Klonierungsvektor pBR322 sowie das *luc*-Gen an sich zu einer Hintergrundaktivität beitragen (Abschnitt 3.11.1). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Hintergrundaktivität um 1 [RLU] lag.

#### **LAR- und Probenvolumen:**

Durch die Variation zwischen den für die Messung eingesetzten Volumina von Probe und LAR (**L**uciferase **A**ssay **R**eagent), konnte die optimale Kombination ermittelt werden. So wurde aufgrund der Ergebnisse für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität ein Probenvolumen von 2,5  $\mu$ L ausgewählt, da bei niedrigeren Volumina eine schlechtere Reproduzierbarkeit aufgrund von Pipettierungenauigkeiten beobachtet wurde. Dadurch konnte die vom Hersteller (Promega) empfohlene LAR-Menge (100  $\mu$ L) auf 25  $\mu$ L reduziert werden, was zu einer deutlichen Kostenersparnis führte. Denn die 25  $\mu$ L LAR reichen bei diesem Probenvolumen aus, um signifikante Unterschiede festzustellen (Abschnitt 3.11.2).

#### **Zeitpunkt der Probenziehung:**

Die Messungen zur Bestimmung des geeigneten Zeitpunktes der Probenziehung ergaben einen OD-Bereich bei 546 nm zwischen 0,4-0,65 (Abschnitt 3.11.3). Zum Einen, da sich die *E. coli*- Stämme in der logarithmischen Wachstumsphase (linearer Bereich) befinden und hier eine lineare Korrelation zwischen dem OD<sub>546nm</sub>-Wert und dem gemessenen absoluten RLU-Wert besteht [146]. Zum Anderen, da in diesem Bereich Unterschiede zwischen Stämmen deutlich zu erkennen sind mit relativen Standardabweichungen von in der Regel < 10 % (immer < 20 %).

#### **Ermittlung der spezifischen Luciferase-Aktivität:**

Die Aktivität des Promotors der jeweiligen Effluxpumpe (*pacrAB* bzw. *pacrEF*) in der Bakterienzelle wird durch den RLU/OD, RLU/KBE bzw. RLU/Proteinmenge Quotienten widerspiegelt. Dieser Wert beschreibt die spezifische Luciferase-Aktivität, die über den Promotor *pacrAB* bzw. *pacrEF* exprimiert wird. Der Bezug des absoluten Wertes (RLU) für die Luciferase-Aktivität auf eine Zellzahl-abhängige Größe ermöglicht es Schwankungen durch unterschiedliche Bakterienzellzahlen zu reduzieren.

In erster Linie wurde mit dem RLU/OD Quotienten gearbeitet, wodurch eine gute Reproduzierbarkeit und schnelle Messung gewährleistet war (Abschnitt 3.11.4).

Für die endgültige Auswertung wurde jeweils ein Ausgangsstamm oder eine Ausgangsbedingung (z.B. uninduziert) als 100 %-Zustand festgelegt und die zu vergleichenden Stämme oder

Bedingungen (z.B. induziert) darauf bezogen (RLU/OD % Quotient), wobei die zu vergleichenden Proben immer in einem Versuchsdurchlauf gemeinsam untersucht wurden. Dadurch sollten zum Einen Schwankungen in der Versuchsdurchführung ausgeglichen werden, zum Anderen relativ einfach Veränderungen dargestellt werden.

### **Selektionsdruck:**

Zur Ermittlung des Zeitpunkts der Zugabe des Selektionsantibiotikums, wurden Untersuchungen hinsichtlich des Selektionsdrucks durchgeführt. Hierbei wurde für die Durchführung der Messungen ermittelt, dass bei der anzusetzenden Übernachtskultur (ÜNK) Selektionsantibiotikum hinzugegeben, während bei der daraus verdünnten Kultur zur Probenziehung darauf verzichtet wird (Abschnitt 3.11.5).

Dies ergab sich einerseits, um verfälschte Werte durch Plasmidverlust während der langen Wachstumszeit in der ÜNK zu vermeiden. Andererseits sollten Einflüsse des Selektionsantibiotikums während der Versuchszucht auf die Werte ausgeschlossen werden können.

Bei Stämmen, die sehr langsam wuchsen und bei Stämmen, die in den RLU/OD %-Werten nur geringe Änderungen aufwiesen, wurden Kontrollversuche durchgeführt, bei denen auch während der Versuchszucht Tetracyclin (pPHB331, pPHB333) bzw. Kanamycin (pPHB335) hinzu gegeben wurde (Abschnitte 3.12.1, 3.12.3, 3.12.4 und 3.12.6).

### **Funktionalität der Reportergenplasmide:**

Zur Prüfung der Funktionalität und damit gesteigerten Promotoraktivität der Reportergensysteme wurden Untersuchungen von in der Literatur [34, 65] beschriebenen Bedingungen durchgeführt, bei denen eine Erhöhung der RLU-Werte zu erwarten war (Abschnitt 3.11.6).

Für pPHB331 (*pacrAB-luc*) schließt das zum Einen die beschriebene Induktion der Expression durch Salicylsäure und zum Anderen die Überexpression durch Mutationen im Repressor MarR des globalen Aktivators MarA mit ein (Abschnitt 1.5.3.1). In beiden Fällen zeigten die Ergebnisse dieser Experimente eine signifikante Erhöhung der Aktivität von *pacrAB*. Bei Betrachtung der Werte der einzelnen Messreihen bei den Versuchen mit Salicylsäure zeigt sich für die höchste Konzentration (0,5 mg/mL) auch der höchste RLU/OD Quotient (Tab. 3.1). Hinsichtlich der p-Werte zu den RLU/OD % Quotienten besteht jedoch ein signifikanter Unterschied nur zwischen 0,125 und 0,5 mg/mL (Abb. 3.10). Dies könnte eventuell daran liegen das die drei gewählten Konzentrationen zur Hemmung von MarR durch Salicylsäure nicht mehr in einem linearen Bereich liegen.

Für pPHB335 (*pacrAB-luc*) wurde ebenfalls die Induktion der Expression von *acrAB* durch Salicylsäure untersucht. Dabei kam es zu mit pPHB331 vergleichbaren Ergebnissen. In diesem Fall konnte für die Konzentration 0,5 mg/mL im Vergleich zu 0,125 und 0,25 mg/mL ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 3.11, Tab. 3.2), wobei auch hier die gleiche Annahme über den Linearitätsbereich gilt wie bei pPHB331.

So konnte gezeigt werden, dass mittels der beiden Reportergensysteme pPHB331 und pPHB335 Faktoren, die wie erwartet die Aktivität von *pacrAB* beeinflussen und damit die Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe, identifiziert und quantifiziert werden können.

Für die Messung mit pPHB333 (*pacrEF-luc*) sind keine Literaturangaben für eine derartige

Funktionalitätsprüfung bekannt. Hier wurde lediglich die Vermessung von Übernachtkulturen mit den daraus resultierenden, relativ zu 1 (Hintergrundaktivität) höheren RLU-Werten als Alternative ausgewertet.

### **Funktionalität des Reporterplasmids pPHB331 in *Salmonella* Hadar:**

Das Ergebnis eines Alignments des Promotors *pacrAB* aus dem Stamm WT mit dem aus *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2 deutete auf eine mögliche Einsetzbarkeit des Reporterensystems pPHB331 (bzw. pPHB335) in Salmonellen hin (Abschnitt 3.19). Dabei konnten lediglich neun unterschiedliche Basen identifiziert werden, welche außerhalb der RNA-Polymerase-Erkennungssequenzen liegen (Datenblatt A.1).

Zur Überprüfung der Funktionalität des Reporterensystems pPHB331 in Salmonellen konnte sowohl die in der Literatur beschriebene Induktion der Expression von *acrAB* durch Salicylsäure in Salmonellen [177], als auch Messungen mit Stämmen bei denen eine erhöhte *acrAB*-Expression, aufgrund entsprechender Resultate aus RT-PCR-Messungen (Dissertation: Silke Schmidt in Vorbereitung), zu erwarten war, genutzt werden. Die deutliche Erhöhung der Werte für die Aktivität von *pacrAB* in beiden Fällen bestätigte die Möglichkeit eines Einsatzes in Salmonellen (Abschnitt 3.11.7).

#### **4.1.4 Statistik: Auswahl des Testverfahrens**

Bei der Auswahl des Testverfahrens für die Bestimmung der p-Werte, wurden folgende Grundlagen berücksichtigt [49]:

Grundsätzlich unterscheidet man parametrische und nicht-parametrische Tests. Erstere gehen davon aus, dass die beobachteten Stichprobendaten einer Grundgesamtheit entstammen, in der die Variable(n) bzw. Merkmale ein bestimmtes Skalenniveau und eine bestimmte Verteilung aufweisen (häufig Intervallskalenniveau und Normalverteilung). Bei Ungültigkeit dieser Annahmen sind Einschränkungen in der Gültigkeit des Testergebnisses die Folge. Dabei sinkt insbesondere die Teststärke ("Power" =  $1 - \beta$ ,  $\beta$  = Fehler 2. Art), d. h. es sinkt die Wahrscheinlichkeit, einen tatsächlich vorhandenen Unterschied als signifikant zu entdecken (Annahme der "falschen" Nullhypothese).

Nicht-parametrische Tests kommen mit anderen Vorannahmen (z.B. keine Normalverteilung) aus. Die Menge der für die Null-Hypothese und Alternativ-Hypothese zugelassenen Verteilungen ist nicht durch einen Parameter beschreibbar.

Da jedoch parametrische Tests trotz Verletzung ihrer Annahmen häufig eine bessere Power bieten als nicht-parametrische, kommen letztere eher selten zum Einsatz, etwa im Fall besonders schiefer Verteilungen (z.B. links-steil-rechts-schief oder umgekehrt), oder im Fall von Rangdaten, die als solche erhoben worden sind (die ermittelten Werte werden in eine vom Test abhängige Rangfolge gebracht und entsprechenden Rangzahlen zu geordnet unter Kennzeichnung aus welcher Stichprobe sie entstammen).

Daher wurde in dieser Arbeit vorrangig mit Hilfe des t-Testes (Vergleich der Mittelwerte,

parametrisch) die p-Wert-Ermittlung durchgeführt, obwohl meistens keine Normalverteilung der Werte gegeben war (Abschnitt 2.3.15). Parallel dazu erfolgte auch eine Berechnung der p-Werte mit Hilfe des U-Testes (Mann-Whitney-Test, Rangdaten, Vergleich der Verteilungen, nicht-parametrisch). Dies sollte der Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse dienen und eventuell fälschlicherweise angenommene Null-Hypothesen identifizieren. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass es durch den U-Test bei gleichen Mittelwerten aber unterschiedlichen Standardabweichungen auch zur Annahme der "falschen" Alternativhypothese kommen kann. Die mit dem U-Test erhaltenen p-Werte sind in Kapitel 3 nur für die wenigen Ausnahmen mit aufgeführt und werden in den folgenden Unterkapiteln diskutiert.

Grundsätzlich ist immer unter Betrachtung der RLU/OD Werte innerhalb der einzelnen Messreihen zu überlegen, ob ein Unterschied vorhanden ist bzw. wie die Test-Ergebnisse zu bewerten sind. Denn die statistische Auswertung kann aus folgenden Gründen mit Fehlern behaftet sein:

1. Obwohl die RLU/OD % insgesamt durch 27 Einzelwerte entstanden sind, geht in die statistische Betrachtung eine Stichprobenanzahl von  $n = 3$  ein.
2. In die RLU/OD %-Werte gehen immer zwei RLU/OD-Werte ein, die bestimmten Schwankungen unterworfen sind (Bezugsgröße und Messgröße). Besonders stark macht sich dabei beispielsweise bemerkbar, wenn der für die Bezugsgröße (z.B. WT) gemessene Wert ausreißt, was dann zu einem verzerrten Ergebnis führt.
3. In die Berechnungen geht meistens eine Messreihe mit einer Standardabweichung von 0 ein (WT = 100 %).

## 4.2 Einfluss verschiedener Topoisomerase-Mutationen und -Inhibitoren auf die Expression von *acrAB*

Im Laufe der Entwicklung von Resistenz gegenüber Fluorchinolonen kommt es bei *E. coli* zunächst zu sogenannten *target*-Mutationen in Genen, die für die Zielstruktur Gyrase codieren. Von Oethinger et al. (2000) konnten dabei zeigen, dass eine intakte Funktion der AcrAB/TolC-Effluxpumpe eine Voraussetzung für die Entstehung solcher *target*-Mutationen darstellt [158]. Daher stellte sich die Frage, ob Induktionsphänomene durch Fluorchinolone selbst zu einer leichten Erhöhung der Expression von *acrAB* führen.

Die Erhöhungen der MHK-Werte, die mit Einzelmutationen einhergehen, sind oft nicht ausreichend groß, um eine klinische Resistenz auszuprägen. Erst die Kombination von mehreren Mutationen führt zum Überschreiten des Grenzwertes für klinische Resistenz von einer MHK  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ . Wird für eine einzelne Mutation eine durchschnittliche Mutationsfrequenz von  $10^{-8}$  zugrunde gelegt, so liegt die Mutationsfrequenz zum Erreichen klinischer Fluorchinolone-resistenz in einem Selektionsschritt theoretisch bei  $10^{-32}$  bis  $10^{-40}$  [231].

Welchen Einfluss Gyrase-Mutationen auf die Expression von *acrAB* haben, auch in Hinblick auf Folgemutationen und Mutationsfrequenz, ist daher von Interesse.

Veränderungen in den Enzymaktivitäten von Topoisomerase I und Gyrase aufgrund bestimmter Mutationen in den dafür codierenden Genen oder durch Inhibition führen zu Veränderungen der Superspiralisierung der bakteriellen DNA und können dadurch zu einem veränderten Expressionsmuster führen [205, 16]. Daher ergab sich als weitere Frage, ob oder inwieweit diese Superspiralisierungsgrad-Veränderung einen regulatorischen Einfluss auf die Expression von *acrAB* nimmt.

### 4.2.1 Haben *gyrA*-Mutationen oder GyrA-Inhibitoren einen Einfluss auf die Expression?

Um den Einfluss von *gyrA*-Mutationen auf die Aktivität des Promotors von *acrAB* betrachten zu können, wurden *E. coli*-Stämme mit verschiedenen Kombinationen der bevorzugt auftretenden Mutationen an den Positionen Ser-83 und Asp-87 ausgewählt. Hierbei handelt es sich um die zu dem *E. coli*-Ausgangsstamm WT isogenen Gyrase-Mutanten WT3-1 (*gyrA*<sup>S83L, D87G</sup>), WT3-2 (*gyrA*<sup>D87G</sup>) und MI (*gyrA*<sup>S83L</sup>) (Tab. 2.10) [16, 75].

Die Ergebnisse (Abb. 3.17, Tab. 3.4 und Tab. 3.5) zeigten für die *gyrA*-Doppelmutante WT3-1 keinen signifikanten Unterschied in der Aktivität von *pacrAB* zum Ausgangsstamm WT. Für die *gyrA*-Mutante WT3-2 mit der Einzelmutation an Position 87 trat hingegen ein deutlicher Unterschied auf (ca. 210 %). Auch für die *gyrA*-Mutante MI mit der Einzelmutation an Position 83 konnte mittels des U-Testes und bei Betrachtung der einzelnen Messungen ein signifikanter Unterschied (ca. 150 %) festgestellt werden, der jedoch nicht so ausgeprägt ist wie bei WT3-2.

Eine Bestätigung für das Ergebnis mit MI liefern Daten zur Akkumulation von Ciprofloxacin in MI im Vergleich zu WT [75, 83]. Hier konnte gezeigt werden, dass je nach Zeitpunkt der Probennahme in MI nur noch zwischen 65 - 85 % der Ciprofloxacinkonzentration anfallen (WT = 100 %). Dies könnte auf die in dieser Arbeit gezeigte leichte Erhöhung der Expression von *acrAB* zurückgeführt werden.

Da in den Einzelmutanten eine Erhöhung in der Expression von *acrAB* vorliegt, könnte angenommen werden, dass durch den gesteigerten Efflux des Fluorchinolons die Möglichkeit eine weitere Resistenzmutation auszubilden erhöht ist. Diese Idee wird noch durch den Umstand bestärkt, dass solche Folgemutationen in anschließenden Selektionsschritten tatsächlich gefunden werden [220, 75]. Zumal das Ausmaß der Erhöhung der Aktivität von *pacrAB* in der Mutante WT3-2 (*gyrA*<sup>D87G</sup>) ausgeprägter ist, könnte man weiter annehmen, dass diese Mutation im ersten Selektionsschritt bevorzugt vorkommt.

Zur Diskussion dieser Hypothesen können bekannte Daten von Bagel et al. (1999) und Schulte (2001) mit herangezogen werden (Tab. 4.1).

Zunächst einmal sprechen Daten über die tatsächliche Häufigkeit des Auftretens der Mutation

## 4.2 Einfluss verschiedener Topoisomerase-Mutationen und -Inhibitoren auf die Expression von *acrAB*

Stamm	MHK CIP [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] [16]	Qsc * [16]	Generationszeit [min] [194] ([16])
WT	0,015	1,6	17 (25)
WT3-1	1	1,49	20
WT3-2	0,25	1,17	16 (27)
MI	0,5	1,37	19 (26)

**Tabelle 4.1:** Charakteristika der untersuchten *gyrA*-Mutanten und ihrem Ausgangsstamm WT nach [16, 194].

\* Qsc, Quotient *ptopA-bla/pgyrA-bla*, gibt den relativen Superspiralisierungsgrad an.

an Position 87 im Vergleich zur Position 83 gegen die Vermutung, dass erstere aufgrund der höheren *acrAB*-Expression bevorzugt wird. Denn bei der Entwicklung der Resistenz gegenüber Fluorchinolonen in *E. coli* kommt es zunächst meist zu Mutationen an Position 83, oftmals kombiniert mit der Mutation an Position 87 [220, 187, 118]. Dabei treten Mutationen an Position 87 alleine in *E. coli* relativ selten auf [118].

Eine mögliche Ursache mag dabei sein, dass eine Einzelmutation an Position 83 im Vergleich zu 87 zu einer höheren MHK führt (Tab. 4.1) [118] und somit der Zelle einen deutlichen Vorteil hinsichtlich des Überlebens bzw. der Ausbildung weiterer Mutationen bietet. Solche zusätzlichen Mutationen, meist an Position 87, gelten als notwendig für die Ausbildung einer klinisch relevanten Resistenz.

Einen weiteren interessanten Ansatzpunkt liefern die Daten zum relativen Superspiralisierungsgrad (Qsc). Für alle drei Stämme (WT3-1, WT3-2 und MI) konnte relativ zum Ausgangsstamm WT eine durch die Gyrase-Mutation(en) verursachte verringerte negative Superspiralisierung gezeigt werden (Tab. 4.1). Hierbei fällt auf, dass WT3-2 die stärkste Abnahme aufweist. Der Effekt ist bei MI weniger stark ausgeprägt und erfährt in WT3-1 mit der Doppelmutation wieder eine Erhöhung in Richtung WT-Niveau.

Durch diese Daten könnte die Annahme entstehen, dass eine Verringerung des Superspiralisierungsgrads eventuell ungünstiger für die Zelle ist und damit ein Bestreben hin zum WT-Niveau bevorzugt wird. Dies wäre auch eine weitere Erklärung für die Tendenz zur Mutation an Position 83, ein "normaler" Superspiralisierungsgrad (WT-Niveau) ist dem potentiellen Vorteil *acrAB*-Expressionserhöhung übergeordnet.

Ein Einfluss der Aktivität von *pacrAB* auf die Wachstumsgeschwindigkeit kann nicht diskutiert werden, da im Vergleich mehrerer Daten kein Unterschied zwischen den Stämmen zu erkennen ist (Tab. 4.1).

Die Ergebnisse zum Einfluss von Ciprofloxacin und Ofloxacin in subinhibitorischen Konzentrationen (0,5x MHK) auf die Expression von *acrAB* ergaben eine geringe Abnahme der Aktivität von *pacrAB* um ca. 15-20 % für beide Fluorchinolone (Abb. 3.19). Dies zeigte sich sowohl für den Ausgangsstamm WT als auch für die  $\Delta marR$ -Mutante MII (Tab. 3.6 und Tab 3.9). Dabei wurden in beiden Experimenten (WT und MII) zur Ermittlung der spezifischen Aktivität sowohl RLU/OD %-Werte, als auch die RLU/Proteinmenge %-Werte bestimmt (Tab.

3.8 und Tab. 3.9). Die Bezugsgröße KBE erwies sich aufgrund der großen Schwankungen der Messwerte und der daraus resultierenden hohen Standardabweichung als unbrauchbar, so dass damit keine reproduzierbaren Daten gewonnen werden konnten (Tab. 3.7).

Die gezeigte Verringerung der Expression von *acrAB* konnte inzwischen (2006) teilweise von Bailey et al. mittels RT(*real time*)-PCR bestätigt werden [17]. In dieser Studie wurde der *E. coli*-Stamm MG1655 nach Zugabe von drei verschiedenen Konzentrationen Ciprofloxacin (0,5x, 1x und 2x MHK) in unterschiedlichen Wachstumsphasen, sowie im Vergleich von Minimal- und reichhaltigem Medium, untersucht. Die Ergebnisse zum Einfluss von 0,5x MHK in Minimal-Medium stimmen mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen überein, während in reichhaltigem Medium kein Effekt aufgezeigt werden konnte.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Fluorchinolonen (Ciprofloxacin, Moxifloxacin) zu einem erniedrigten negativen Superspiralisierungsgrad (Qsc) führt [16, 146], wie das auch schon für *gyrA*-Mutationen gezeigt werden konnte. Denn während ein Teil der in der Zelle vorhandenen Gyrase durch Zugabe subinhibitorischer Fluorchinolone-Konzentrationen im ternären Komplex gebunden ist, der mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit eine replikative Helicase blockiert, kann ein ungebundener Teil die lebensnotwendige Funktion in eingeschränktem Ausmaß aufrecht erhalten. Doch während es bei *gyrA*-Punktmutationen zu einer Erhöhung der Aktivität von *pacrAB* kommt, tritt bei Zugabe von Gyrase-Inhibitoren (Fluorchinolone) das Gegenteil auf.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann eine Induktion der Expression von *acrAB* durch Fluorchinolone ausgeschlossen werden.

### 4.2.2 Welchen Einfluss hat der Superspiralisierungsgrad auf die Expression?

Weitere Untersuchungen zum Einfluss des Superspiralisierungsgrads auf die Expression von *acrAB* sollten zunächst Aufschluss über eine mögliche Korrelation zwischen Qsc und RLU/OD % Quotient geben. Dazu wurden der Ausgangsstamm JTT1 und die isogenen Topoisomerase-Mutanten KD112 (*gyrB226*) und RS2 (*topA10*) untersucht (Tab. 2.10). KD112 weist einen verringerten und RS2 einen erhöhten negativen Superspiralisierungsgrad im Vergleich zu JTT1 auf (Tab. 4.2). Diese Stämme wurden zusätzlich in An- und Abwesenheit des Gyrase-Inhibitors Novobiocin vermessen. Der Wirkmechanismus von Novobiocin beruht auf der Inhibition der Gyrase-Funktion durch Bindung an GyrB, genauer Inhibition der ATP-abhängigen Strangpassage durch das GyrB-Dimer mittels allosterischer Hemmung [37, 66]. Dadurch verursacht Novobiocin ebenso wie die *gyrB*-Mutation eine Verringerung des negativen Superspiralisierungsgrads (Tab. 4.2) [16].

Unter Zugrundelegung aller ermittelten Werte ergibt sich für RS2 kein signifikanter Unterschied in der Aktivität von *pacrAB* zum Ausgangsstamm JTT1 (Abschnitt 3.12.3, Abb. 3.21, Tab. 3.10 und Tab. 3.11). Für KD112 konnte hingegen eine deutliche Reduktion in der Expression von *acrAB* auf ca. 50 % gezeigt werden (Abb. 3.21, Tab. 3.10).

## 4.2 Einfluss verschiedener Topoisomerase-Mutationen und -Inhibitoren auf die Expression von *acrAB*

Stamm	Novobiocin [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	Qsc *
JTT1	/	1,87
RS2	/	5,54
KD112	/	1,44
WT	/	1,61
WT	25	1,01
WT	50	0,75
WT	75	0,45

**Tabelle 4.2:** Bekannte Daten bezüglich des Superspiralisierungsgrads (Qsc) verschiedener Stämme.

\* Qsc, Quotient *ptopA-bla/pgyrA-bla*, gibt den relativen Superspiralisierungsgrad an [16].

Bei Zugabe des GyrB-Inhibitors Novobiocin in subinhibitorischer Konzentration (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) kam es bei allen drei Stämmen, ähnlich wie durch die *gyrB*-Mutation in KD112, zu einer deutlichen Reduktion der Expression von *acrAB* um ca. 40 % (Abb. 3.21, Tab. 3.10). Die Ergebnisse deuten auf keine systematische Korrelation zwischen einem höheren bzw. niedrigeren globalen Superspiralisierungsgrad (Qsc-Wert) und der Veränderung der Expression von *acrAB* (RLU/OD %-Wert) hin. Gezeigt werden konnte jedoch ein reduzierender Einfluss der *gyrB*-Mutation und des GyrB-Inhibitors Novobiocin auf die Expression von *acrAB*.

### 4.2.3 Zusammenfassung: Einfluss verschiedener Topoisomerase-Mutationen und -Inhibitoren auf die Expression

Bei Punktmutationen in *gyrA* (S83L oder D87G) kommt es zu einer Erhöhung von ca. 150 % (MI) bzw. 210 % (WT3-2) der Expression von *acrAB*. Diese Ergebnisse könnten einen Einfluss der AcrAB/TolC-Effluxpumpe auf die Entstehung von Folgemutationen vermuten lassen und möglicherweise im Zusammenhang mit der von Lindgren et al. beschriebenen Erhöhung der Mutationsrate im Laufe der Entwicklung von Fluorchinolonresistenz in *E. coli* [118] stehen. Zur weiteren Untersuchung könnten zunächst Ciprofloxacin-Akkumulations-Experimente durchgeführt werden. Aufgrund der bestehenden Ergebnisse für MI (reduzierte Akkumulation) könnten in der Reihenfolge WT - WT3-1 - MI - WT3-2 absteigende Ciprofloxacin-Konzentrationen erwartet werden, bedingt durch die in dieser Reihenfolge steigende *acrAB*-Expression.

Für den Einfluss von Fluorchinolonen (Ciprofloxacin, Ofloxacin) selbst auf die Aktivität von *pacrAB* konnte eine Verringerung um 15-20 % gezeigt werden, weshalb eine Induktion der Expression von *acrAB* durch Fluorchinolone ausgeschlossen werden kann.

Ebenfalls ein reduzierender Einfluss konnte für die *gyrB*-Mutation (*gyrB226*) und den GyrB-Inhibitor Novobiocin in Form einer Verringerung der Aktivität von *pacrAB* um ca. 40-50 % gezeigt werden.

Es scheint zwar keine systematische Korrelation zwischen einem höheren bzw. niedrigeren globalen Superspiralisierungsgrad (Qsc-Wert) und der Veränderung der Expression von *acrAB* (RLU/OD %-Wert) zu bestehen, jedoch deuten die Ergebnisse auf einen Einfluss durch eine lokale Veränderung der Superspiralisierung hin. Da ein verringerter Superspiralisierungsgrad angegeben als erniedrigter Qsc-Wert (global) in einem Fall zu einer Erhöhung (*gyrA*-Mutation, Abschnitt 4.2.1), im anderen Fall zu einer Reduktion der Expression von *acrAB* (Fluorchinolone, *gyrB*-Mutation bzw. Novobiocin Abschnitte 4.2.1 und 4.2.2) führt, könnte dafür eine für die RNA-Polymerase veränderte Zugänglichkeit des Promotors *pacrAB* (lokal) vermutet werden.

Bei dieser letzten Vermutung ist zu bedenken, dass dabei die Veränderungen der lokalen Superspiralisierung für den Promotor im Reporterplasmid im Vergleich zum chromosomal codierten *pacrAB* unterschiedlich sein kann (Abschnitt 4.1.1).

Um die gewonnenen Daten zu unterstützen, müssten zusätzlich noch z.B. RT(*real time*)-PCRs, DNA-Microarrays oder Bestimmungen zur Proteinmenge (AcrA oder AcrB) durchgeführt werden.

### 4.3 Was passiert bei Deletion von *acrAB* bzw. *acrEF*?

Aufgrund des stark überlappenden Substratspektrums der AcrAB/TolC- und der homologen AcrEF/TolC-Effluxpumpe wurde angenommen, dass letztere AcrAB bei Funktionsverlust ersetzt (Abschnitt 1.6.2). In dem Fall würde man annehmen, dass die Zelle die Expression von *acrAB* zugunsten von *acrEF* herunterreguliert oder einstellt.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde zunächst die Expression von *acrAB* des Ausgangsstamms MG1655 und der zugehörigen isogenen Deletionsmutanten MG1655- $\Delta$ *acrAB* und MG1655- $\Delta$ *acrEF* (*in vitro*-Mutagenese) gemessen (Tab. 2.10).

Den Ergebnissen ist bei kritischer Betrachtung aller Werte zu entnehmen, dass wie erwartet, da kein direkter Einfluss von *acrEF* auf *acrAB* bekannt ist (Abschnitt 1.6.1), eine Deletion von *acrEF* keinen Einfluss auf die *acrAB*-Expression hat (Abb. 3.22, Tab. 3.12). Der sehr geringe Unterschied im Versuch unter Selektionsdruck (Tab. 3.13) ist, nach Betrachtung der Einzelwerte, auf die in Abschnitt 4.1.4 aufgeführten statistischen Fehler zurückzuführen.

Für die *acrAB*-Deletionsmutante ist im Vergleich zum Ausgangsstamm eine geringe signifikante Erhöhung der *acrAB*-Expression auf ca. 150 % aufgetreten. Scheinbar reagiert die Zelle auf den Verlust der AcrAB/TolC-Effluxpumpe im ersten Schritt mit dieser leichten Erhöhung der *acrAB*-Expression, da der *in vitro* verursachte Genverlust von der Zelle nicht sofort durch einen Kompensationsmechanismus ausgeglichen werden kann.

Um zu überprüfen, ob in *acrAB*-Deletionsmutanten die Expression von *acrEF* erhöht ist, wurden die Stämme mit dem Reporterensystem pPHB333 transformiert und vermessen.

Hierbei ergab sich, dass *acrEF* in allen drei Stämmen nicht exprimiert wird, da die gemessenen RLU-Werte der Hintergrundaktivität entsprechen (Abschnitt 3.13.2).

Eine mögliche Erklärung dafür besteht darin, dass die *acrAB*-Deletionsmutante erst nach Akquisition weiterer Mutationen den Verlust kompensieren kann. Die bekannten Daten zur Regulation von *acrEF* unterstützen diese Annahme. Nach einem Selektionsschritt kann eine Insertion bestimmter IS-Elemente (IS1, IS2) im Promotorbereich von *acrEF* erfolgen (Abschnitt 1.6.2) [98, 90]. So kommt es möglicherweise durch die zusätzlichen Promotoren der IS-Elemente in diesem DNA-Bereich oder durch die Bildung von Hybridpromotoren zu einer verstärkten Expression von *acrEF*.

Daher wären Messungen mit den entwickelten Reporterensystemen in dem Stamm MG1655- $\Delta$ *acrAB* nach Ein-Schritt-Selektion ein möglicher weiterführender Versuchsan-satz.

#### 4.4 Untersuchungen zur globalen Regulation durch das *mar*-Operon

Mutanten mit Mutationen in *marR* oder *marO* weisen Tetracyclin-Resistenz auf. Das bedeutet, da nicht auf Tetracyclin selektiert werden kann, dass in erster Linie mit dem Reporterensystem pPHB335 gearbeitet werden muss. Ausnahmen waren einige Stämme, bei denen die Tetracyclin MHKs unter 10  $\mu$ g/mL lagen, so dass auch pPHB331 bzw. pPHB333 eingesetzt werden konnten.

Des Weiteren ist die sogenannte Induktion des *mar*-Operons durch Tetracyclin und Chloramphenicol kritisch zu betrachten. Diese Induktionsversuche von Hächler et al. wurden mit drei verschiedenen Stämmen (Wildtyp, *marR*-Mutante und *marR-marA*-Mutante) durchgeführt und eine Erhöhung der mRNA-Menge von MarA mittels Northern Blot quantifiziert [71]. Während dieses Versuchs befanden sich die zu vergleichenden Zellen zum Zeitpunkt der Gesamt-RNA-Gewinnung nicht in der gleichen Wachstumsphase. Außerdem lag die Temperatur bei der Anzucht der Bakterien, im Vergleich zu den Versuchen in dieser Arbeit, bei 30°C, was zu einer stärkeren Ausprägung des MAR-Phänotyps führt [6].

Die Ergebnisse zeigen eine geringe Erhöhung für den Wildtyp AG100 und wesentlich stärkere Effekte für die *marR*-Deletionsmutante, sowie für den gleichen Stamm mit einer zusätzlichen Insertion in *marA*. Ob die erhöhten MarA mRNA-Konzentrationen auch auf Proteinebene eine Rolle spielen, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Eventuell könnte der von Hächler et al. postulierte Effekt eine Antwort der Zelle auf die Hemmung der Proteinsynthese durch Tetracyclin und Chloramphenicol sein.

Ein Vergleich verschiedener in dieser Arbeit durchgeführter Versuche (RLU/OD-Werte für pPHB331 verglichen mit pPHB335), zeigt deutlich, dass durch Tetracyclin-Zugabe lediglich eine geringe Erhöhung der Aktivität des *pacrAB*-Promotors (max. um etwa 30 %) erfolgt. Es kommt, die Expression von *acrAB* betreffend, nicht zu dem von Hächler et al. beschriebenen Effekt, wie er in z.B. *marR*-Deletionsmutanten auftritt (z.B. 300 %, Abschnitte 3.11.6, 3.12.7 und 3.12.8).

Dieser geringe Effekt von max. 30 % wurde einerseits dadurch vermieden, dass die Versuchsanzucht für die Probenziehung in Abwesenheit des Selektionsantibiotikums erfolgte. Andererseits kommt es durch diesen Effekt durch Verwendung des RLU/OD % Quotienten zu keiner Beeinflussung der Werte. Dadurch, dass sowohl die Werte (RLU bzw. RLU/OD) der Bezugsprobe (Ausgangsstamm, -bedingung) als auch die der zu untersuchenden/vergleichenden Probe (Mutanten, Induktion) eine Erhöhung in gleichem Ausmaß aufweisen, kürzt sich durch die Bildung des RLU/OD % Quotienten dieser Effekt heraus (Abschnitt 2.3.14).

In jedem Fall konnten die Überexpressionsversuche mit pPHB338 in *marR*-Deletionsmutanten (MIII, MIVa) zeigen, dass bei einer weiteren MarA-Erhöhung phänotypisch kein Effekt auftritt, während es beim Ausgangsstamm WT zu einer geringen Erhöhung um eine MHK-Stufe kommt, die aber für die "Selektionsproblematik" dann keine Rolle spielt (Abschnitt 3.15).

In den folgenden Abschnitten, in denen die mögliche Induktion durch Tetracyclin eine Rolle spielen könnte, wird dieser Punkt entsprechend mitdiskutiert.

#### 4.4.1 Quantifizierung der Expression von *acrAB* in unterschiedlichen *mar*-Mutanten

Hochgradig Fluorchinolon-resistente *E. coli*-Stämme weisen zu den *target*-Mutation meist zusätzlich *non target*-Mutationen auf. Oftmals handelt es sich dabei um Mutationen im *mar*-Operon und dabei genauer in *marO* (z.B. in WT3-1-MB21) oder *marR* (z.B. in WT3-1-M21) (Stämme: Tab. 2.10, Abschnitt 1.4). Diese Mutationen führen zu einer gesteigerten Bildung von MarA, was wiederum über Induktion nachgeordneter Gene zur Ausprägung des sogenannten MAR-Phänotyps (*multiple antibiotic resistance*) führt (Abschnitt 1.5.3.1).

Stamm	CIP *	TC *	CLM *	<i>marR/marO</i>	RLU/OD %
AG100	< 0,015	0,5	ND	/	100 %
AG102	0,03	2-4	ND	<i>marR</i> G77T	327 ± 55
WT	0,015	1-2	4-8	/	100 %
MII	2	1-2	16	<i>marR</i> Δ175	384 ± 59
MIII	64	2-4	64	<i>marR</i> Δ74	540 ± 100
WT3-1-M21	4-8	2-4	64	<i>marR</i> Δ80	836 ± 158
WT3-1-M26	4-8	2-4	64	<i>marR</i> A53P	565 ± 84
WT3-1-M27	4-8	2-4	64	<i>marR</i> L33P	632 ± 145
WT3-1-MB21	4-8	2-4	64	<i>marO</i> ::19bp	381 ± 48

Tabelle 4.3: MHK-Werte von Ciprofloxacin (CIP) und Tetracyclin (TC) verschiedener *E. coli*-Stämme.

\* [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ], ermittelt von Antje Schnasse bzw. in dieser Arbeit.

ND: *non determined*

Ein aus der Literatur bekannter Mechanismus, der zu der erhöhten Resistenz gegenüber unterschiedlichen Antibiotika beiträgt, ist die über MarA aufregulierte Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe. In Abschnitt 4.1.3 wurde dieser Zusammenhang schon genutzt, um die Funktionalität der entwickelten Reporterensysteme zu überprüfen.

Die dabei vermessenen *E. coli*-Stämme MII und MIII, die beide unterschiedliche *marR*-Deletionen besitzen, zeigten im Vergleich zu ihrem Ausgangsstamm WT eine deutliche signifikante Erhöhung der Aktivität von *pacrAB* (Tab. 4.3). Zwischen MII und MIII konnte kein signifikanter Unterschied (p-Wert) ermittelt werden (Abb. 3.12). Bei Gegenüberstellung dieser genotypischen Daten mit phänotypischen in Form von MHK-Werten (Tab. 4.3), fällt zunächst für Ciprofloxacin auf, dass die Werte von MII fünf Stufen unter denen von MIII liegen, während der Unterschied in den MHK-Werten für Tetracyclin und Chloramphenicol nicht so stark ausgeprägt ist. Hierfür sind die in MIII zusätzlich vorhandenen *gyrA*- und *parC*-Mutationen verantwortlich, was durch Dominanztests von Heisig et al. gezeigt werden konnte. Zudem ergaben in dieser Studie ermittelte Daten zur Akkumulation von Ciprofloxacin für MII und MIII gleich große Konzentrationen [75], was mit den in dieser Arbeit erhaltenen Daten zur Expression von *acrAB* korreliert.

Für die Lage der beiden Deletionen in MarR ergibt sich Folgendes: Bei MII sind die Aminosäuren 32-91 deletiert, wonach dann im Gen ein Stop-Codon folgt, d.h. es fehlt beinahe der gesamte für die DNA-Bindung erforderliche Bereich und die Transkription wird vorzeitig abgebrochen. In MIII sind die Aminosäuren 120-144 in MarR deletiert, ein für die Dimer-Bindung sowie die Funktion wichtiger Bereich (Abschnitt 4.4.2).

Durch Untersuchung des *E. coli*-Stamms AG100 und der isogenen *marR*-Punktmutante AG102, sollte überprüft werden, ob mit dem Reporterensystem auch der Einfluss einer Punktmutation in *marR* auf die Expression von *acrAB* identifiziert bzw. quantifiziert werden kann.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen einen deutlichen signifikanten Unterschied im Ausmaß der Expression von *acrAB* von über 300 % zwischen diesen beiden Stämmen (Abb. 3.24, Tab. 3.15, Tab. 4.3).

Die MHK-Werte von Ciprofloxacin für AG100 und AG102 unterscheiden sich um 1-2 Stufen (Tab. 4.3), wobei die *marR*-Punktmutante AG102 keine klinisch relevante Resistenz zeigt (MHK  $\geq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Das verstärkte Herauspumpen des Fluorchinolons allein bringt dem Bakterium nur einen geringen Überlebensvorteil. Für die Ausprägung hoher (klinisch relevanter) Resistenz gegenüber Ciprofloxacin sind zusätzliche *target*-Mutationen unabdingbar [231]. So ist der phänotypische Effekt der Überexpression von *acrAB* bei Tetracyclin deutlicher (2-3 MHK-Stufen) zu sehen (Tab. 4.3). In der Resistenzentwicklung von Tetracyclinen stellt der Efflux einen Hauptmechanismus dar, aber auch in diesem Fall kommt es lediglich zu intermediärer Empfindlichkeit, nicht zu einer klinisch relevanten Resistenz.

Die Lage der Punktmutation in AG102 an Position 77 scheint insofern optimal für einen Funktionsverlust, da es sich hierbei um eine Position in der  $\alpha$ 4-Helix der *recognition helix*, die maßgeblich für die DNA-Bindung verantwortlich ist, handelt (Abschnitt 4.4.2).

Für den quantitativen Vergleich der Beeinflussung der Expression von *acrAB* durch unterschiedliche *mar*-Mutationen, wurden zu WT3-1 isogene Stämme ausgewählt. Hierbei handelte es sich um eine *marR*-Deletionsmutante (WT3-1-M21, Aminosäure 66-92 deletiert), zwei *marR*-Punktmutanten (WT3-1-M26/-M27, A53P/L33P) und eine *marO*-Mutante (WT3-1-MB21). Bei der Auswahl dieser Stämme spielte neben den verschiedenen *mar*-Mutationen das Vorhandensein der gleichen Topoisomerase-Mutationen eine wichtige Rolle, wodurch eine Vergleichbarkeit der MHK-Werte für Ciprofloxacin gewährleistet ist.

Für alle diese *mar*-Mutanten konnte im Vergleich zu WT eine signifikante Erhöhung der Expression von *acrAB* von ca. 350-900 % je nach Stamm gezeigt werden (Abb. 3.25, Tab. 3.16, Tab. 4.3).

Ebenso konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den *marR*-Mutanten und der *marO*-Mutante gezeigt werden (Abb. 3.25). Für die *marO*-Mutante (WT3-1-MB21) kommt es durch die 19 bp-Duplikation, beginnend am Startcodon bis 19 bp *upstream*, zu einer Verschiebung sowohl der beiden MarR-Bindestellen (*site I/II*), als auch der RNA-Polymerase-Bindestellen (-10, -35) und der *marbox* (MarA-Bindestelle) relativ zum Startcodon. Dies scheint, da MarR selber noch funktionsfähig ist und an seine Erkennungssequenzen binden kann, zu einer Schwächung der Repression zu führen, jedoch nicht im gleichen Ausmaß wie bei Funktionsverlust von MarR. Das unterschiedliche Ausmaß ist vielleicht auch darauf zurückzuführen, dass zwar weniger oder keine Repression des *mar*-Operons durch MarR statt findet, aber eventuell auch eine schwächere Autoaktivierung durch MarA im Vergleich zu den anderen Stämmen aufgrund der eben beschriebenen Verschiebung von Bindungsstellen.

Ein weiterer signifikanter Unterschied konnte für die *marR*-Punktmutante WT3-1-M26 ( $565 \pm 84$ ) und die *marR*-Deletionsmutante WT3-1-M21 ( $836 \pm 158$ ) gezeigt werden (Abb. 3.25). Zwischen den beiden Punktmutanten WT3-1-M26 und -M27 trat hingegen kein Unterschied auf (Abb. 3.25). Zwar konnte für WT3-1-M27 und -M21 ebenfalls kein Unterschied ermittelt werden, trotzdem könnte man diesen bei Betrachtung der einzelnen Werte und der Tatsache, dass WT3-1-M26 definitiv nicht unterschiedlich zu WT3-1-M27 jedoch unterschiedlich zu WT3-1-M21 ist, in Frage stellen bzw. kritisch betrachten (Abb. 3.25). Bei den Messungen auch bei Wiederholungen konnte in jedem Fall für WT3-1-M21 die größte Erhöhung in der Aktivität von *pacrAB* gezeigt werden, gefolgt von WT3-1-M26 und -M27. Während WT3-1-MB21 in jedem Fall die geringste Erhöhung der Aktivität von *pacrAB* aufwies (Abb. 3.25).

Bei Gegenüberstellung dieser genotypischen Daten mit den MHK-Werten von Ciprofloxacin, Tetracyclin und Chloramphenicol fällt auf, dass die Unterschiede in der Expression von *acrAB* und die Art der Mutation phänotypisch scheinbar zu keinem Unterschied führen (Tab. 4.3).

Dabei könnte eine "Sättigung" der Zelle an Effluxpumpe mit zu bedenken sein, d.h. es gibt wahrscheinlich eine maximal tolerierbare Menge an Pumpe, die in die Membran eingebaut werden kann.

Vielleicht kommt es auch bei geringerer Wachstumsgeschwindigkeit durch "Luciferase-Akkumulation" in den Zellen zu den höheren Werten. Denn auffällig schien, dass je langsamer ein Stamm wuchs, d.h. je mehr Zeit bis zum Erreichen der für die Probenziehung gewünschten OD nötig war, desto höher war der RLU/OD % Quotient. Zur Klärung des

Zusammenhangs der Wachstumsgeschwindigkeit und des RLU/OD % Quotienten könnten entsprechende Untersuchungen (Bestimmung der Generationszeit), in Hinblick auf die Fitness dieser *mar*-Mutanten (Abschnitt 4.5), durchgeführt werden.

### 4.4.2 3D-Strukturmodelle von MarR aus verschiedenen *marR*-Punktmutanten

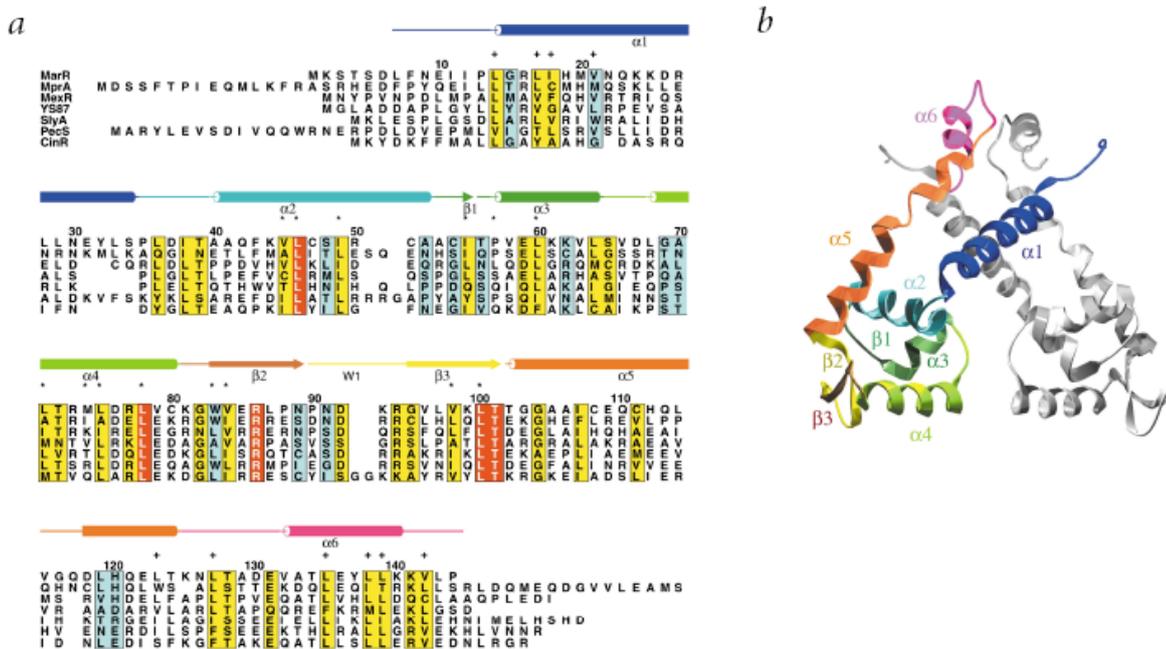
Für die Betrachtung der MarR-3D-Strukturmodelle ist es notwendig, zunächst die bekannten Daten bezüglich der Struktur und der Zuordnung von Aminosäure-Bereichen zu bestimmten Funktionen dieses Repressorproteins zu erläutern. Dabei ist für die folgende Erläuterung die farblich markierte Darstellung in Abbildung 4.1 hilfreich.

MarR agiert als Dimer, dessen Monomere zwei Domänen ( $\alpha/\beta$ -Protein) besitzen. Der N-Terminus und C-Terminus des jeweiligen Monomers umfasst den Aminosäure-Bereich 10-21 bzw. 123-144. Diese Bereiche treten in Wechselwirkung mit den entsprechenden Bereichen des anderen Monomers und bewirken dadurch einen Zusammenhalt des Dimers. Genetische und biochemische Experimente konnten dem N-Terminus den Protein-Protein-Kontakt (Dimer-Bildung) und dem C-Terminus einen wichtigen Beitrag für die Funktion zuordnen. Für die Stabilisierung der Dimer-Bindung konnten im Detail Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren Lys24 und Pro144', Glu10 und Lys140', sowie eine Salzbrücke zwischen den Aminosäuren Asp67 und Arg73' identifiziert werden. Durch diese Zusammenlagerung der Monomere kommt es im Zentrum des Dimers zur Bildung eines elektropositiven Tunnels [7].

Vorangegangene Studien hatten für die DNA-Binderegion den Aminosäure-Bereich 61-121 identifiziert [5]. Durch die mittlerweile bekannte Kristallstruktur konnte der Bereich 55-100 als entscheidend für die DNA-Bindung benannt werden. Dieser Bereich umfasst in jedem Monomer ein sogenanntes *winged-helix*-DNA-Bindemotiv. Dieses Motiv beinhaltet zwei  $\alpha$ -Helices, sowie drei kurze  $\beta$ -Faltblätter, welche über ein W1-Motiv verbunden sind ( $\beta1-\alpha3-\alpha4-\beta2$ -W1- $\beta3$ , Abb. 4.1). Dabei bildet die Helix  $\alpha4$  die sogenannte *recognition helix*, und beeinflusst zusammen mit dem W1-Motiv maßgeblich die DNA-Bindung. Obwohl die beiden DNA-Bindedomänen der Monomere sehr nah aneinander grenzen, funktionieren sie völlig unabhängig [7].

Um die Ergebnisse der Energieminimierungen (Abschnitt 3.16) für die beiden *marR*-Punktmutanten WT3-1-M26 und WT3-1-M27 (Tab. 2.10) besser beurteilen zu können, wurden parallel Energieminimierungen für die *marR*-Punktmutanten R73C und R94C durchgeführt. Für diese beiden Mutanten sind bereits viele Daten zur Auswirkung der Mutation bekannt.

Generell fällt bei allen vier durch Punktmutationen beeinflussten 3D-Strukturmodellen sowohl in den überlagerten Abbildungen als auch den RMSD-Werten auf, dass es zu einer sehr geringen Abweichung die gesamte Struktur betreffend kommt.



**Abbildung 4.1:** a: Sequenz-Alignment von MarR verschiedener Mitglieder der MarR-Familie. Sekundär-Strukturelemente sind wie folgt gekennzeichnet:  $\alpha$ -Helices röhrenförmig,  $\beta$ -Faltblätter als Pfeile, die einzige *winged region* als W1. Die Nummerierung stimmt mit der primären Sequenz überein. Die Aminosäuren, die in allen Homologons identisch sind, sind rot markiert, hoch konservierte Aminosäuren gelb und mäßig konservierte Aminosäuren blau. Aminosäuren, die mit einem "plus" gekennzeichnet sind, bilden den hydrophoben Ring der N-/C-terminalen Domäne, und die mit einem "Stern" gekennzeichneten Aminosäuren bilden den hydrophoben Ring der einzelnen DNA-Bindedomäne. Die Proteine, die für das Alignment verwendet wurden, stammen von den folgenden Organismen: MarR, *E. coli*; MprA (EmrR), *E. coli*; MexR, *P. aeruginosa*; YS87, *Mycobacterium tuberculosis*; SlyA, *S. typhimurium*; PecS, *Erwinia chrysanthemii*; and CinR, *Butyrivibrio fibrisolvens*.  
 b: *ribbon*-Darstellung des MarR-Dimers. Die Sekundär-Strukturelemente sind farblich entsprechend der Beschreibung in a gekennzeichnet. [7]

Für die Mutation R73C ist durch verschiedene Untersuchungen bekannt, dass sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Funktion von MarR aufgehoben ist. Als Ursache wird die fehlende Stabilisierung der relativen Orientierung der beiden DNA-Binderegionen zueinander angesehen. Dabei spielt der Wegfall einer Salzbrücke zwischen der Aminosäure Arginin an Position 73 mit der Aminosäure Asparaginsäure an Position 67' des anderen Monomers die entscheidende Rolle [7]. Bei Betrachtung der Bilder der durch Energieminimierung erhaltenen 3D-Strukturmodelle ist diese Begründung sehr anschaulich nachzuvollziehen (Abb. 3.42 und 3.43).

Die Mutation R94C liegt in der "Spitze" des W1-Motivs und damit im Bereich, der maßgeblich für die DNA-Bindung eine Rolle spielt. So konnte auch gezeigt werden, dass dieser Aminosäureaustausch *in vivo* zu einem inaktivem MarR-Protein führt. Der genaue Mechanismus ist dabei noch ungeklärt [7]. Durch die Abbildungen 3.45 und 3.46, in denen die Ausgangsstruktur von WT mit der dieser Punktmutante überlagert wurde, lässt sich die Auswirkung der Mutation erkennen. So fällt besonders die Verkürzung durch das Cystein auf, wodurch bestimmte Wechselwirkungen mit der DNA nicht statt finden können. Dabei hat sicherlich auch der Austausch einer stark basischen Gruppe gegen eine Mercapto-Gruppe einen Einfluss auf mögliche Wechselwirkungen an dieser Position.

Für WT3-1-M26 und damit für die Mutation A53P zeigt sich wieder nur eine minimale Änderung, vornehmlich in den *loops*, der gesamten Struktur des Dimers und der erhaltenen RMSD-Werte im Vergleich zu WT. Durch die Lage der Mutation an Position 53 innerhalb des  $\beta$ 1-Faltblattes und damit innerhalb des für die DNA-Bindung wichtigen Bereichs kann vermutet werden, dass diese Bindung beeinträchtigt wird. Bei näherer Betrachtung der überlagerten Darstellungen von Mutante und Ausgangsstamm (Abb. 3.36 und 3.37) fällt besonders die Richtungsneigung der beiden unterschiedlichen Aminosäuren auf. Aufgrund der Neigung des Alanins nach "außen" könnte angenommen werden, dass hier normalerweise Wechselwirkungen mit der Bindungsstelle eingegangen werden. Eine andere Hypothese wäre, dass es durch die Neigung des Prolins nach "innen" und dem großen frei drehbaren Pyrrolidiny-Restes (basisch) zur Beeinflussung anderer Aminosäuren und dadurch zum Funktionsverlust von MarR kommt. Durch einen sogenannten *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) könnte überprüft werden, ob die Mutation an Position 53 zu einer fehlenden/beeinträchtigten Wechselwirkung zwischen MarR und dem DNA-Bindebereich führt.

Auch für die Mutation in WT3-1-M27 L33P scheint es zu keiner auffälligen Änderung der Gesamtstruktur zu kommen. Die Position 33 liegt an einem Ende der  $\alpha$ 1-Helix nahe des Bereichs, der für die Dimer-Bildung wichtig ist. Anhand der Abbildungen 3.39 und 3.40 könnte man vermuten, dass es durch die Mutation zu fehlender Wechselwirkung mit der  $\alpha$ 2-Helix kommt.

Um genauere Aussagen machen zu können, könnte man zum Einen die sterische Anordnung der Aminosäuren, die innerhalb eines möglichen Interaktionsbereiches der ausgetauschten Aminosäuren liegen, im Vergleich zur Ausgangssituation betrachten. Zur weiteren Unter-

suchung *in silico* wäre es jedoch interessanter sogenannte Molekül-Dynamik-Simulationen (MDS) durchzuführen.

Funktionelle Proteine wie MarR sind keine starren Moleküle, sondern durchlaufen verschiedene Konformationen in Wechselwirkung mit ihrer Zielstruktur. Molekül-Dynamik-Simulationen mit Hilfe bestimmter Computerprogramme (z.B. GROMACS), eröffnen die Möglichkeit diese Bewegungen über eine bestimmte zeitliche Periode zu beobachten. Dafür wäre es natürlich vorteilhafter, wenn es Daten zu MarR als Dimer gebunden an die DNA-Binderegion gäbe (Kristallstruktur, PDB-Daten).

### 4.4.3 *mar*-abhängige und *mar*-unabhängige Induktion der Expression von *acrAB* durch Salicylsäure

Bei der Induktion des MAR-Phänotyps durch Salicylsäure handelt es sich um einen gut untersuchten Mechanismus. Es ist bekannt, dass durch Bindung von Salicylsäure-Molekülen an den Repressor MarR dessen Bindung an die entsprechenden DNA-Bindestellen innerhalb von *marO* verhindert wird [34, 7]. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Bildung des globalen Aktivators MarA, der in der Lage ist, die Transkription verschiedener Gene zu aktivieren, unter anderem auch von *acrAB* [135] (Abschnitt 1.5.3.1). Zusätzlich zu dieser *mar*-abhängigen Induktion von Salicylsäure scheint es auch einen weiteren Mechanismus zu geben, der bisher noch nicht näher untersucht wurde [34].

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Reportergensystem pPHB331 sollte ermittelt werden, ob die Theorie der *mar*-unabhängigen Induktion der Transkription von *acrAB* mit diesem Konstrukt zu identifizieren und zu quantifizieren ist. Dazu wurde die *marR*-Deletionsmutante MII in An- und Abwesenheit von Salicylsäure im Vergleich zum Ausgangsstamm WT vermessen.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Steigerung der Aktivität des Promotors von *acrAB* auf ca. 280 %, die durch die *marR*-Deletion hervorgerufen wird, nach Zugabe von Salicylsäure noch eine weitere Erhöhung auf ca. 350 % erfährt (Abb. 3.23, Tab. 3.14). Daher könnte angenommen werden, dass diese weitere Erhöhung auf einem *mar*-unabhängigem Wege erfolgt.

Die in Abschnitt 4.4.1 diskutierten Experimente mit den unterschiedlichen *mar*-Mutanten weisen jedoch daraufhin, dass die Aktivität des Promotors von *acrAB* bei verschiedenen Mutationen in *marR* unterschiedlich stark erhöht ist (Abschnitt 4.4.1). Daher könnte das Ausmaß der Salicylsäure-Induktion in MII ebenso, innerhalb dieses Messsystems, auf einer zusätzlichen Beeinflussung von MarR beruhen.

Dies scheint sowohl aufgrund des großen deletierten Bereichs (60 Aminosäuren) des Proteins mehr als fraglich, als auch bei Betrachtung der 3D-Struktur von MarR bzw. der identifizierten Bereiche für die Bindung der Salicylsäure-Moleküle. Denn die Positionen Thr72, Arg80, Ala70 und Arg77, die für die Interaktion mit den Salicylsäure-Molekülen verantwortlich gemacht werden konnten, liegen im Bereich der Deletion in MarR von MII (Positionen 32-91)

[7]. Dadurch kann eine mögliche Interaktion ausgeschlossen werden. Daher ist die gezeigte Erhöhung der Expression von *acrAB* in MII in Anwesenheit von Salicylsäure ein Hinweis auf einen *mar*-unabhängigen Mechanismus.

### 4.4.4 Einfluss des *mar*-Operons auf die Expression von *acrEF*

Der Einfluss des *mar*-Operons auf die Expression der AcrEF/TolC-Effluxpumpe ist bisher experimentell nicht gezeigt worden. Allein mit Hilfe bestimmter Algorithmen wurde im Promotorbereich, d.h. innerhalb der intergenischen Region zwischen *acrE* und dem lokalen Repressor *acrS* eine Sequenz für die sogenannte *marbox* (MarA-Bindestelle) postuliert (Abschnitt 1.6.2).

Mittels eines in dieser Arbeit durchgeführten Alignments der beiden Promotoren *pacrAB* und *pacrEF* und Vergleich mit der von Martin et al. 1999 vorgeschlagenen Konsensussequenz [129], wurde eine weitere mögliche *marbox* identifiziert (Abschnitt 3.19, Datenblatt A.2). Um herauszufinden, welche der beiden möglichen Bindebereiche tatsächlich für die MarA-Bindung eine Rolle spielt, müsste z.B. ein DNase Footprinting Assays durchgeführt werden.

#### 4.4.4.1 Führen *marR*-Mutationen zur Überexpression von *acrEF*?

Ob oder inwieweit MarA tatsächlich einen Einfluss auf die Expression von *acrEF* ausübt, sollte mit Hilfe des Reportersystems pPHB333 untersucht werden. Zu diesem Zweck mussten *E. coli*-Stämme mit einer erhöhten Expression von MarA vermessen werden. Daher wurden die Stämme MII und MIII (*marR*-Deletionsmutanten) ausgewählt. Zum Einen ist die Tetracyclin-Resistenz dieser Stämme nicht in einem Maße erhöht, dass keine Selektion mit dem Antibiotikum mehr erfolgen könnte. Zum Anderen wurde während der Versuchszucht kein Tetracyclin zu Selektionszwecken hinzugegeben, wodurch ein möglicher Einfluss durch Induktion der Expression von *marA* ausgeschlossen werden kann (Abschnitt 4.4).

Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass es in *marR*-Deletionsmutanten, und damit im Zusammenhang mit einer Erhöhung der Expression von *marA*, zu einer Erhöhung der Expression von *acrEF* (MII: ca. 150 %, MIII: ca. 290 %) kommt (Abb. 3.32, Tab. 3.25).

Jedoch sind die absoluten Werte (RLU) für die Expression von *acrEF* in dem Ausgangsstamm WT und den daraus hervorgegangenen Stämmen MII und MIII sehr gering, so dass die Relevanz einer solcher Erhöhung fraglich ist. Die RLU-Werte deuten eher darauf, dass die AcrEF/TolC-Effluxpumpe in diesen Stämmen nicht von Bedeutung ist. Noch einmal wird die maßgebliche Rolle der AcrAB/TolC-Effluxpumpe als "Hauptpumpe" in *E. coli* untermauert. Interessant könnte in diesem Zusammenhang auch sein mit dem Reportersystem (pPHB333) in An- und Abwesenheit des MarA-Überexpressionsvektors pPHB1838 (Abschnitt 3.9) zu untersuchen, ob in MG1655- $\Delta$ *acrAB* nach einem Selektionsschritt (Abschnitt

4.3) eine Expression und eine Beeinflussung der Expression von *acrEF* durch MarA stattfindet. Voraussetzung für ein solches Experiment wäre, dass eine Kompensation der *acrAB*-Deletion in dem selektierten Stamm durch eine Erhöhung der Expression von *acrEF* gezeigt werden konnte.

### 4.4.4.2 Induktion der Expression von *acrEF* durch Salicylsäure?

Die Untersuchung, ob durch Zugabe von Salicylsäure eine *mar*-abhängige oder *mar*-unabhängige Induktion der Expression von *acrEF* erfolgen kann, fand in Kombination mit den in Abschnitt 4.4.4.1 erläuterten Experimenten statt.

Die Ergebnisse sind mit denen der *marR*-Deletionsmutanten vergleichbar, d.h. auch hier konnte zwar eine signifikante Erhöhung der Expression von *acrEF* (auf ca. 180 %) gezeigt werden, deren Relevanz jedoch ebenfalls fraglich ist. Denn wieder wird deutlich, dass *acrEF* in WT nur sehr gering exprimiert wird.

## 4.5 Charakterisierung von *marA*-Punktmutanten

Der Vorteil einer Resistenz durch Mutationen geht oftmals mit einer Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit der betroffenen Genprodukte einher. Da deren Funktionsfähigkeit jedoch normalerweise Voraussetzung für einen reibungslos ablaufenden Stoffwechsel ist, können solche Resistenzmutationen einen erheblichen Einfluss auf die Fitness und das Ausmaß der Virulenzeigenschaften eines Bakteriums haben [11].

Zu den Parametern, mit deren Hilfe man die Fitness eines Stammes bestimmen kann, zählen z.B. die Wachstumsgeschwindigkeit, die Absterberate im Vergleich zum sensiblen Ausgangsstamm, die Eliminierungsrate durch das wirtseigene Immunsystem und die Milieuanpassung [11].

Eine Beeinträchtigung der Fitness führt zu einer herabgesetzten Konkurrenzfähigkeit in der Umwelt. Daher wurde angenommen, dass durch die signifikant verringerte Fitness von Antibiotika-resistenten Mutanten diese bei Wegfall des Selektionsdrucks durch die sensitiven Stämme verdrängt werden und daher eine Reduktion des Antibiotika-Einsatzes zu einer Eindämmung von Resistenzen führen könnte (Präventivmaßnahmen der WHO 1995).

Im Rahmen der Dissertation von Schulte 2001 ist untersucht worden, ob diese Annahme zutrifft oder, ob eventuell kompensatorische Mutationen diesen Fitnessverlust ausgleichen können. Dafür wurden *in vitro* selektierte *E. coli-marR*-Deletionsmutanten (MIII, MIVa), die eine deutlich verringerte Fitness aufwiesen, in einem Fitness-Kompensationsexperiment untersucht [75, 194].

In diesem Fitness-Kompensationsexperiment wurde eine Selektion der gegenüber verschiedenen Antibiotika resistenten *E. coli*-Stämme MIII und MIVa über 300 Generationen ohne

Einfluss von Antibiotikum vorgenommen. Bei so einem Versuchsansatz setzen sich die lebensfähigsten Keime und damit die mit der höchsten Verdoppelungsrate (höchsten Wachstumsgeschwindigkeit) durch [194].

Nach der Selektion konnten sowohl für MIII als auch für MIVa zwei unterschiedliche Phänotypen MIII300 bzw. MIVa300 und MIII300S16 bzw. MIVa300S32 identifiziert werden. Da diese selektierten, aber immer noch Ciprofloxacin-resistenten Stämme eine dem Niveau des Wildtyps WT wieder angenäherte Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen, muss es zur einer Kompensation des Fitnessverlustes durch weitere Mutation(en) gekommen sein. Die für den Ausgangsstamm WT, die resistenten Stämme MIII und MIVa, sowie für die selektierten Stämme von Schulte 2001 ermittelten Unterschiede sind in Tabelle 4.4 einander gegenübergestellt.

Stamm	Mutationen	Generationszeit * [min]	MHK CIP ** [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	Q <sub>sc</sub> ***	CIP uptake ****
WT	/	17	0,015	1,57	100
MIII	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>parC</i> S80I, <i>marR</i> $\Delta$ 74	32	64	0,96	22
MIII300	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>parC</i> S80I, <i>marR</i> $\Delta$ 74	19	64	1,38	26
MIII300S16	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>parC</i> S80I, <i>marR</i> $\Delta$ 74, <b><i>marA</i> I58N</b>	17	16	1,40	78
MIVa	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>parC</i> S80I, <i>marR</i> $\Delta$ 74	33	256	1,01	29
MIVa300	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>marR</i> $\Delta$ 74	18	128	1,30	26
MIVa300S32	<i>gyrA</i> S83L, D87G, <i>marR</i> $\Delta$ 74, <b><i>marA</i> N21Y</b>	16	32	1,30	61

Tabelle 4.4: Bekannte Daten zu einigen *E. coli*-Stämmen.

\*/\*\*: [194].

\*\*\*: Q<sub>sc</sub>, Quotient *ptopA-bla/pgyrA-bla*, gibt den relativen Superspiralisierungsgrad an [194].

\*\*\*\*: Quotient (Q) zwischen intra- und extrazellulärer Ciprofloxacin-Konzentration [ $c_i/c_e$  (%)] nach Erreichen eines Plateaus (10 min) [194].

Es konnte gezeigt werden, dass die Generationszeitverkürzung der selektierten Mutanten mit einer annähernden "Wiederherstellung" des negativen Superspiralisierungsgrads einhergeht. Für die Änderung des sogenannten Q<sub>sc</sub> könnten Mutationen in Genen für Topoisomerasen oder DNA-Binde- bzw. Beugeproteine verantwortlich sein, was nach Untersuchung verschiedener Gene inklusive der Promotorbereiche bisher nicht gezeigt werden konnte. Die Q<sub>sc</sub>-Daten an sich deuten jedoch auch wieder daraufhin, dass eine dem Ausgangsstamm WT entsprechende DNA-Superspiralisierung für die Lebensfähigkeit der Zellen offensichtlich von Vorteil ist (Abschnitt 4.2) [194].

Eine in der Tabelle nicht mit aufgeführte Änderung ist die im Gegensatz zu MIII und MIVa für

die selektierten Mutanten wiederhergestellte Typ1-Fimbrienexpression über *fimA* (Virulenzeigenschaft). Hier wurde ein Zusammenhang mit dem veränderten Superspiralisierungsgrad als übergeordnetem Regulator der Genexpression vermutet, da Daten über eine solche Beeinflussung bei Virulenzeigenschaften bekannt waren [53, 205]. So konnte gezeigt werden, dass es bei einer durch Novobiocin verursachten Abnahme des Qsc zu einer verringerten Expression von *fimA* kommt [194].

Bei allen selektierten Mutanten blieb die klinisch relevante Ciprofloxacin-Resistenz (MHK  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ) erhalten, wobei jedoch MIII300S16 und MIVa300S32 einen deutlich verringerten MHK-Wert zeigten. Zudem waren diese beiden Stämme zusätzlich intermediär empfindlich gegenüber Tetracyclin und sensibel gegenüber Chloramphenicol [194].

Durch Sequenzierung des *mar*-Locus konnte eine Punktmutation im Gen für den globalen Aktivator MarA als einziger Unterschied zu den Eltern-Stämmen (MIII, MIVa) bzw. den übrigen Mutanten (MIII300, MIVa300) identifiziert werden. Dies führte zu der Vermutung, dass die Überexpression von Genen des *mar*-Regulons wie z.B. *acrAB* oder *micF* durch eine reduzierte Aktivität von MarA kompensiert wird (Abschnitt 1.5.3.1). Eine solche kompensatorische Mutation würde die Erniedrigung der Resistenz erklären und könnte zudem, aufgrund der Beobachtung, dass *marR*-Deletionsmutanten im Vergleich zu ihren Ausgangsstämmen eine reduzierte Fitness (verringerte Wachstumsgeschwindigkeit) aufweisen [75], die Ursache für die Wiederherstellung/Verbesserung der Fitness sein [194].

### 4.5.1 Einfluss der *marA*-Punktmutation auf die Expression von *acrAB*

Zunächst sollte die Hypothese, dass es durch die *marA*-Punktmutation zu einem Funktionsverlust von MarA gekommen sein könnte, der eventuell die Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe beeinflusst, genauer untersucht werden. Die in dieser Arbeit entwickelten Reportergensysteme stellen einfache und schnell durchführbare Nachweisverfahren für eine derartige Fragestellung dar.

Die Ergebnisse der Messungen mit dem Reportergenplasmid pPHB335 zeigen deutlich, dass die Stämme MIII und MIII300 im Vergleich zum Wildtyp WT eine Steigerung der Aktivität von *pacrAB* von etwa 400 % aufgrund ihrer *marR*-Deletion aufweisen. Dabei konnte kein Unterschied zwischen diesen beiden Stämmen gezeigt werden (Abb. 3.26, Tab. 3.18). Im Vergleich zu MIII und MIII300 fällt das Niveau der Aktivität von *pacrAB* in dem Stamm MIII300S16 mit der zusätzlichen *marA*-Punktmutation wieder auf das Niveau des Wildtyps WT zurück, sogar mit einer Tendenz zu niedrigeren Werten (Abb. 3.26, Tab. 3.18). Ein absolut vergleichbares Bild ergibt sich für die Stämme MIVa, MIVa300 und MIVa300S32 (Abb. 3.27, Tab. 3.19). Diese Werte zeigen eine Korrelation mit den Ergebnissen der Untersuchung zur Akkumulation von Ciprofloxacin von Schulte 2001, für die jedoch der Influx (OmpF) noch mit berücksichtigt werden muss (Tab. 4.4) [194].

So könnte die nachgewiesene Verringerung der Expression von *acrAB* auf das Niveau des Ausgangsstammes WT als erster Hinweis für den vermuteten MarA-Funktionsverlust durch

die *marA*-Punktmutation angesehen werden.

### 4.5.2 Einfluss der *marR*-Deletion auf die Resistenz

Mit Hilfe eines Komplementations-Assays wurde parallel zu den Ergebnissen in Abschnitt 4.5.1 gezeigt, dass die *marR*-Deletionen in den Stämmen MIII und MIII300 bzw. MIVa und MIVa300 tatsächlich verantwortlich sind für die im Vergleich zu WT erhöhten MHK-Werte von Tetracyclin und Chloramphenicol.

Hier konnte nach Einbringen des intakten *marR*-Gens aus WT in diese Stämme eine Komplementation gezeigt werden, während dieser Einfluss in den *marA*-Punktmutanten MIII300S16 und MIVa300S32 nicht nachweisbar war (Abschnitt 3.14, Tab. 3.26).

### 4.5.3 Entwicklung der Überexpressionsvektoren pPHB338 und pPHB1838

Aufgrund der Hinweise, die in Abschnitt 4.5.1 gewonnen werden konnten, stellte sich im Umkehrschluss die Frage, ob die *marA*-Punktmutation zu einem MarA-Funktionsverlust führt und damit für die gezeigte erniedrigte Expression von *acrAB* in MIII300S16 bzw. MIVa300S32 im Vergleich zu MIII bzw. MIVa verantwortlich ist.

Darüber sollte eine Komplementation mit dem funktionsfähigen *marA*-Gen aus WT Aufschluss geben. Deshalb mussten zunächst entsprechende Überexpressionsplasmide konstruiert werden (Abschnitt 3.7).

Durch die transkriptionale Fusion des *marA*-Gens aus WT mit dem Arabinose-Promotor (*araC-paraB*) exakt anschließend an das Startcodon (ATG) und damit an der Position des ursprünglichen Gens *araB* kann gewährleistet werden, dass die Expression von *marA* genau der gleichen Regulation unterliegt wie das *araBAD*-Operon. Der Promotor des Arabinose-Operons *araBAD* bietet den Vorteil die Expression des nachfolgenden Gens (hier: *marA*) gezielt durch die Zugabe von L-Arabinose zu induzieren und durch Zugabe von D-Glukose zu reprimieren. Für diese positive und negative Kontrolle des Promotors durch die beiden Zucker ist das Protein AraC verantwortlich, dessen Gen *araC* divergent zu *araBAD* transkribiert wird und entsprechend mit kloniert wurde [110].

Die Klonierung erfolgte ungerichtet über *NheI*-Schnittstellen, wodurch zwei unterschiedliche Orientierungen des Fusionsgens innerhalb des Vektors pBR322 möglich waren. Die Entscheidung mit welcher Orientierung weitergearbeitet werden sollte, geschah willkürlich (pPHB338, Abschnitt 3.8).

Zur Messungen der Aktivität des *pacrAB*-Promotors in pPHB335 bei gleichzeitiger Überexpression von MarA musste das *araC-paraB-marA*-Fusionsgen in das Plasmid pACYC184

umkloniert werden, da zwei Plasmide mit dem gleichen *ori* nicht in der gleichen Zelle ohne Selektionsdruck coexistieren können (Abschnitt 3.9).

Die Umklonierung von pPHB338 zu pPHB1838 erfolgte ungerichtet über glatte (*blunt*) Enden. So waren zwei unterschiedliche Orientierungen des Inserts relativ zum Vektor pACYC184 möglich (Abschnitt 3.10). Für die durchzuführenden Experimente wurde die Orientierung ausgewählt, die der in pPHB338 entsprach. Hierdurch sollte die Vergleichbarkeit der mit den beiden Überexpressionsplasmiden erhaltenen Ergebnisse gewährleistet sein.

### 4.5.4 Auswirkungen der MarA-Komplementation auf die MHK-Werte und die *acrAB*-Expression

Die Stämme WT, MIII, MIII300S16, MIVa und MIVa300S32 wurden mit pPHB338 transformiert und durch MHK-Bestimmung charakterisiert (Abschnitt 3.15). Dabei wurde ein zusätzlicher Versuch beispielhaft für Chloramphenicol in LB-Medium durchgeführt, um einen Einfluss von D-Glukose durch die Stärke-haltige Müller Hinton Bouillon auszuschließen.

Die Überexpression von *marA* führte in den  $\Delta marR$ -Mutanten MIII und MIVa zu keiner Veränderung in den MHK-Werten von Chloramphenicol und Novobiocin (Tab. 3.27, Tab. 3.29, Tab. 3.28). Dies Ergebnis war zu erwarten, da *marA* in diesen Stämmen schon überexprimiert wird. Diese Werte dienen zur Ermittlung des MHK-Wertes, der bei einer vollständigen MarA-Komplementation erreicht werden kann.

Für den Ausgangsstamm WT konnte gezeigt werden, dass es ohne Induktion des Arabinose-Promotors sowie bei Repression durch D-Glukose zu keinem Effekt auf die Empfindlichkeit kommt, jedoch nach Induktion mit L-Arabinose (1 MHK-Stufe reproduzierbar, Tab. 3.27, Tab. 3.29, Tab. 3.28). Auch dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da die Überexpression von *marA* zu einer Resistenzhöhung führt. Dabei ist in WT die Regulation des *mar*-Operons durch ein intaktes MarR-Protein (Repressor) noch vorhanden (Abschnitt 1.5.3.1).

Im Falle der *marA*-Punktmutanten MIII300S16 und MIVa300S32 kam es sowohl ohne Zusatz, als auch in Anwesenheit von L-Arabinose oder D-Glukose zu einer deutliche Erhöhung der Resistenz um 2-3 MHK-Stufen, jedoch nicht bis auf das Niveau der *marR*-Deletionsmutanten MIII und MIVa (Tab. 3.27, Tab. 3.29, Tab. 3.28). Wie schon bei der MarR-Komplementation, liegen die MHK-Werte von MIII300S16 und MIVa300S32 knapp unterhalb derer des Ausgangsstammes WT. Dies lässt auf einen vollständigen Funktionsverlust von MarA schließen oder auf die Beteiligung weiterer unbekannter Mutationen. Die Erhöhung der MHK-Werte in Abwesenheit von L-Arabinose und in Anwesenheit von D-Glukose liegt möglicherweise daran, dass der Arabinose-Promotor auch ohne Induktion einen Basallevel an Genprodukt erzeugt und die Zugabe von D-Glukose nicht zur vollständigen Repression, sondern zu einer stufenweisen Absenkung führt. Ob dadurch der gleiche Effekt wie für die Arabinose-Induktion ausgelöst werden kann, bleibt fraglich [67, 91, 202].

Im Umkehrschluss war daraufhin zu überprüfen, ob die beobachteten MHK-Wertveränderungen,

verursacht durch die Überexpression von MarA, auf eine Erhöhung der Expression von *acrAB* zurückzuführen sind. Dabei sollten auch die verschiedenen Inkubationsbedingungen (An- bzw. Abwesenheit der beiden Zucker) genauer untersucht werden.

Deshalb wurden Messungen der Aktivität des Promotors von *acrAB* in Anwesenheit des Überexpressionsvektors pPHB1838 in den Stämmen WT, MIII300S32, MIVa300S32 und MIII in An- bzw. Abwesenheit von L-Arabinose oder D-Glukose durchgeführt (Abschnitt 3.12.8).

Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass es in Anwesenheit von L-Arabinose zu einer Erhöhung der Aktivität von *pacrAB* in WT, MIII300S16 und MIVa300S32 auf ca. 185-200 % kommt (Abb. 3.28, Tab. 3.20). Dabei scheinen diese drei Stämme ein vergleichbares Ausmaß der Expression von *acrAB* zu erreichen, was die gleichen MHK-Werte erklären würde. Es kommt jedoch insgesamt nicht zu einer Erhöhung (ca. 420 %) auf das Niveau der *marR*-Deletionsmutante MIII (Abb. 3.28, Tab. 3.21).

Das bestätigt die durch die Ergebnisse der MHK-Bestimmung entstandene Vermutung, dass es nicht zu einer vollständigen Komplementation von MarA gekommen ist. Gründe dafür könnten zum Einen eine Konkurrenzsituation zwischen dem defekten und dem intakten MarA-Protein während des sogenannten *prerecruitments* sein (Abschnitt 1.5.3.1). Hierbei könnten theoretisch beide Proteine an die RNA-Polymerase binden. Während jedoch der binäre Komplex mit dem intakten MarA an die DNA binden kann, ist vielleicht der binäre Komplex mit dem veränderten MarA dazu nicht mehr fähig. Zum Anderen könnte eine vollständige Komplementation durch weitere unbekannte Mutationen verhindert sein.

Die Untersuchung der D-Glukose-Zugabe ergab bei MIVa300S32 keinen signifikanten Unterschied in der Aktivität von *pacrAB*, bei WT und MIII300S16 kam es zu einer sehr geringen Erniedrigung von ca. 10 % (Abb. 3.29, Tab. 3.22). Im Gegensatz zu den Ergebnissen der MHK-Bestimmungen konnte hier die Repression des Arabinose-Promotors durch D-Glukose gezeigt werden.

### 4.5.5 3D-Strukturmodelle von MarA aus den *marA*-Punktmutanten

Für die Betrachtung der 3D-Strukturmodelle von MarA müssen zunächst bekannte Daten bezüglich der Struktur und der Zuordnung von Aminosäure-Bereichen zu bestimmten Funktionen dieses globalen Aktivators beschrieben werden. Hierzu dienen auch die Abbildungen 4.2 und 4.3, welche die Erläuterungen im Text verständlicher machen sollen.

MarA besteht aus 7  $\alpha$ -Helices mit einem langen C-terminalen *loop* und kann in zwei strukturell ähnliche Domänen aufgeteilt werden. Die N-Domäne umfasst den Bereich 8-59 und die C-Domäne 60-108. Dadurch, dass jede Domäne ein HTH-DNA-Bindemotiv besitzt, kann MarA als Monomer agieren. Die beiden *recognition helices*  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$ , werden durch die Aminosäuren 29-50 und 77-100 gebildet, und sind über die Helix  $\alpha 4$  miteinander verbunden. Im Gegensatz zu vielen anderen Regulatoren (z.B. auch MarR) binden die beiden HTH-Motive die DNA von der gleichen Seite aus.

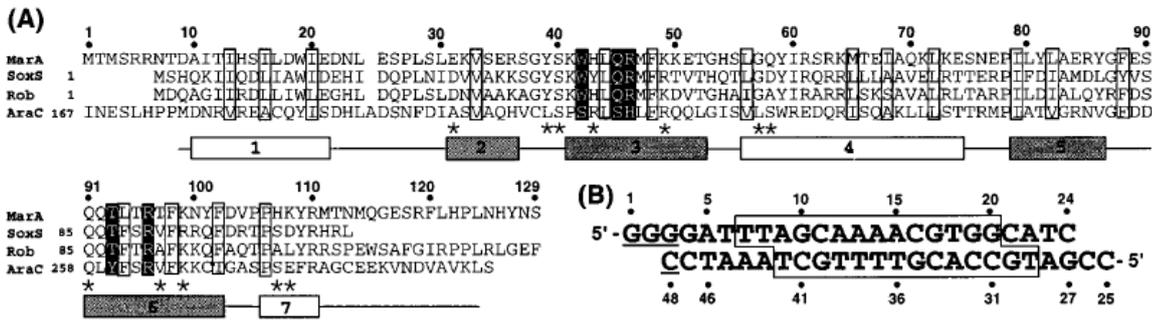


Abbildung 4.2: (A) Alignment der MarA-Sequenz mit SoxS, Rob und AraC. Für alle im Text angegebenen Positionen ist zu beachten, dass Met2 als Startposition 1 gezählt wurde. Die Sekundärstruktur-Elemente sind als nummerierte Balcken unter die entsprechenden Bereiche gelegt, wobei die HTH-Bindemotive schwarz gekennzeichnet sind. Weiße Boxen kennzeichnen Aminosäuren des hydrophoben Kerns, schwarze Boxen die Aminosäuren, die für die Sequenzspezifität verantwortlich sind. "Sterne" markieren Aminosäuren, die mit den Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats wechselwirken. (B) Doppelsträngige DNA, die für die Kristallisation verwendet wurde. [181]

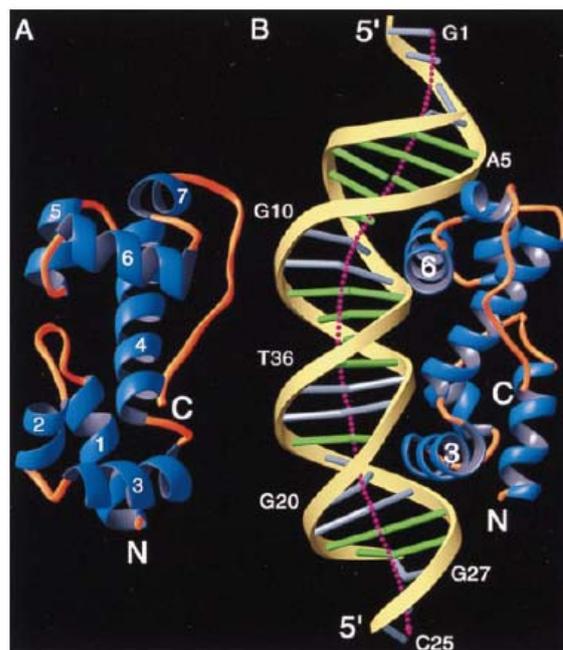


Abbildung 4.3: Die Struktur von MarA (A) im Komplex mit der DNA (B). Die Nummerierung der einzelnen Helices wird im Text für Erläuterungen verwendet. [181]

Über den *loop* zwischen den Helices  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  (Aminosäure Glu23 und Ser24) und über die Helix  $\alpha 5$  (Aminosäure Arg83 und Tyr84) treten die beiden Domänen mittels Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kräfte in Kontakt. Für den Kontakt der beiden HTH-Bindemotive mit der DNA ist ein passender Winkel der Motive zueinander erforderlich. Spezifische Interaktionen mit der DNA über direkte oder über Wassermoleküle vermittelte Wasserstoffbrückenbindungen der beiden Helices  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  bestehen über die Aminosäuren Arg40, Gln43 und Arg44 sowie Glu89, Thr93 und Arg94. Es treten aber nicht nur die *recognition helices* in Kontakt mit der DNA, über die Aminosäuren Gly55 und Gln56 in Helix  $\alpha 4$  und His105 und Lys106 in Helix  $\alpha 7$  bestehen Wechselwirkungen zu den Phosphatgruppen des DNA *backbones* [181].

Für den Stamm MIII300S16 wurde die *marA*-Punktmutation I58N von Schulte 2001 identifiziert [194]. Diese Mutation liegt in der Helix  $\alpha 4$  in direkter Nähe der für Wechselwirkungen mit der DNA bekannten Positionen Gly55 und Gln56 (Abb. 3.48). Daher könnte einerseits vermutet werden, dass entweder der Abstand über die  $\alpha 4$ -Helix oder der Winkel der beiden HTH-Bindemotive zueinander verändert wird. Andererseits könnten auch die DNA-Bindungen über Position Gly55 und Gln56 beeinflusst werden.

Die Ergebnisse der Energieminimierung zeigen nur geringe Differenzen zwischen dem Ausgangsstamm WT und der Mutante MIII300S16, mit Ausnahme verschiedener *loop*-Bereiche (Abschnitt 3.17, Abb. 3.49 und 3.50). So kann bezüglich der vermuteten sterischen Beeinflussung der HTH-Bindemotive keine Aussage getroffen werden. Ob die beiden Position 55 oder 56 durch den Austausch des großen hydrophoben Restes (Ile58) mit einer basischen Gruppe (Asn58) sowie einer deutlich veränderten relativen Ausrichtung dieser Gruppe eine Rolle spielen, könnte noch weiter mit Hilfe der 3D-Strukturmodelle untersucht werden. Da bisher noch keine Daten zur Bindungsstelle an die RNA-Polymerase existieren, kommt auch eine Beeinflussung dieser Wechselwirkung in Frage.

Für den Stamm MIVa300S32 wurde die *marA*-Punktmutation N21Y von Schulte 2001 identifiziert [194]. Diese Mutation liegt innerhalb des *loop* zwischen den Helices  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ . In unmittelbarer Nähe befinden sich die an der Interaktion der beiden Domänen beteiligten Aminosäuren Glu23 und Ser24 (Abb. 3.51). Daher kann vermutet werden, dass diese Punktmutation die Wechselwirkungen zwischen den beiden Domänen so beeinträchtigt, dass dies zur Veränderung der relativen Ausrichtung der HTH-Bindemotive zueinander führt.

Auch bei dieser Punktmutante sind die Änderungen in der Struktur im Vergleich zum Ausgangsstamm WT relativ gering, mit Ausnahmen einiger *loops* (Abb. 3.52), weshalb die Hypothese nicht direkt untermauert werden kann. Was bei den Ergebnissen der Energieminimierung jedoch sofort auffällt ist, welchen Raum das Tyrosin im Vergleich zum ausgetauschten Arginin einnimmt (Abb. 3.53). Bei möglichen Interaktionen mit benachbarten Aminosäuren spielt womöglich auch die fehlende Basizität eine Rolle. Eventuell müssten alle Aminosäuren innerhalb eines bestimmten "Umkreises" der ausgetauschten Aminosäure relativ zu dieser und im Vergleich zum Ausgangsstamm betrachtet werden. Auch bei Lage dieser Mutation kann eine Beeinflussung der RNA-Polymerase-Bindung nicht ausgeschlossen werden.

Für beide *marA*-Punktmutanten bietet sich zur weiteren *in silico*-Untersuchung der funktionellen Veränderung des Proteins eine Molekül-Dynamik-Simulation (MDS), wie in Abschnitt 4.4.2 beschrieben, an. Da MarA zusammen mit der DNA-Bindestelle als Co-Kristallisat analysiert wurde und jetzt die entsprechenden Energieminimierungen vorliegen, könnten diese Daten direkt für die MDS eingesetzt werden. Dadurch könnte ein potentieller Wegfall der Interaktion zwischen Aktivator und Sequenz bei Bewegung der Moleküle visuell dargestellt werden.

Für solche *in silico*-Untersuchungen kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse den *in vivo*-Zuständen entsprechen. Daher müsste zur Überprüfung einer möglichen DNA-Protein-Interaktion *in vivo* z.B. noch ein sogenannter *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) durchgeführt werden.

### 4.5.6 Bedeutung der *marA*-Punktmutationen für Resistenz und Fitness

Es bestand die Vermutung, dass die *marA*-Punktmutationen (I58N, N21Y) in den Stämmen MIII300S16 und MIVa300S32 zu einer Kompensation der *marR*-Deletion führen [194]. Dies wurde als eine mögliche Erklärung für die Reversion des MAR-Phänotyps sowie die Wiederherstellung der Fitness angesehen.

Die *marA*-Punktmutanten zeigten eine deutliche Erniedrigung der MHK-Werte für Ciprofloxacin im Vergleich zu den *marR*-Deletionsmutanten (MIII, MIII300 bzw. MIVa, MIVa300), jedoch nicht bis auf das Niveau des Ausgangsstammes WT. Die noch vorhandene Resistenz gegenüber diesem Fluorchinolon, bei gleichzeitig möglicher Kompensation der *marR*-Deletion, ist auf die *target*-Mutationen in den Genen für Gyrase und Topoisomerase IV zurückzuführen (Tab. 4.4).

Für die *marR*-Deletionsmutanten konnte durch die MarR-Komplementation bestätigt werden, dass durch die Deletion die im Vergleich zu WT erhöhten MHK-Werte gegenüber verschiedenen Antibiotika zustande kamen. Der gleiche Versuch demonstrierte das Fehlen dieses Einflusses bei den *marA*-Punktmutanten trotz *marR*-Deletion (Abschnitt 4.5.1).

Die Ergebnisse der Messungen mit dem in dieser Arbeit entwickelten Reportersystem pPHB335 zeigten einen Rückgang in der Expression von *acrAB* in den *marA*-Punktmutanten im Vergleich zu den Elternstämmen MIII und MIVa. Diese verminderte Expression von *acrAB* auf das Niveau des Ausgangsstammes WT war der erste Hinweis, dass der globale Aktivator MarA funktionsunfähig ist. Denn bei Vorhandensein einer *marR*-Deletion wäre die Expression von *acrAB* in der Regel stark erhöht (Abschnitt 4.5.1).

Die Überexpression von *marA* aus WT in den *marA*-Punktmutanten führte sowohl zu einer deutlichen Erhöhung in den MHK-Werten als auch in der Expression von *acrAB*. In beiden Fällen konnte jedoch nicht das Niveau der *marR*-Deletionsmutanten erreicht werden (Abschnitt 4.5.4). Die Gründe für die unvollständige Komplementation sind rein spekulativ. Zum Einen wird eine Konkurrenzsituation für das *prerecruitment* der RNA-Polymerase zwischen dem intakten mit dem mutiertem MarA angenommen. Zum Anderen könnten dafür zusätz-

#### 4.6 Untersuchungen der Expression von *acrAB* im Lebendimpfstamm TAD Salmonella vacT

---

liche unbekannte Mutationen eine Rolle spielen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Punktmutationen in *marA* eine Reduktion der Expression von *acrAB* und dadurch die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika bewirken. Dabei bleibt unklar, ob die *marA*-Mutation alleine oder in Kombination mit weiteren Mutationen dafür verantwortlich ist.

Ein Einfluss der *marA*-Mutation auf Struktur und Funktion von MarA könnte in Moleküldynamik-Simulationen, die auf Grundlage der Energie-minimierten 3D-Modelle berechnet werden könnten, neue Erkenntnisse *in silico* liefern.

*Electrophoretic mobility shift assays* müssten durchgeführt werden, um eine mögliche Beeinträchtigung der DNA-Protein-Interaktion *in vivo* zu überprüfen.

Zur Kompensation des Fitnessverlustes durch die *marA*-Mutation wurden keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Hier wäre es z.B. interessant die gefundenen Punktmutationen in *marA* durch *in vitro*-Mutagenese in MIII bzw. MIVa einzuführen und entsprechende Experimente wie Generationszeitbestimmung durchzuführen. Auch eine neuerliche Untersuchung der Expression von *acrAB* mit den entwickelten Reportersystemen und ein Komplementations-Assay mit den konstruierten Überexpressionsvektoren für MarA in solchen rekombinanten Stämmen könnte dann möglicherweise Aufschluss über einen Einfluss zusätzlicher Mutationen geben.

#### 4.6 Untersuchungen der Expression von *acrAB* im Lebendimpfstamm TAD Salmonella vacT

TAD Salmonella vacT (vacT) ist ein attenuierter Lebendimpfstamm zur Prävention von Salmonellosen bei Hühnern, der durch Selektion auf Nalidixinsäure und Rifampicin nach Behandlung mit N-Methyl-N'-Nitrosoguanidin aus dem Ausgangsstamm M415 entwickelt wurde. Durch vier verschiedene genetische Marker, die sich phänotypisch durch Resistenz bzw. Sensibilität gegenüber bestimmten Antibiotika ausprägen, kann vacT charakterisiert werden.

Im Rahmen der Dissertation von Preisler 2006 wurde der Ausgangsstamm M415 und der Impfstamm vacT unter anderem hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen untersucht [172]. Die während der Entwicklung erzeugten Zwischenderivate (die Stämme: Nal2ori, Nal2passage) weisen im Gegensatz zu M415 eine Fluorchinolonresistenz, verursacht durch eine von drei *target*-Mutationen (*gyrA*<sup>D87G, G75A, A866S</sup>), auf. In vacT konnten neben der bei Fluorchinolon-resistenten Mutanten häufig gefundenen Mutation D87G zusätzlich die Mutationen G75A, W59R und A866S in *gyrA* detektiert werden (Abschnitt 1.4). Dabei ist in vacT der Fluorchinolonresistenz-Phänotyp, normalerweise hervorgerufen durch die *gyrA*-Mutation D87G, unterdrückt, die Reversion dieser Resistenz als Folge der weiteren Gyrase-Mutationen jedoch ausgeschlossen. Somit scheint eine extragenische Kompensation dieser Mutation vorzuliegen. Untersuchungen mit Effluxpumpeninhibitor deuten auf eine

Efflux-Reduktion hin. Dies könnte neben der Überempfindlichkeit des Impfstammes gegenüber Fluorchinolonen auch die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Makroliden, Ketoliden bzw. Linezolid erklären.

Nach Selektion von *vacT* auf Enrofloxacin wurde eine gegen Fluorchinolone resistente Mutante Enro1 isoliert [70]. Für diese Mutante wurde vermutet, dass durch eine weitere Mutation die mögliche Efflux-Reduktion ausgeglichen wurde.

Um zu untersuchen, ob die AcrAB/TolC-Effluxpumpe in Zusammenhang mit der Efflux-Veränderung steht, wurde die Aktivität von *pacrAB* bestimmt. Da in Vorversuchen gezeigt wurde, dass das Reportersystem pPHB331 in Salmonellen funktionsfähig ist, konnte es für diese Fragestellung verwendet werden (Abschnitt 4.1.3).

In den Ergebnissen konnte für den Impfstamm *vacT* eine geringe Erhöhung in der Aktivität von *pacrAB* (ca. 130 %), im Vergleich zu seinem Ausgangsstamm M415 gezeigt werden (Abb. 3.30, Tab. 3.23). Bei Enro1 war hingegen eine Abnahme in der Aktivität von *pacrAB* (auf ca. 67 %) zu M415 zu beobachten (Abb. 3.30, Tab. 3.23).

Zunächst konnten direkt aus diesen Ergebnissen keine Schlüsse gezogen werden, jedoch bei Vergleich mit den für die *acrAB*-Deletionsmutante ermittelten Werten (Abschnitt 4.3).

So scheint im Falle einer *acrAB*-Deletion die Zelle auf den Verlust im ersten Schritt durch eine leichte Erhöhung der Expression von *acrAB* zu reagieren. Die Werte von Enro1 spiegeln nun das Verhalten der Zelle nach einer möglichen Anpassung wider. Hierdurch könnte man für den nächsten Selektionsschritt durch die leichte Abnahme im Vergleich zum Ausgangsstamm M415 annehmen, dass es zu einer Kompensation der möglichen AcrAB-Reduktion gekommen ist. Diese Art der Anpassung zugunsten eines anderen Mechanismus, wie z.B. der Expression von *acrEF*, würde den Vermutungen aus Abschnitt 4.3 entsprechen.

Mittlerweile konnte von Preisler (2007) mittels Sequenzierung eine Deletion in *acrB* bestätigt werden (persönliche Mitteilung). Im nächsten Schritt würde sich nun eine Untersuchung von Enro1 mit dem Reportersystem pPHB333 anbieten. So könnte ermittelt werden, ob es eventuell durch eine Erhöhung der Expression von *acrEF* zur Kompensation des Verlustes von AcrAB gekommen ist.

### 4.7 Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, mögliche Zusammenhänge der Expression von *acrAB* bzw. *acrEF* bei der Entwicklung der Resistenz gegenüber Fluorchinolonen in *E. coli* zu untersuchen. Hierbei konnten viele neue Erkenntnisse und Hinweise zur Bedeutung verschiedener Mutationen und Substanzen auf die Expression von *acrAB* und *acrEF* gewonnen werden. Zahlreiche Fragen sind aber noch ungeklärt und können nun auf Basis der erhaltenen Ergebnisse weiter untersucht werden.

Aufgrund der Ergebnisse aus den Versuchen mit den Gyrase-Mutanten und Gyrase-Inhibitoren

besteht die Vermutung, dass ein möglicher Einfluss auf die Expression von *acrAB* durch eine Veränderung der lokalen Superspiralisierung vorliegt. Daher müssten zur weiteren Unterstützung der bestehenden Daten z.B. RT(*real time*)-PCRs, DNA-Microarrays oder Bestimmungen zur Proteinmenge (*AcrA* oder *AcrB* mittels Western Blot) durchgeführt werden (Abschnitt 4.2).

Der mögliche Einfluss von *marR*-Mutationen in *E. coli* auf die Fitness der Stämme im Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Erhöhung der Expression von *acrAB* könnte durch Bestimmungen der Generationszeit als Parameter für die Fitness weiter untersucht werden (Abschnitt 4.4.1).

Auf Grundlage der in dieser Arbeit berechneten Energieminimierungen für die Erstellung von 3D-Strukturmodellen von MarR und MarA könnten nachfolgende *in silico*-Untersuchungen in Form von Molekül-Dynamik-Simulationen (MSD) durchgeführt werden, um weitere Erkenntnisse zur Veränderung der Funktion der jeweiligen Regulator-Moleküle zu erhalten (Abschnitte 4.4.2 und 4.5.5).

Über eine grundsätzliche Klärung einer möglichen Beeinträchtigung der DNA-Protein-Interaktion durch die untersuchten Einzelmutationen in MarR bzw. MarA könnten *Electrophoretic mobility shift assays* Aufschluss geben.

Untersuchungen der *marA*-Mutationen (I58N, N21Y) hinsichtlich der Kompensation des Fitnessverlustes wären weiterhin von Interesse (Abschnitt 4.5.6). Hierfür könnten diese Mutationen durch *in vitro*-Mutagenese in MIII bzw. MIVa eingeführt werden. Mit den rekombinanten Stämmen wären dann Bestimmungen der Generationszeit, Untersuchungen der Expression von *acrAB* mit den entwickelten Reportersystemen und Komplementations-Assays mit den konstruierten Überexpressionsvektoren für MarA durchzuführen. So könnte ein Zusammenhang zwischen dem *mar*-Operon und der Fitness in *E. coli* möglicherweise weiter aufgeklärt werden.

Für den Zusammenhang zwischen der *AcrAB*/TolC- und *AcrEF*/TolC-Effluxpumpe wären Messungen mit den entwickelten Reportersystemen in dem Stamm MG1655- $\Delta$ *acrAB* nach Ein-Schritt-Selektion ein möglicher weiterführender Versuchsansatz (Abschnitt 4.3). So könnte herausgefunden werden, ob es tatsächlich zu einer Kompensation der *acrAB*-Deletion durch eine erhöhte Expression von *acrEF* kommt.

Falls es mit dem Experiment zu einer Bestätigung von diesem Kompensationsmechanismus kommen sollte, könnte der selektierte Stamm für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Beeinflussung der Expression von *acrEF* durch MarA und Salicylsäure verwendet werden (Abschnitt 4.4.4). Dafür könnten Bestimmungen der Aktivität von *pacrEF* mit pPHB333 in An- und Abwesenheit von pPHB1838 (MarA-Überexpression) bzw. Salicylsäure durchgeführt werden.

Da durch ein Alignment zusätzlich zu einer beschriebenen hypothetischen *marbox* innerhalb der intergenischen Region zwischen *acrS* und *acrE* nun zwei mögliche MarA-Binderegionen

postuliert werden konnten, könnte z.B. ein DNase Footprinting Assays zur Aufklärung, ob und wo MarA bindet, durchgeführt werden (Abschnitt 4.4.4).

Einen besonders wichtigen Beitrag zur Erforschung der Expression von *acrAB* und *acrEF* stellen die in dieser Arbeit entwickelten Reportergensysteme dar. Diese Plasmide bieten ein einfaches, schnelles und sensitives Nachweisverfahren *in vivo*, um einerseits Faktoren, die zu einer Überexpression führen, andererseits Faktoren, die die Expression von *acrAB* bzw. *acrEF* inhibieren, zu identifizieren. Ihr Einsatz konnte erfolgreich getestet werden, so dass sie nun für viele weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen.

So können diese Reportergenplasmide zur Identifizierung und Charakterisierung resistenter Erreger genutzt werden. Die gezielte Suche nach Substanzen mit inhibierenden Eigenschaften könnte möglicherweise zur Identifizierung von "Kandidaten" für eine Kombinationstherapie mit bekannten Antibiotika führen, möglicherweise auch bei bereits bestehender, auf erhöhtem Efflux basierender Resistenz.

## 5 Zusammenfassung

Für die Entwicklung von Fluorchinolonresistenz in *E. coli* spielt die AcrAB/TolC-Effluxpumpe eine bedeutende Rolle. Die Funktionsfähigkeit dieser Pumpe scheint eine Voraussetzung für die Entstehung von resistenten Mutanten mit *target*-Mutationen in den Genen der Gyrase zu sein. Eine Einzelmutation führt dabei nicht zu klinisch relevanter Resistenz (MHK  $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ ). Für die Ausprägung hoher klinisch relevanter Fluorchinolonresistenz ist die Akkumulation von Mutationen in verschiedenen Genen notwendig, wobei in späteren Selektionsschritten auch *non target*-Mutationen eine Rolle spielen. Hier sind oftmals Gene, die im Zusammenhang mit der Regulation der AcrAB/TolC-Effluxpumpe stehen, wie *acrR*, *marO* und *marR* betroffen, was zur Überexpression von *acrAB* führt.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, zunächst Detektionssysteme für den Expressionsstatus der AcrAB/- und AcrEF/TolC-Effluxpumpe zu entwickeln, um den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Expression von *acrAB* bei der Entwicklung der Resistenz gegenüber Fluorchinolonen in *E. coli*, sowie die Rolle der homologen Effluxpumpe AcrEF/TolC zu untersuchen.

Als *in vivo*-Nachweisverfahren wurden daher rekombinante Reporterplasmide konstruiert, mit Hilfe derer es möglich ist schnell, einfach und sensitiv Veränderungen in der Expression von *acrAB* bzw. *acrEF* zu bestimmen. Durch Fusion des Promotors *pacrAB* bzw. *pacrEF* mit dem Reporter *luc* konnten Testsysteme erhalten werden, die nach Transformation von *E. coli* aber auch von Salmonellen die unterschiedliche Aktivität des jeweiligen Promotors durch mehr oder weniger starke Lichtintensität anzeigen.

Für Ciprofloxacin und Ofloxacin in subinhibitorischen Konzentrationen konnte eine geringe Reduktion in der Aktivität von *pacrAB* (um 15-20 %) gezeigt werden. Dies spricht dagegen, dass die für die Entstehung der *target*-Mutationen nötige Funktionsfähigkeit von AcrAB in einer Induktion durch Fluorchinolone begründet ist. Bei *gyrA*-Einzelmutanten zeigte sich hingegen eine Erhöhung in der Aktivität von *pacrAB*, was gut mit bekannten Ergebnissen (reduzierte Ciprofloxacin-Akkumulation) korreliert. Diese Überexpression könnte als Hinweis für einen Zusammenhang zwischen der AcrAB/TolC-Effluxpumpe mit einer Begünstigung von Folgemutationen gewertet werden. Eine besonders deutliche Reduktion der Expression von *acrAB* zeigte sich bei der *gyrB*-Mutante KD112 und subinhibitorischer Konzentration von Novobiocin um 40-50 %. Dabei scheint für alle diese Ergebnisse möglicherweise eine veränderte lokale Superspiralisierung, bedingt durch einen veränderten globalen Superspiralisierungsgrad, von Bedeutung zu sein.

Die Reporterensysteme eignen sich darüberhinaus für die Identifizierung und Charakterisierung von neuartigen Mutanten mit Mutationen im *mar*-Operon (*marO*, *marR*). Die je nach Mutation variierenden Unterschiede in der *acrAB*-Genexpression im Vergleich zum Ausgangs-

stamm führten jedoch zu keinem Unterschied in den MHK-Werten (phänotypisch). Durch Messungen in An- und Abwesenheit von Salicylsäure als Induktor des *mar*-Operons im Ausgangsstamm und einer *E. coli*- $\Delta$ *marR*-Mutante konnte sowohl eine *mar*-abhängige als auch eine *mar*-unabhängige Induktion der Expression von *acrAB* nachgewiesen werden.

Ausgehend von Strukturdaten aus der PDB (RCSB protein data bank) zum MarR-Dimer konnten nach Energieminimierungen mit SYBYL<sup>®</sup> 7.2 3D-Strukturmodelle von MarR aus verschiedenen *marR*-Punktmutanten erstellt werden, die teilweise Erklärungen für den Resistenzphänotyp liefern.

Für zwei Fluorchinolon-resistente *E. coli*-*marR*-Deletionsmutanten, die eine reduzierte Fitness zeigten, wurde die Aktivität von *pacrAB* bestimmt. Ebenso wurden nach selektionsfreier Inkubation aus diesen hervorgegangene Mutanten vermessen. Diese Derivate weisen eine Kompensation des Fitnessdefizits sowie eine verminderte Resistenz und jeweils eine *marA*-Punktmutation (I58N oder N21Y) auf. Weiterhin wurden Komplementations-Tests mit MarR und MarA durchgeführt. Dadurch konnte bestätigt werden, dass die *marR*-Mutation in den Elternstämmen für die Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und anderen Antibiotika verantwortlich ist, aber in den *marR*-*marA*-Doppelmutanten keine Bedeutung hat. Mit den Reporterplasmiden ließ sich zeigen, dass beide *marA*-Mutationen zu einer Verringerung der *acrAB*-Expression auf das Niveau des Wildtyps führen. Dieser Effekt konnte durch Überexpression von *marA* in trans zum Teil komplementiert werden, was auch durch Ergebnisse einer Empfindlichkeitsbestimmung bestätigt werden konnte. Mit beiden Mutanten wurde jedoch nicht das Niveau der Elternstämmen ( $\Delta$ *marR*-Mutanten) erreicht. Möglicherweise führt eine Konkurrenzsituation zwischen mutierten und intakten MarA-Molekülen, bei der Bildung des binären Komplexes mit der RNA-Polymerase, zur unvollständigen Komplementation. Der Einfluss weiterer Mutationen kann dabei jedoch nicht ausgeschlossen werden. Für MarA aus den beiden unterschiedlichen *marA*-Punktmutanten konnten nach Energieminimierungen mit SYBYL<sup>®</sup> 7.2 ausgehend von PDB-Daten zu MarA 3D-Strukturmodelle erstellt werden.

In den Untersuchungen zur regulatorischen Interaktion zwischen AcrAB/TolC und AcrEF/TolC bei der Bestimmung von  $\Delta$ *acrAB*- bzw.  $\Delta$ *acrEF*-Mutanten konnte für die  $\Delta$ *acrAB*-Mutante eine geringe Erhöhung der *acrAB*-Expression (150 %) gezeigt werden. Die Expression von *acrEF* scheint in den beiden Deletionsmutanten keine Rolle zu spielen, da die gemessene Aktivität von *pacrEF* der Hintergrundaktivität der Reporterensysteme entspricht. Scheinbar reagiert die Zelle auf den *in vitro* generierten AcrAB-Verlust, welchen die Zelle erst nach Akquisition weiterer Mutationen kompensieren könnte, durch die Erhöhung der Expression von *acrAB*.

Die Bestimmungen der Aktivität von *pacrEF* in *marR*-Deletionsmutanten (150 % bzw. 290 %), sowie nach Zugabe von Salicylsäure (180 %) zeigte eine Erhöhung, deren Relevanz jedoch aufgrund der niedrigen absoluten Werte, welche eher wieder auf die geringe Bedeutung der AcrEF/TolC-Effluxpumpe hinweisen, fraglich ist.

Die entwickelten Reporterplasmide zur Bestimmung der Aktivität von *pacrAB* bzw. *pacrEF* bieten sich für die Suche nach Inhibitoren der *acrAB*- bzw. *acrEF*-Expression an. Diese könnten für eine Kombinationstherapie mit bekannten Antibiotika, möglicherweise auch bei bereits bestehender, auf erhöhtem Efflux basierender Resistenz, eingesetzt werden.

## 6 Summary

The development of fluoroquinolone resistance in *E. coli* is associated with the overexpression of AcrAB/TolC efflux pump. The functionality of this pump seems to be required for the emergence of mutants with *target* mutations in genes coding for gyrase (e.g. *gyrA*). While single point mutations in *gyrA* do not lead to fluoroquinolone resistance of clinical relevance (i.e. MIC  $\geq$  4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a combination of at least three mutations in different genes does. During the selection, acquisition of *non target* mutations affecting the upregulation of the AcrAB/TolC efflux pump, e.g. *acrR*, *marO* and *marR*, are involved.

In this work reporter gene systems were developed to enable quick, easy and sensitive determination of alterations in the expression of *acrAB* and *acrEF*. This allowed to determine the impact of several factors (permanent, like mutations or transient, like induction phenomena) on the expression of *acrAB* in the development of fluoroquinolone resistance in *E. coli*. Furthermore the role of homologous efflux pump AcrEF/TolC was to be investigated.

These reporter gene plasmids were constructed by fusing the respective promoters *pacrAB* and *pacrEF* to the reporter gene *luc* encoding firefly luciferase. After transformation of different *E. coli* strains as well as *Salmonella* wildtype and mutant cells with the resulting recombinant plasmids the activity of promoters were quantitated by determining the intensity of luciferase induced light emission.

Subinhibitory concentrations of ciprofloxacin and ofloxacin showed a slight reduction of the activity of *pacrAB* (15-20 %). This is contrary to the assumption that the functionality of AcrAB in the emergence of *target* mutations is due to the induction by fluoroquinolones. However, for *gyrA* single mutants an increasing activity of *pacrAB* in correlation with known results (reduced ciprofloxacin accumulation) was shown. This supports the idea that overexpression of *acrAB* has an impact on the emergence of subsequent *target* mutations in genes coding for gyrase and topoisomerase IV. A reduced expression of *acrAB* of about 40-50 % was shown for the *gyrB*-mutant KD112 and in the presence of subinhibitory concentrations of novobiocin. These results point to a role of variations in local supercoiling for the expression of *pacrAB*.

The reporter gene systems were used for identification and characterization of new mutations in the *mar*-operon (*marO*, *marR*). Variations in the expression of *acrAB* genes determined in the different mutants were not associated with differences in MICs (phenotypical). Adding salicylate as an inducer of the *mar*-operon to *E. coli* wildtype WT and *marR*-mutant MII resulted in an increased activity of *pacrAB* in both strains. Due to the finding that salicylate has an effect on the expression of *acrAB* in a strain with a *marR*-deletion, too, these findings point to the existence of *mar*-dependent as well as a *mar*-independent factors for the

induction of the *acrAB* expression.

Using structural data retrieved from the Brookhaven PDB of MarR-dimer as a template, several structural 3D-models of *marR*-point mutants were calculated, revealing additional information to explain the molecular basis for the resistance phenotype.

Furthermore, the activity of *pacrAB* was determined for two fluoroquinolone resistant *marR*-deletion mutants showing a reduced fitness as well as for derivatives obtained from these mutants after incubation in the absence of selective pressure by fluoroquinolones. These latter strains show a compensation of the reduced fitness and enhanced susceptibility. Both have been shown to carry a single *marA*-mutation resulting in an amino acid exchange (I58N or N21Y). To investigate a possible role of *mar*-regulated functions in the fitness of antibiotic resistant cells, *marR* and *marA* genes were provided in trans for complementation assays.

The results of the susceptibility testing confirmed that the *marR*-deletion in the parental strains contributes to the multiple antibiotic resistance (*mar*) phenotype. This effect of the *marR* deletion is lost in the *marR-marA*-double mutants. Using the reporter gene systems it was demonstrated that the *marA*-mutation was associated with a reduced activity of *pacrAB* down to the level of the wildtype. Providing a *marA*-overexpression vector in trans this effect as well as the reduced susceptibility to different antibiotics was partially reversed compared to the parental strains ( $\Delta$ *marR*-mutants). A possible reason for the incomplete complementation could be that a mutated and an intact MarA monomere compete for the formation of binary complex with RNA-polymerase. Another although rather hypothetical explanation might be the presence of an additional unknown mutation. 3D-models of MarA bound to the marbox for the two *marA*-point mutants were calculated based on structural data from the PDB of the MarA-monomer.

For investigation of regulatory interaction between AcrAB/TolC and AcrEF/TolC deletion mutants of *E. coli* were used lacking either *acrAB* or *acrEF*. These mutants were transformed with either reporter gene plasmids. Only for the *acrAB*-deletion mutant a slight increase in *pacrAB*-activity was detectable (150 %). The expression of *acrEF* is equivalent to the background activity of the reporter gene systems in both strains and, hence, seems to play a minor role for the mdr efflux of the cells. It seems that in response to the *in vitro*-generated *acrAB*-deletion an increase of *acrAB* expression is a compensatory reaction, implying that the cells are able to sense the content of functional AcrAB. Maybe in a subsequent selection step the mutant acquires compensatory mutations.

An increase in the activity of *pacrEF* was shown in two *marR*-deletion mutants (150 % and 290 %, respectively) as well as in the presence of salicylate (180 %). But these results are of unknown relevance, because of very low absolute values for *pacrEF* activity. Due to this very low level of the expression of *acrEF* it seems that mdr efflux due to this pump plays a minor role in these *E. coli*-strains.

The newly developed reporter gene systems provide a powerful tool for the determination of the *pacrAB*- and *pacrEF*-activity in various mutants, e.g. to monitor *in vivo* the expression in infection models. In addition, they offer the possibility to screen for inhibitors of the expression of *acrAB* resulting at least in the - partial - reversion of antibiotic resistance.

## Literaturverzeichnis

- [1] <http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion>
- [2] <http://rebase.neb.com>
- [3] <http://www.chemgapedia.de>
- [4] *QIAquik Spin Handbook*
- [5] ALEKSHUN, M. N. ; KIM, Y. S. ; LEVY, S. B.: Mutational analysis of MarR, the negative regulator of marRAB expression in *Escherichia coli*, suggests the presence of two regions required for DNA binding. In: *Mol Microbiol* 35 (2000), Mar, Nr. 6, S. 1394–1404
- [6] ALEKSHUN, M. N. ; LEVY, S. B.: Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. In: *Antimicrob Agents Chemother* 41 (1997), Oct, Nr. 10, S. 2067–2075
- [7] ALEKSHUN, M. N. ; LEVY, S. B. ; MEALY, T. R. ; SEATON, B. A. ; HEAD, J. F.: The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. In: *Nat Struct Biol* 8 (2001), Aug, Nr. 8, 710–714. <http://dx.doi.org/10.1038/90429>. – DOI 10.1038/90429
- [8] AMÁBILE-CUEVAS, C. F. ; DEMPLE, B.: Molecular characterization of the soxRS genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. In: *Nucleic Acids Res* 19 (1991), Aug, Nr. 16, S. 4479–4484
- [9] ANDERSEN, C. ; HUGHES, C. ; KORONAKIS, V.: Channel vision. Export and efflux through bacterial channel-tunnels. In: *EMBO Rep* 1 (2000), Oct, Nr. 4, 313–318. <http://dx.doi.org/10.1093/embo-reports/kvd075>. – DOI 10.1093/embo-reports/kvd075
- [10] ANDERSEN, Christian ; KORONAKIS, Eva ; HUGHES, Colin ; KORONAKIS, Vassilis: An aspartate ring at the TolC tunnel entrance determines ion selectivity and presents a target for blocking by large cations. In: *Mol Microbiol* 44 (2002), Jun, Nr. 5, S. 1131–1139
- [11] ANDERSSON, D. I. ; LEVIN, B. R.: The biological cost of antibiotic resistance. In: *Curr Opin Microbiol* 2 (1999), Oct, Nr. 5, S. 489–493
- [12] AONO, R. ; TSUKAGOSHI, N. ; YAMAMOTO, M.: Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improve-

- ment of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. In: *J Bacteriol* 180 (1998), Feb, Nr. 4, S. 938–944
- [13] ARIZA, R. R. ; LI, Z. ; RINGSTAD, N. ; DEMPPE, B.: Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein. In: *J Bacteriol* 177 (1995), Apr, Nr. 7, S. 1655–1661
- [14] ATLUNG, T. ; INGMER, H.: H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. In: *Mol Microbiol* 24 (1997), Apr, Nr. 1, S. 7–17
- [15] AZAM, T. A. ; IWATA, A. ; NISHIMURA, A. ; UEDA, S. ; ISHIHAMA, A.: Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. In: *J Bacteriol* 181 (1999), Oct, Nr. 20, S. 6361–6370
- [16] BAGEL, S. ; HÜLLEN, V. ; WIEDEMANN, B. ; HEISIG, P.: Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 43 (1999), Apr, Nr. 4, S. 868–875
- [17] BAILEY, Andrew M. ; WEBBER, Mark A. ; PIDDOCK, Laura J V.: Medium plays a role in determining expression of *acrB*, *marA*, and *soxS* in *Escherichia coli*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 50 (2006), Mar, Nr. 3, 1071–1074. <http://dx.doi.org/074.2006>. – DOI 074.2006
- [18] BALBAS, P. ; SOBERON, X. ; BOLIVAR, F. ; RODRIGUEZ, R. L.: The plasmid, pBR322. In: *Biotechnology* 10 (1988), S. 5–41
- [19] BAMBEKE, F. V. ; GLUPCZYNSKI, Y. ; PLÉSIAT, P. ; PECHÈRE, J. C. ; TULKENS, P. M.: Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. In: *J Antimicrob Chemother* 51 (2003), May, Nr. 5, 1055–1065. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg224>. – DOI 10.1093/jac/dkg224
- [20] BARBOSA, T. M. ; LEVY, S. B.: Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. In: *J Bacteriol* 182 (2000), Jun, Nr. 12, S. 3467–3474
- [21] BAST, Eckhard: *Mikrobiologische Methoden - Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2001
- [22] BENNIK, M. H. ; POMPOSIELLO, P. J. ; THORNE, D. F. ; DEMPPE, B.: Defining a *rob* regulon in *Escherichia coli* by using transposon mutagenesis. In: *J Bacteriol* 182 (2000), Jul, Nr. 13, S. 3794–3801
- [23] BERMAN, H. M. ; WESTBROOK, J. ; FENG, Z. ; GILLILAND, G. ; BHAT, T. N. ; WEISSIG, H. ; SHINDYALOV, I. N. ; BOURNE, P. E.: The Protein Data Bank. In: *Nucleic Acids Res* 28 (2000), Jan, Nr. 1, S. 235–242
- [24] BERTRAND-BURGGRAF, E. ; OERTEL, P. ; SCHNARR, M. ; DAUNE, M. ; GRANGER-SCHNARR, M.: Effect of induction of SOS response on expression of

- pBR322 genes and on plasmid copy number. In: *Plasmid* 22 (1989), Sep, Nr. 2, S. 163–168
- [25] BINA, Xiaowen ; PERRETEN, Vincent ; LEVY, Stuart B.: The periplasmic protein MppA requires an additional mutated locus to repress marA expression in Escherichia coli. In: *J Bacteriol* 185 (2003), Feb, Nr. 4, S. 1465–1469
- [26] BLOCH, Vanessa ; YANG, Yinshan ; MARGEAT, Emmanuel ; CHAVANIEU, Alain ; AUGÉ, Marie T. ; ROBERT, Bruno ; AROLD, Stefan ; RIMSKY, Sylvie ; KOCHOYAN, Michel: The H-NS dimerization domain defines a new fold contributing to DNA recognition. In: *Nat Struct Biol* 10 (2003), Mar, Nr. 3, 212–218. <http://dx.doi.org/10.1038/nsb904>. – DOI 10.1038/nsb904
- [27] BOHNERT, Jürgen A. ; KERN, Winfried V.: Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in Escherichia coli overexpressing RND efflux pumps. In: *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2005), Feb, Nr. 2, 849–852. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.2.849-852.2005>. – DOI 10.1128/AAC.49.2.849-852.2005
- [28] BOLIVAR, F. ; RODRIGUEZ, R. L. ; GREENE, P. J. ; BETLACH, M. C. ; HEYNEKER, H. L. ; BOYER, H. W.: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. In: *Gene* 2 (1977), Nr. 2, S. 95–113
- [29] BURKARDT, H. J. ; RIESS, G. ; PÜHLER, A.: Relationship of group P1 plasmids revealed by heteroduplex experiments: RP1, RP4, R68 and RK2 are identical. In: *J Gen Microbiol* 114 (1979), Oct, Nr. 2, S. 341–348
- [30] CHANDER, Monica ; DEMPSEY, Bruce: Functional analysis of SoxR residues affecting transduction of oxidative stress signals into gene expression. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Oct, Nr. 40, 41603–41610. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M405512200>. – DOI 10.1074/jbc.M405512200
- [31] CHENNA, Ramu ; SUGAWARA, Hideaki ; KOIKE, Tadashi ; LOPEZ, Rodrigo ; GIBSON, Toby J. ; HIGGINS, Desmond G. ; THOMPSON, Julie D.: Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. In: *Nucleic Acids Res* 31 (2003), Jul, Nr. 13, S. 3497–3500
- [32] CHOLLET, Renaud ; CHEVALIER, Jacqueline ; BRYSKIER, André ; PAGÈS, Jean-Marie: The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in Enterobacter aerogenes and Escherichia coli. In: *Antimicrob Agents Chemother* 48 (2004), Sep, Nr. 9, 3621–3624. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.9.3621-3624.2004>. – DOI 10.1128/AAC.48.9.3621-3624.2004
- [33] COHEN, S. N. ; CHANG, A. C. ; HSU, L.: Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 69 (1972), Aug, Nr. 8, S. 2110–2114
- [34] COHEN, S. P. ; LEVY, S. B. ; FOULDS, J. ; ROSNER, J. L.: Salicylate induction of antibiotic resistance in Escherichia coli: activation of the mar operon and a mar-independent pathway. In: *J Bacteriol* 175 (1993), Dec, Nr. 24, S. 7856–7862

- [35] COHEN, S. P. ; YAN, W. ; LEVY, S. B.: A multidrug resistance regulatory chromosomal locus is widespread among enteric bacteria. In: *J Infect Dis* 168 (1993), Aug, Nr. 2, S. 484–488
- [36] CONTI, E. ; FRANKS, N. P. ; BRICK, P.: Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. In: *Structure* 4 (1996), Mar, Nr. 3, S. 287–298
- [37] CONTRERAS, A. ; MAXWELL, A.: *gyrB* mutations which confer coumarin resistance also affect DNA supercoiling and ATP hydrolysis by *Escherichia coli* DNA gyrase. In: *Mol Microbiol* 6 (1992), Jun, Nr. 12, S. 1617–1624
- [38] CUNDLIFFE, E.: Self-protection mechanisms in antibiotic producers. In: *Ciba Found Symp* 171 (1992), S. 199–208; discussion 208–14
- [39] DANGI, B. ; PELUPESSEY, P. ; MARTIN, R. G. ; ROSNER, J. L. ; LOUIS, J. M. ; GRONENBORN, A. M.: Structure and dynamics of MarA-DNA complexes: an NMR investigation. In: *J Mol Biol* 314 (2001), Nov, Nr. 1, 113–127. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2001.5106>. – DOI 10.1006/jmbi.2001.5106
- [40] DATSENKO, K. A. ; WANNER, B. L.: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Jun, Nr. 12, 6640–6645. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.120163297>. – DOI 10.1073/pnas.120163297
- [41] DING, H. ; HIDALGO, E. ; DEMPPE, B.: The redox state of the [2Fe-2S] clusters in SoxR protein regulates its activity as a transcription factor. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Dec, Nr. 52, S. 33173–33175
- [42] DINGERMANN, Theodor: *Gentechnik Biotechnik*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1999
- [43] DOMKA, Joanna ; LEE, Jintae ; WOOD, Thomas K.: YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. In: *Appl Environ Microbiol* 72 (2006), Apr, Nr. 4, 2449–2459. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.72.4.2449-2459.2006>. – DOI 10.1128/AEM.72.4.2449–2459.2006
- [44] DORMAN, C. J. ; LYNCH, A. S. ; BHRIAN, N. N. ; HIGGINS, C. F.: DNA supercoiling in *Escherichia coli*: *topA* mutations can be suppressed by DNA amplifications involving the *tolC* locus. In: *Mol Microbiol* 3 (1989), Apr, Nr. 4, S. 531–540
- [45] EGAN, S. M. ; PEASE, A. J. ; LANG, J. ; LI, X. ; RAO, V. ; GILLETTE, W. K. ; RUIZ, R. ; RAMOS, J. L. ; WOLF, R. E.: Transcription activation by a variety of AraC/XylS family activators does not depend on the class II-specific activation determinant in the N-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. In: *J Bacteriol* 182 (2000), Dec, Nr. 24, S. 7075–7077
- [46] ELKINS, Christopher A. ; NIKAIDO, Hiroshi: Substrate specificity of the RND-type

- multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. In: *J Bacteriol* 184 (2002), Dec, Nr. 23, S. 6490–6498
- [47] ELKINS, Christopher A. ; NIKAIDO, Hiroshi: 3D structure of AcrB: the archetypal multidrug efflux transporter of *Escherichia coli* likely captures substrates from periplasm. In: *Drug Resist Updat* 6 (2003), Feb, Nr. 1, S. 9–13
- [48] ELKINS, Christopher A. ; NIKAIDO, Hiroshi: Chimeric analysis of AcrA function reveals the importance of its C-terminal domain in its interaction with the AcrB multidrug efflux pump. In: *J Bacteriol* 185 (2003), Sep, Nr. 18, S. 5349–5356
- [49] FAHRMEIR, Ludwig ; HAMERLE, Alfred ; TUTZ, Gerhard: *Multivariate statistische Verfahren*. de Gruyter Verlag, 1996
- [50] FANG, M. ; WU, H. Y.: A promoter relay mechanism for sequential gene activation. In: *J Bacteriol* 180 (1998), Feb, Nr. 3, S. 626–633
- [51] FRALICK, J. A.: Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 178 (1996), Oct, Nr. 19, S. 5803–5805
- [52] GALLEGOS, M. T. ; SCHLEIF, R. ; BAIROCH, A. ; HOFMANN, K. ; RAMOS, J. L.: Arac/XylS family of transcriptional regulators. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 61 (1997), Dec, Nr. 4, S. 393–410
- [53] GALÁN, J. E. ; CURTISS, R.: Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. In: *Infect Immun* 58 (1990), Jun, Nr. 6, S. 1879–1885
- [54] GAMBINO, L. ; GRACHECK, S. J. ; MILLER, P. F.: Overexpression of the MarA positive regulator is sufficient to confer multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 175 (1993), May, Nr. 10, S. 2888–2894
- [55] GAUDU, P. ; WEISS, B.: SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), Sep, Nr. 19, S. 10094–10098
- [56] GELFAND, M. S.: Recognition of regulatory sites by genomic comparison. In: *Res Microbiol* 150 (1999), Nr. 9-10, S. 755–771
- [57] GEORGE, A. M. ; LEVY, S. B.: Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. In: *J Bacteriol* 155 (1983), Aug, Nr. 2, S. 541–548
- [58] GERKEN, Henri ; MISRA, Rajeev: Genetic evidence for functional interactions between TolC and AcrA proteins of a major antibiotic efflux pump of *Escherichia coli*. In: *Mol Microbiol* 54 (2004), Nov, Nr. 3, 620–631. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04301.x> – DOI 10.1111/j.1365-2958.2004.04301.x
- [59] GIBAS, Cynthia ; JAMBECK, Per: *Einführung in die Praktische Bioinformatik*. O'Reilly Verlag, 2002

- [60] GOETTSCH, W. ; PELT, W. van ; NAGELKERKE, N. ; HENDRIX, M. G. ; BUITING, A. G. ; PETIT, P. L. ; SABBE, L. J. ; GRIETHUYSEN, A. J. ; NEELING, A. J.: Increasing resistance to fluoroquinolones in escherichia coli from urinary tract infections in the netherlands. In: *J Antimicrob Chemother* 46 (2000), Aug, Nr. 2, S. 223–228
- [61] GOMES, A. A. ; ASAD, L. M B O. ; FELZENSZWALB, I. ; LEITÃO, A. C. ; SILVA, A. B. ; GUILLOBEL, H. C R. ; ASAD, N. R.: Does UVB radiation induce SoxS gene expression in Escherichia coli cells? In: *Radiat Environ Biophys* 43 (2004), Sep, Nr. 3, 219–222. <http://dx.doi.org/10.1007/s00411-004-0253-8>. – DOI 10.1007/s00411-004-0253-8
- [62] GRÜGER, Thomas: *Die Rolle von Topoisomerase IV als Zielstruktur für Inhibitoren in E. coli sowie die Transkriptionskontrolle ihrer Strukturgene parC und parE*. 2004 (Dissertation)
- [63] GRIFFITH, Kevin L. ; SHAH, Ishita M. ; WOLF, Richard E.: 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. In: *Mol Microbiol* 51 (2004), Mar, Nr. 6, S. 1801–1816
- [64] GRIFFITH, Kevin L. ; WOLF, Richard E.: Genetic evidence for pre-recruitment as the mechanism of transcription activation by SoxS of Escherichia coli: the dominance of DNA binding mutations of SoxS. In: *J Mol Biol* 344 (2004), Nov, Nr. 1, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.007>. – DOI 10.1016/j.jmb.2004.09.007
- [65] GRKOVIC, Steve ; BROWN, Melissa H. ; SKURRAY, Ronald A.: Regulation of bacterial drug export systems. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 66 (2002), Dec, Nr. 4, S. 671–701, table of contents
- [66] GROSS, Christian H. ; PARSONS, Jonathan D. ; GROSSMAN, Trudy H. ; CHARIFSON, Paul S. ; BELLON, Steven ; JERNEE, James ; DWYER, Maureen ; CHAMBERS, Stephen P. ; MARKLAND, William ; BOTFIELD, Martyn ; RAYBUCK, Scott A.: Active-site residues of Escherichia coli DNA gyrase required in coupling ATP hydrolysis to DNA supercoiling and amino acid substitutions leading to novobiocin resistance. In: *Antimicrob Agents Chemother* 47 (2003), Mar, Nr. 3, S. 1037–1046
- [67] GUZMAN, L. M. ; BELIN, D. ; CARSON, M. J. ; BECKWITH, J.: Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. In: *J Bacteriol* 177 (1995), Jul, Nr. 14, S. 4121–4130
- [68] HALLMANN, A. ; SUMPER, M.: Reporter genes and highly regulated promoters as tools for transformation experiments in *Volvox carteri*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994), Nov, Nr. 24, S. 11562–11566
- [69] HANAHAH, D.: Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. In: *J Mol Biol* 166 (1983), Jun, Nr. 4, S. 557–580
- [70] HANSEN, Heike: *Bedeutung der Topoisomerase IV für die Chinolonresistenz bei Salmonella enterica subspezies enterica*. 2000 (Diplomarbeit)

- [71] HÄCHLER, H. ; COHEN, S. P. ; LEVY, S. B.: marA, a regulated locus which controls expression of chromosomal multiple antibiotic resistance in Escherichia coli. In: *J Bacteriol* 173 (1991), Sep, Nr. 17, S. 5532–5538
- [72] HEINZL, Susanne: Neue Antibiotika. In: *Chemotherapie Journal* 2 (2005), S. 54–57
- [73] HEISIG, P.: Mechanismen bakterieller Resistenz gegen Antibiotika. In: *Arzneimitteltherapie* 12 (1994), S. 203–218
- [74] HEISIG, P.: Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in Escherichia coli. In: *Antimicrob Agents Chemother* 40 (1996), Apr, Nr. 4, S. 879–885
- [75] HEISIG, P. ; TSCHORNY, R.: Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of escherichia coli selected in vitro. In: *Antimicrob Agents Chemother* 38 (1994), Jun, Nr. 6, S. 1284–1291
- [76] HIDALGO, E. ; BOLLINGER, J. M. ; BRADLEY, T. M. ; WALSH, C. T. ; DEMPLE, B.: Binuclear [2Fe-2S] clusters in the Escherichia coli SoxR protein and role of the metal centers in transcription. In: *J Biol Chem* 270 (1995), Sep, Nr. 36, S. 20908–20914
- [77] HIDALGO, E. ; LEAUTAUD, V. ; DEMPLE, B.: The redox-regulated SoxR protein acts from a single DNA site as a repressor and an allosteric activator. In: *EMBO J* 17 (1998), May, Nr. 9, 2629–2636. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.9.2629>. – DOI 10.1093/emboj/17.9.2629
- [78] HIGGINS, Matthew K. ; BOKMA, Evert ; KORONAKIS, Eva ; HUGHES, Colin ; KORONAKIS, Vassilis: Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004), Jul, Nr. 27, 9994–9999. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0400375101>. – DOI 10.1073/pnas.0400375101
- [79] HIGGINS, Matthew K. ; ESWARAN, Jeyanthi ; EDWARDS, Patricia ; SCHERTLER, Gebhard F X. ; HUGHES, Colin ; KORONAKIS, Vassilis: Structure of the ligand-blocked periplasmic entrance of the bacterial multidrug efflux protein TolC. In: *J Mol Biol* 342 (2004), Sep, Nr. 3, 697–702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.07.088>. – DOI 10.1016/j.jmb.2004.07.088
- [80] HIRAGA, S. ; NIKI, H. ; OGURA, T. ; ICHINOSE, C. ; MORI, H. ; EZAKI, B. ; JAFFÉ, A.: Chromosome partitioning in Escherichia coli: novel mutants producing anucleate cells. In: *J Bacteriol* 171 (1989), Mar, Nr. 3, S. 1496–1505
- [81] HIRAKAWA, Hidetada ; NISHINO, Kunihiko ; YAMADA, Junko ; HIRATA, Takahiro ; YAMAGUCHI, Akihito: Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in Escherichia coli. In: *J Antimicrob Chemother* 52 (2003), Oct, Nr. 4, 576–582. <http://dx.doi.org/dkg406>. – DOI /dkg406
- [82] HIRATA, Takahiro ; SAITO, Asami ; NISHINO, Kunihiko ; TAMURA, Norihisa ; YAMAGUCHI, Akihito: Effects of efflux transporter genes on susceptibility of Escherichia

- coli to tigecycline (GAR-936). In: *Antimicrob Agents Chemother* 48 (2004), Jun, Nr. 6, 2179–2184. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.6.2179-2184.2004>. – DOI 10.1128/AAC.48.6.2179–2184.2004
- [83] HÜLLEN, Volker: *Bedeutung des MAR-Phänotyps für die Fluorchinolon-Resistenz von Escherichia coli*. 1998 (Dissertation)
- [84] HÜLLEN, Volker ; HEISIG, Peter ; WIEDEMANN, Bernd: Bedeutung von marR-Mutationen für die Fluorchinolon-Resistenz bei E. coli. In: *Chemotherapie Journal* 7. Jg., H1/1998 (1998), S. S. 33 f.
- [85] HOLZGRABE, Ulrike: Antibiotika-Entwicklung gestern und heute. In: *Chemotherapie Journal* 13 (2004), S. 142–147
- [86] HOMMAIS, F. ; KRIN, E. ; LAURENT-WINTER, C. ; SOUTOURINA, O. ; MALPERTUY, A. ; CAER, J. P. L. ; DANCHIN, A. ; BERTIN, P.: Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. In: *Mol Microbiol* 40 (2001), Apr, Nr. 1, S. 20–36
- [87] IP, Hermia ; STRATTON, Kelly ; ZGURSKAYA, Helen ; LIU, Jun: pH-induced conformational changes of AcrA, the membrane fusion protein of Escherichia coli multidrug efflux system. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Dec, Nr. 50, 50474–50482. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M305152200>. – DOI 10.1074/jbc.M305152200
- [88] JAIR, K. W. ; FAWCETT, W. P. ; FUJITA, N. ; ISHIHAMA, A. ; WOLF, R. E.: 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. In: *Mol Microbiol* 19 (1996), Jan, Nr. 2, S. 307–317
- [89] JAIR, K. W. ; MARTIN, R. G. ; ROSNER, J. L. ; FUJITA, N. ; ISHIHAMA, A. ; WOLF, R. E.: Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of Escherichia coli multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. In: *J Bacteriol* 177 (1995), Dec, Nr. 24, S. 7100–7104
- [90] JELLEN-RITTER, A. S. ; KERN, W. V.: Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in Escherichia coli mutants Selected with a fluoroquinolone. In: *Antimicrob Agents Chemother* 45 (2001), May, Nr. 5, 1467–1472. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.5.1467-1472.2001>. – DOI 10.1128/AAC.45.5.1467–1472.2001
- [91] JOHNSON, C. M. ; SCHLEIF, R. F.: In vivo induction kinetics of the arabinose promoters in Escherichia coli. In: *J Bacteriol* 177 (1995), Jun, Nr. 12, S. 3438–3442
- [92] KANAMARU, K. ; KANAMARU, K. ; TATSUNO, I. ; TOBE, T. ; SASAKAWA, C.: SdiA, an Escherichia coli homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. In: *Mol Microbiol* 38 (2000), Nov, Nr. 4, S. 805–816

- [93] KAWABE, T. ; FUJIHIRA, E. ; YAMAGUCHI, A.: Molecular construction of a multidrug exporter system, AcrAB: molecular interaction between AcrA and AcrB, and cleavage of the N-terminal signal sequence of AcrA. In: *J Biochem (Tokyo)* 128 (2000), Aug, Nr. 2, S. 195–200
- [94] KAWAMURA-SATO, K. ; SHIBAYAMA, K. ; HORII, T. ; IIMUMA, Y. ; ARAKAWA, Y. ; OHTA, M.: Role of multiple efflux pumps in Escherichia coli in indole expulsion. In: *FEMS Microbiol Lett* 179 (1999), Oct, Nr. 2, S. 345–352
- [95] KERN, W. V. ; OETHINGER, M. ; JELLEN-RITTER, A. S. ; LEVY, S. B.: Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in Escherichia coli. In: *Antimicrob Agents Chemother* 44 (2000), Apr, Nr. 4, S. 814–820
- [96] KLEIN, J. R. ; HENRICH, B. ; PLAPP, R.: Molecular analysis and nucleotide sequence of the envCD operon of Escherichia coli. In: *Mol Gen Genet* 230 (1991), Nov, Nr. 1-2, S. 230–240
- [97] KLEIN, J. R. ; PLAPP, R.: Locations of the envCD genes on the physical map of the Escherichia coli chromosome. In: *J Bacteriol* 174 (1992), Jun, Nr. 11, S. 3828–3829
- [98] KOBAYASHI, K. ; TSUKAGOSHI, N. ; AONO, R.: Suppression of hypersensitivity of Escherichia coli acrB mutant to organic solvents by integrational activation of the acrEF operon with the IS1 or IS2 element. In: *J Bacteriol* 183 (2001), Apr, Nr. 8, 2646–2653. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.8.2646-2653.2001>. – DOI 10.1128/JB.183.8.2646–2653.2001
- [99] KOO, Mi-Sun ; LEE, Joon-Hee ; RAH, So-Yeon ; YEO, Won-Sik ; LEE, Jin-Won ; LEE, Kang-Lok ; KOH, Young-Sang ; KANG, Sa-Ouk ; ROE, Jung-Hye: A reducing system of the superoxide sensor SoxR in Escherichia coli. In: *EMBO J* 22 (2003), Jun, Nr. 11, 2614–2622. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg252>. – DOI 10.1093/emboj/cdg252
- [100] KOPYTEK, S. J. ; DYER, J. C. ; KNAPP, G. S. ; HU, J. C.: Resistance to methotrexate due to AcrAB-dependent export from Escherichia coli. In: *Antimicrob Agents Chemother* 44 (2000), Nov, Nr. 11, S. 3210–3212
- [101] KORONAKIS, V. ; SHARFF, A. ; KORONAKIS, E. ; LUISI, B. ; HUGHES, C.: Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. In: *Nature* 405 (2000), Jun, Nr. 6789, 914–919. <http://dx.doi.org/10.1038/35016007>. – DOI 10.1038/35016007
- [102] KORONAKIS, Vassilis: TolC—the bacterial exit duct for proteins and drugs. In: *FEBS Lett* 555 (2003), Nov, Nr. 1, S. 66–71
- [103] KOUTSOLIOUTSOU, Anastasia ; PEÑA-LLOPIS, Samuel ; DEMPSEY, Bruce: Constitutive soxR mutations contribute to multiple-antibiotic resistance in clinical Escherichia coli isolates. In: *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2005), Jul, Nr. 7, 2746–2752. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.7.2746-2752.2005>. – DOI 10.1128/AAC.49.7.2746–2752.2005

- [104] KRESKEN, M. ; HAFNER, D. ; SCHMITZ, F.-J. ; WICHELHAUS, T.A.: PEG-Resistenzstudie 2004. In: *Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.* (2004), S. 1–90
- [105] KUMAR, Ayush ; SCHWEIZER, Herbert P.: Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. In: *Adv Drug Deliv Rev* 57 (2005), Jul, Nr. 10, 1486–1513. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004>. – DOI 10.1016/j.addr.2005.04.004
- [106] KWON, H. J. ; BENNIK, M. H. ; DEMPLE, B. ; ELLENBERGER, T.: Crystal structure of the Escherichia coli Rob transcription factor in complex with DNA. In: *Nat Struct Biol* 7 (2000), May, Nr. 5, 424–430. <http://dx.doi.org/10.1038/75213>. – DOI 10.1038/75213
- [107] LAU, Sze Y. ; ZGURSKAYA, Helen I.: Cell division defects in Escherichia coli deficient in the multidrug efflux transporter AcrEF-TolC. In: *J Bacteriol* 187 (2005), Nov, Nr. 22, 7815–7825. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.22.7815-7825.2005>. – DOI 10.1128/JB.187.22.7815–7825.2005
- [108] LEACH, Andrew R.: *Molecular Modelling. Principles and Applications*. Prentice Hall, 2001
- [109] LEDERBERG, J. ; TATUM, E. L.: Sex in bacteria; genetic studies, 1945-1952. In: *Science* 118 (1953), Aug, Nr. 3059, S. 169–175
- [110] LEE, N. ; FRANCKLYN, C. ; HAMILTON, E. P.: Arabinose-induced binding of AraC protein to ara2 activates the araBAD operon promoter. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987), Dec, Nr. 24, S. 8814–8818
- [111] LEHNINGER, A.L. ; NELSON, D.L. ; COX, M.M.: *Prinzipien der Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, 1998
- [112] LESK, Arthur M.: *Bioinformatik - Eine Einführung*. Spektrum Akademischer Verlag, 2003
- [113] LEWIS, J. C. ; FELTUS, A. ; ENSOR, C. M. ; RAMANATHAN, S. ; DAUNERT, S.: Applications of reporter genes. In: *Anal Chem* 70 (1998), Sep, Nr. 17, S. 579A–585A
- [114] LI, Ming ; QIU, Xi ; SU, Chih-Chia ; LONG, Feng ; GU, Ruoyu ; McDERMOTT, Gerry ; YU, Edward W.: Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the regulator AcrR from Escherichia coli. In: *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62 (2006), Nov, Nr. Pt 11, 1150–1152. <http://dx.doi.org/10.1107/S1744309106042576>. – DOI 10.1107/S1744309106042576
- [115] LI, Z. ; DEMPLE, B.: SoxS, an activator of superoxide stress genes in Escherichia coli. Purification and interaction with DNA. In: *J Biol Chem* 269 (1994), Jul, Nr. 28, S. 18371–18377
- [116] LICHENSTEIN, H. S. ; HAMILTON, E. P. ; LEE, N.: Repression and catabolite gene activation in the araBAD operon. In: *J Bacteriol* 169 (1987), Feb, Nr. 2, S. 811–822

- [117] LINDE, H. J. ; NOTKA, F. ; METZ, M. ; KOCHANOWSKI, B. ; HEISIG, P. ; LEHN, N.: In vivo increase in resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of MarR. In: *Antimicrob Agents Chemother* 44 (2000), Jul, Nr. 7, S. 1865–1868
- [118] LINDGREN, Patricia K. ; KARLSSON, Asa ; HUGHES, Diarmaid: Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. In: *Antimicrob Agents Chemother* 47 (2003), Oct, Nr. 10, S. 3222–3232
- [119] LINDGREN, Patricia K. ; MARCUSSON, Linda L. ; SANDVANG, Dorthe ; FRIMODT-MØLLER, Niels ; HUGHES, Diarmaid: Biological cost of single and multiple norfloxacin resistance mutations in *Escherichia coli* implicated in urinary tract infections. In: *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2005), Jun, Nr. 6, 2343–2351. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.6.2343-2351.2005>. – DOI 10.1128/AAC.49.6.2343–2351.2005
- [120] LODISH, H. ; BERK, A. ; ZIPURSKY, S.L. ; MATSUDAIRA, P. ; BALTIMORE, D. ; DARNELL, J.E.: *Molekulare Zellbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2001
- [121] LOMOVSKAYA, O. ; LEE, A. ; HOSHINO, K. ; ISHIDA, H. ; MISTRY, A. ; WARREN, M. S. ; BOYER, E. ; CHAMBERLAND, S. ; LEE, V. J.: Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 43 (1999), Jun, Nr. 6, S. 1340–1346
- [122] LOTTSPEICH, F. ; ZORBAS, H.: *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1998
- [123] LÓPEZ-BREA, M. ; ALARCÓN, T.: Isolation of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from an infected Hickman catheter. In: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9 (1990), May, Nr. 5, S. 345–347
- [124] MA, D. ; ALBERTI, M. ; LYNCH, C. ; NIKAIDO, H. ; HEARST, J. E.: The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. In: *Mol Microbiol* 19 (1996), Jan, Nr. 1, S. 101–112
- [125] MA, D. ; COOK, D. N. ; ALBERTI, M. ; PON, N. G. ; NIKAIDO, H. ; HEARST, J. E.: Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 175 (1993), Oct, Nr. 19, S. 6299–6313
- [126] MA, D. ; COOK, D. N. ; ALBERTI, M. ; PON, N. G. ; NIKAIDO, H. ; HEARST, J. E.: Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. In: *Mol Microbiol* 16 (1995), Apr, Nr. 1, S. 45–55
- [127] MA, D. ; COOK, D. N. ; HEARST, J. E. ; NIKAIDO, H.: Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. In: *Trends Microbiol* 2 (1994), Dec, Nr. 12, S. 489–493
- [128] MALLÉA, Monique ; MAHAMOUD, Abdallah ; CHEVALIER, Jacqueline ; ALIBERT-FRANCO, Sandrine ; BROUANT, Pierre ; BARBE, Jacques ; PAGÈS, Jean-Marie:

- Alkylaminoquinolines inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug-resistant clinical isolates. In: *Biochem J* 376 (2003), Dec, Nr. Pt 3, 801–805. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20030963>. – DOI 10.1042/BJ20030963
- [129] MARTIN, R. G. ; GILLETTE, W. K. ; RHEE, S. ; ROSNER, J. L.: 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. In: *Mol Microbiol* 34 (1999), Nov, Nr. 3, S. 431–441
- [130] MARTIN, R. G. ; GILLETTE, W. K. ; ROSNER, J. L.: Promoter discrimination by the related transcriptional activators MarA and SoxS: differential regulation by differential binding. In: *Mol Microbiol* 35 (2000), Feb, Nr. 3, S. 623–634
- [131] MARTIN, R. G. ; JAIR, K. W. ; WOLF, R. E. ; ROSNER, J. L.: Autoactivation of the marRAB multiple antibiotic resistance operon by the MarA transcriptional activator in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 178 (1996), Apr, Nr. 8, S. 2216–2223
- [132] MARTIN, R. G. ; ROSNER, J. L.: Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to mar operator sequences. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Jun, Nr. 12, S. 5456–5460
- [133] MARTIN, R. G. ; ROSNER, J. L.: Fis, an accessory factor for transcriptional activation of the mar (multiple antibiotic resistance) promoter of *Escherichia coli* in the presence of the activator MarA, SoxS, or Rob. In: *J Bacteriol* 179 (1997), Dec, Nr. 23, S. 7410–7419
- [134] MARTIN, Robert G. ; GILLETTE, William K. ; MARTIN, Nicholas I. ; ROSNER, Judah L.: Complex formation between activator and RNA polymerase as the basis for transcriptional activation by MarA and SoxS in *Escherichia coli*. In: *Mol Microbiol* 43 (2002), Jan, Nr. 2, S. 355–370
- [135] MARTIN, Robert G. ; ROSNER, Judah L.: Genomics of the marA/soxS/rob regulon of *Escherichia coli*: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data. In: *Mol Microbiol* 44 (2002), Jun, Nr. 6, S. 1611–1624
- [136] MARTINO, P. D. ; FURSY, R. ; BRET, L. ; SUNDARARAJU, B. ; PHILLIPS, R. S.: Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. In: *Can J Microbiol* 49 (2003), Jul, Nr. 7, 443–449. <http://dx.doi.org/10.1139/w03-056>. – DOI 10.1139/w03-056
- [137] MAZZARIOL, A. ; TOKUE, Y. ; KANEGAWA, T. M. ; CORNAGLIA, G. ; NIKAIDO, H.: High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. In: *Antimicrob Agents Chemother* 44 (2000), Dec, Nr. 12, S. 3441–3443
- [138] MCCLELLAND, M. ; SANDERSON, K. E. ; SPIETH, J. ; CLIFTON, S. W. ; LATREILLE, P. ; COURTNEY, L. ; PORWOLLIK, S. ; ALI, J. ; DANTE, M. ; DU, F. ; HOU, S. ;

- LAYMAN, D. ; LEONARD, S. ; NGUYEN, C. ; SCOTT, K. ; HOLMES, A. ; GREWAL, N. ; MULVANEY, E. ; RYAN, E. ; SUN, H. ; FLOREA, L. ; MILLER, W. ; STONEKING, T. ; NHAN, M. ; WATERSTON, R. ; WILSON, R. K.: Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. In: *Nature* 413 (2001), Oct, Nr. 6858, 852–856. <http://dx.doi.org/10.1038/35101614>. – DOI 10.1038/35101614
- [139] MICHÁN, Carmen ; MANCHADO, Manuel ; PUEYO, Carmen: SoxRS down-regulation of *rob* transcription. In: *J Bacteriol* 184 (2002), Sep, Nr. 17, S. 4733–4738
- [140] MIKOŁOSKO, Jonathan ; BOBYK, Kostyantyn ; ZGURSKAYA, Helen I. ; GHOSH, Partho: Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. In: *Structure* 14 (2006), Mar, Nr. 3, 577–587. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2005.11.015>. – DOI 10.1016/j.str.2005.11.015
- [141] MIMS, C.A. ; PLAYFAIR, J.H.L. ; ROITT, I.M. ; WAKELIN, D. ; WILLIAMS, R.: *Medizinische Mikrobiologie*. Ullstein Mosby GmbH & Co.KG, 1996
- [142] MISRA, R. ; REEVES, P. R.: Role of *micF* in the *tolC*-mediated regulation of OmpF, a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. In: *J Bacteriol* 169 (1987), Oct, Nr. 10, S. 4722–4730
- [143] MÜLHARDT, Cornel: *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002
- [144] MOKEN, M. C. ; MCMURRY, L. M. ; LEVY, S. B.: Selection of multiple-antibiotic-resistant (*mar*) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the *mar* and *acrAB* loci. In: *Antimicrob Agents Chemother* 41 (1997), Dec, Nr. 12, S. 2770–2772
- [145] MORONA, R. ; REEVES, P.: The *tolC* locus of *Escherichia coli* affects the expression of three major outer membrane proteins. In: *J Bacteriol* 150 (1982), Jun, Nr. 3, S. 1016–1023
- [146] MRAHEIL, Mobarak A.: *Entwicklung eines molekularbiologischen Testsystems zum Nachweis von Inhibitoren bakterieller Topoisomerasen, deren Wirkung und des DNA-Superspiralisierungsgrades in vivo*. 2005 (Dissertation)
- [147] MURAKAMI, Satoshi ; NAKASHIMA, Ryosuke ; YAMASHITA, Eiki ; MATSUMOTO, Takashi ; YAMAGUCHI, Akihito: Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. In: *Nature* 443 (2006), Sep, Nr. 7108, 173–179. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05076>. – DOI 10.1038/nature05076
- [148] MURAKAMI, Satoshi ; NAKASHIMA, Ryosuke ; YAMASHITA, Eiki ; YAMAGUCHI, Akihito: Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. In: *Nature* 419 (2002), Oct, Nr. 6907, 587–593. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01050>. – DOI 10.1038/nature01050
- [149] NABER: Survey on antibiotic usage in the treatment of urinary tract infections. In: *J Antimicrob Chemother* 46 Suppl A (2000), Aug, S. 49–52

- [150] NCCLS: *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. 2001 (M7-A5)
- [151] NEUMANN, E. ; SCHAEFER-RIDDER, M. ; WANG, Y. ; HOFSCHEIDER, P. H.: Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. In: *EMBO J* 1 (1982), Nr. 7, S. 841–845
- [152] NICOLOFF, Hervé ; PERRETEN, Vincent ; MCMURRY, Laura M. ; LEVY, Stuart B.: Role for tandem duplication and lon protease in AcrAB-TolC- dependent multiple antibiotic resistance (Mar) in an Escherichia coli mutant without mutations in marRAB or acrRAB. In: *J Bacteriol* 188 (2006), Jun, Nr. 12, 4413–4423. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01502-05>. – DOI 10.1128/JB.01502-05
- [153] NIKAIDO, H.: Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. In: *J Bacteriol* 178 (1996), Oct, Nr. 20, S. 5853–5859
- [154] NIKAIDO, H. ; ZGURSKAYA, H. I.: AcrAB and related multidrug efflux pumps of Escherichia coli. In: *J Mol Microbiol Biotechnol* 3 (2001), Apr, Nr. 2, S. 215–218
- [155] NISHINO, K. ; YAMAGUCHI, A.: Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in Escherichia coli. In: *J Bacteriol* 183 (2001), Oct, Nr. 20, 5803–5812. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.20.5803-5812.2001>. – DOI 10.1128/JB.183.20.5803–5812.2001
- [156] NISHINO, Kunihiro ; YAMAGUCHI, Akihito: Role of histone-like protein H-NS in multidrug resistance of Escherichia coli. In: *J Bacteriol* 186 (2004), Mar, Nr. 5, S. 1423–1429
- [157] NUNOSHIBA, T. ; HIDALGO, E. ; LI, Z. ; DEMPSEY, B.: Negative autoregulation by the Escherichia coli SoxS protein: a dampening mechanism for the soxRS redox stress response. In: *J Bacteriol* 175 (1993), Nov, Nr. 22, S. 7492–7494
- [158] OETHINGER, M. ; KERN, W. V. ; JELLEN-RITTER, A. S. ; MCMURRY, L. M. ; LEVY, S. B.: Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in Escherichia coli in the absence of the AcrAB efflux pump. In: *Antimicrob Agents Chemother* 44 (2000), Jan, Nr. 1, S. 10–13
- [159] OKUSU, H. ; MA, D. ; NIKAIDO, H.: AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of Escherichia coli multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. In: *J Bacteriol* 178 (1996), Jan, Nr. 1, S. 306–308
- [160] OLLIVER, Anne ; VALLÉ, Michel ; CHASLUS-DANCLA, Elisabeth ; CLOECKAERT, Axel: Overexpression of the multidrug efflux operon acrEF by insertional activation with IS1 or IS10 elements in Salmonella enterica serovar typhimurium DT204 acrB mutants selected with fluoroquinolones. In: *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2005), Jan, Nr. 1, 289–301. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.1.289-301.2005>. – DOI 10.1128/AAC.49.1.289–301.2005

- [161] PAGÈS, Jean-Marie ; MASI, Muriel ; BARBE, Jacques: Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. In: *Trends Mol Med* 11 (2005), Aug, Nr. 8, 382–389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2005.06.006>. – DOI 10.1016/j.molmed.2005.06.006
- [162] PAN, C. Q. ; FENG, J. A. ; FINKEL, S. E. ; LANDGRAF, R. ; SIGMAN, D. ; JOHNSON, R. C.: Structure of the Escherichia coli Fis-DNA complex probed by protein conjugated with 1,10-phenanthroline copper(I) complex. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994), Mar, Nr. 5, S. 1721–1725
- [163] PAN, C. Q. ; FINKEL, S. E. ; CRAMTON, S. E. ; FENG, J. A. ; SIGMAN, D. S. ; JOHNSON, R. C.: Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA-protein contacts. In: *J Mol Biol* 264 (1996), Dec, Nr. 4, 675–695. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0669>. – DOI 10.1006/jmbi.1996.0669
- [164] PARK, Chi H. ; ROBICSEK, Ari ; JACOBY, George A. ; SAHM, Daniel ; HOOPER, David C.: Prevalence of aac(6')Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme in the United States. In: *Antimicrob Agents Chemother* (2006), Sep. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00915-06>. – DOI 10.1128/AAC.00915-06
- [165] PENG, H. ; MARIANS, K. J.: Escherichia coli topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. In: *J Biol Chem* 268 (1993), Nov, Nr. 32, S. 24481–24490
- [166] PENG, H. ; MARIANS, K. J.: The interaction of Escherichia coli topoisomerase IV with DNA. In: *J Biol Chem* 270 (1995), Oct, Nr. 42, S. 25286–25290
- [167] PIDDOCK, Laura J V.: Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. In: *Clin Microbiol Rev* 19 (2006), Apr, Nr. 2, 382–402. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>. – DOI 10.1128/CMR.19.2.382-402.2006
- [168] POMPOSIELLO, P. J. ; BENNIK, M. H. ; DEMPLE, B.: Genome-wide transcriptional profiling of the Escherichia coli responses to superoxide stress and sodium salicylate. In: *J Bacteriol* 183 (2001), Jul, Nr. 13, 3890–3902. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.13.3890-3902.2001>. – DOI 10.1128/JB.183.13.3890-3902.2001
- [169] POOLE, K.: Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. In: *Symp Ser Soc Appl Microbiol* (2002), Nr. 31, S. 55S–64S
- [170] POS, Klaas M. ; SCHIEFNER, André ; SEEGER, Markus A. ; DIEDERICHS, Kay: Crystallographic analysis of AcrB. In: *FEBS Lett* 564 (2004), Apr, Nr. 3, 333–339. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00272-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00272-8). – DOI 10.1016/S0014-5793(04)00272-8
- [171] POTRYKUS, Joanna ; WEGRZYN, Grzegorz: The acrAB locus is involved in modulating intracellular acetyl coenzyme A levels in a strain of Escherichia coli CM2555 expressing the chloramphenicol acetyltransferase (cat) gene. In: *Arch Microbiol* 180 (2003),

- Nov, Nr. 5, 362–366. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-003-0592-x>. – DOI 10.1007/s00203-003-0592-x
- [172] PREISLER, Antje: *Die Rolle von DNA-Gyrase und Efflux für die Antibiotikaempfindlichkeit, die Fitness und den DNA-Superspiralisierungsgrad eines Salmonella-Lebendimpfstammes*. 2006 (Dissertation)
- [173] PUTMAN, M. ; VEEN, H. W. ; KONINGS, W. N.: Molecular properties of bacterial multidrug transporters. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 64 (2000), Dec, Nr. 4, S. 672–693
- [174] RAHMATI, Sonia ; YANG, Shirley ; DAVIDSON, Amy L. ; ZECHIEDRICH, E. L.: Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. In: *Mol Microbiol* 43 (2002), Feb, Nr. 3, S. 677–685
- [175] RAJI, A. ; ZABEL, D. J. ; LAUFER, C. S. ; DEPEW, R. E.: Genetic analysis of mutations that compensate for loss of Escherichia coli DNA topoisomerase I. In: *J Bacteriol* 162 (1985), Jun, Nr. 3, S. 1173–1179
- [176] RAMOS, Juan L. ; MARTÍNEZ-BUENO, Manuel ; MOLINA-HENARES, Antonio J. ; TERÁN, Wilson ; WATANABE, Kazuya ; ZHANG, Xiaodong ; GALLEGOS, María T. ; BRENNAN, Richard ; TOBES, Raquel: The TetR family of transcriptional repressors. In: *Microbiol Mol Biol Rev* 69 (2005), Jun, Nr. 2, 326–356. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005>. – DOI 10.1128/MMBR.69.2.326-356.2005
- [177] RANDALL, L. P. ; WOODWARD, M. J.: Multiple antibiotic resistance (mar) locus in Salmonella enterica serovar typhimurium DT104. In: *Appl Environ Microbiol* 67 (2001), Mar, Nr. 3, 1190–1197. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.3.1190-1197.2001>. – DOI 10.1128/AEM.67.3.1190-1197.2001
- [178] REECE, R. J. ; MAXWELL, A.: DNA gyrase: structure and function. In: *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26 (1991), Nr. 3-4, S. 335–375
- [179] REINHARD, Ernst: *Pharmazeutische Biologie 1*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1995
- [180] REN, Dacheng ; BEDZYK, Laura A. ; YE, Rick W. ; THOMAS, Stuart M. ; WOOD, Thomas K.: Stationary-phase quorum-sensing signals affect autoinducer-2 and gene expression in Escherichia coli. In: *Appl Environ Microbiol* 70 (2004), Apr, Nr. 4, S. 2038–2043
- [181] RHEE, S. ; MARTIN, R. G. ; ROSNER, J. L. ; DAVIES, D. R.: A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Sep, Nr. 18, S. 10413–10418
- [182] RILEY, Monica ; ABE, Takashi ; ARNAUD, Martha B. ; BERLYN, Mary K B. ; BLATTNER, Frederick R. ; CHAUDHURI, Roy R. ; GLASNER, Jeremy D. ; HORIUCHI, Takashi ; KESELER, Ingrid M. ; KOSUGE, Takehide ; MORI, Hirotsada ; PERNA, Nicole T. ; PLUNKETT, Guy ; RUDD, Kenneth E. ; SERRES, Margrethe H. ; THOMAS, Gavin H. ; THOMSON, Nicholas R. ; WISHART, David ; WANNER, Barry L.: Escherichia coli K-12:

- a cooperatively developed annotation snapshot–2005. In: *Nucleic Acids Res* 34 (2006), Nr. 1, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkj405>. – DOI 10.1093/nar/gkj405
- [183] ROBICSEK, Ari ; JACOBY, George A. ; HOOPER, David C.: The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. In: *Lancet Infect Dis* 6 (2006), Oct, Nr. 10, 629–640. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70599-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70599-0). – DOI 10.1016/S1473-3099(06)70599-0
- [184] RODIONOV, D. A. ; GELFAND, M. S. ; MIRONOV, A. A. ; RAKHMANINOVA, A. B.: Comparative approach to analysis of regulation in complete genomes: multidrug resistance systems in gamma-proteobacteria. In: *J Mol Microbiol Biotechnol* 3 (2001), Apr, Nr. 2, S. 319–324
- [185] ROSENBERG, Emiko Y. ; BERTENTHAL, Dan ; NILLES, Matthew L. ; BERTRAND, Kevin P. ; NIKAIDO, Hiroshi: Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. In: *Mol Microbiol* 48 (2003), Jun, Nr. 6, S. 1609–1619
- [186] ROSNER, Judah L. ; DANGI, Bindi ; GRONENBORN, Angela M. ; MARTIN, Robert G.: Posttranscriptional activation of the transcriptional activator Rob by dipyriddy in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 184 (2002), Mar, Nr. 5, S. 1407–1416
- [187] RUIZ, J. ; MARCO, F. ; GOÑI, P. ; GALLARDO, F. ; MENSA, J. ; TRILLA, A. ; ANTA, T. J. ; VILA, J.: High frequency of mutations at codon 83 of the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. In: *J Antimicrob Chemother* 36 (1995), Oct, Nr. 4, S. 737–738
- [188] RUIZ, Joaquim: Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. In: *J Antimicrob Chemother* 51 (2003), May, Nr. 5, 1109–1117. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkg222>. – DOI 10.1093/jac/dkg222
- [189] SAIKI, R. K. ; GELFAND, D. H. ; STOFFEL, S. ; SCHARF, S. J. ; HIGUCHI, R. ; HORN, G. T. ; MULLIS, K. B. ; ERLICH, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science* 239 (1988), Jan, Nr. 4839, S. 487–491
- [190] SAMBROOK, J. ; RUSSELL, D.W.: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual Vol.1-3*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [191] SANGER, F. ; NICKLEN, S. ; COULSON, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977), Dec, Nr. 12, S. 5463–5467
- [192] SCHNAPPINGER, D. ; HILLEN, W.: Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. In: *Arch Microbiol* 165 (1996), Jun, Nr. 6, S. 359–369
- [193] SCHNEIDERS, Thamarai ; LEVY, Stuart B.: MarA-mediated transcriptional repression

- of the rob promoter. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Apr, Nr. 15, 10049–10055. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M512097200>. – DOI 10.1074/jbc.M512097200
- [194] SCHULTE, Ansgar: *Stabilität hoher Fluorchinolonresistenz bei Enterobakterien ohne Selektionsdruck*. 2001 (Dissertation)
- [195] SEEGER, Markus A. ; SCHIEFNER, André ; EICHER, Thomas ; VERREY, François ; DIEDERICHS, Kay ; POS, Klaas M.: Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. In: *Science* 313 (2006), Sep, Nr. 5791, 1295–1298. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1131542>. – DOI 10.1126/science.1131542
- [196] SEMCHYSHYN, H. ; BAGNYUKOVA, T. ; LUSHCHAK, V.: Involvement of soxRS regulon in response of Escherichia coli to oxidative stress induced by hydrogen peroxide. In: *Biochemistry (Mosc)* 70 (2005), Nov, Nr. 11, S. 1238–1244
- [197] SÁENZ, Yolanda ; RUIZ, Joaquim ; ZARAZAGA, Myriam ; TEIXIDÓ, Meritxell ; TORRES, Carmen ; VILA, Jordi: Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg-beta-naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in Escherichia coli isolates of different origin. In: *J Antimicrob Chemother* 53 (2004), Mar, Nr. 3, 544–545. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkh117>. – DOI 10.1093/jac/dkh117
- [198] SEOANE, A. S. ; LEVY, S. B.: Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in Escherichia coli. In: *J Bacteriol* 177 (1995), Jun, Nr. 12, S. 3414–3419
- [199] SHAH, Ishita M. ; WOLF, Richard E.: Novel protein–protein interaction between Escherichia coli SoxS and the DNA binding determinant of the RNA polymerase alpha subunit: SoxS functions as a co-sigma factor and redeploys RNA polymerase from UP-element-containing promoters to SoxS-dependent promoters during oxidative stress. In: *J Mol Biol* 343 (2004), Oct, Nr. 3, 513–532. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.057>. – DOI 10.1016/j.jmb.2004.08.057
- [200] SHAH, Ishita M. ; WOLF, Richard E.: 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. In: *J Mol Biol* 357 (2006), Mar, Nr. 3, 718–731. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.088>. – DOI 10.1016/j.jmb.2005.12.088
- [201] SHIGEKAWA, K. ; DOWER, W. J.: Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. In: *Biotechniques* 6 (1988), Sep, Nr. 8, S. 742–751
- [202] SIEGELE, D. A. ; HU, J. C.: Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Jul, Nr. 15, S. 8168–8172

- [203] SKARSTAD, K. ; THÖNY, B. ; HWANG, D. S. ; KORNBERG, A.: A novel binding protein of the origin of the Escherichia coli chromosome. In: *J Biol Chem* 268 (1993), Mar, Nr. 8, S. 5365–5370
- [204] SÁNCHEZ, Patricia ; LINARES, Juan F. ; RUIZ-DÍEZ, Beatriz ; CAMPANARIO, Ester ; NAVAS, Alfonso ; BAQUERO, Fernando ; MARTÍNEZ, José L.: Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* nalB and nfxB multidrug resistant mutants. In: *J Antimicrob Chemother* 50 (2002), Nov, Nr. 5, S. 657–664
- [205] STECK, T. R. ; FRANCO, R. J. ; WANG, J. Y. ; DRLICA, K.: Topoisomerase mutations affect the relative abundance of many Escherichia coli proteins. In: *Mol Microbiol* 10 (1993), Nov, Nr. 3, S. 473–481
- [206] STEGMEIER, Johannes F. ; POLLEICHTNER, Georg ; BRANDES, Nicolas ; HOTZ, Christian ; ANDERSEN, Christian: Importance of the adaptor (membrane fusion) protein hairpin domain for the functionality of multidrug efflux pumps. In: *Biochemistry* 45 (2006), Aug, Nr. 34, 10303–10312. <http://dx.doi.org/10.1021/bi060320g>. – DOI 10.1021/bi060320g
- [207] SU, Chih-Chia ; LI, Ming ; GU, Ruoyu ; TAKATSUKA, Yumiko ; MCDERMOTT, Gerry ; NIKAIDO, Hiroshi ; YU, Edward W.: Conformation of the AcrB multidrug efflux pump in mutants of the putative proton relay pathway. In: *J Bacteriol* 188 (2006), Oct, Nr. 20, 7290–7296. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00684-06>. – DOI 10.1128/JB.00684-06
- [208] SULAVIK, M. C. ; HOUSEWEART, C. ; CRAMER, C. ; JIWANI, N. ; MURGOLO, N. ; GREENE, J. ; DIDOMENICO, B. ; SHAW, K. J. ; MILLER, G. H. ; HARE, R. ; SHIMER, G.: Antibiotic susceptibility profiles of Escherichia coli strains lacking multidrug efflux pump genes. In: *Antimicrob Agents Chemother* 45 (2001), Apr, Nr. 4, 1126–1136. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.4.1126-1136.2001>. – DOI 10.1128/AAC.45.4.1126–1136.2001
- [209] TAKATSUKA, Yumiko ; NIKAIDO, Hiroshi: Threonine-978 in the transmembrane segment of the multidrug efflux pump AcrB of Escherichia coli is crucial for drug transport as a probable component of the proton relay network. In: *J Bacteriol* 188 (2006), Oct, Nr. 20, 7284–7289. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00683-06>. – DOI 10.1128/JB.00683-06
- [210] TAMURA, Norihisa ; MURAKAMI, Satoshi ; OYAMA, Yoshiaki ; ISHIGURO, Masaji ; YAMAGUCHI, Akihito: Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed disulfide cross-linking. In: *Biochemistry* 44 (2005), Aug, Nr. 33, 11115–11121. <http://dx.doi.org/10.1021/bi050452u>. – DOI 10.1021/bi050452u
- [211] TATUM, E. L. ; LEDERBERG, J.: Gene Recombination in the Bacterium Escherichia coli. In: *J Bacteriol* 53 (1947), Jun, Nr. 6, S. 673–684

- [212] TAVÍO, María M. ; VILA, Jordi ; PERILLI, Mariagrazia ; CASAÑAS, Lucía T. ; MACIÁ, Laura ; AMICOSANTE, Gianfranco ; ANTA, María T J.: Enhanced active efflux, repression of porin synthesis and development of Mar phenotype by diazepam in two enterobacteria strains. In: *J Med Microbiol* 53 (2004), Nov, Nr. Pt 11, S. 1119–1122
- [213] THANASSI, D. G. ; CHENG, L. W. ; NIKAIIDO, H.: Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 179 (1997), Apr, Nr. 8, S. 2512–2518
- [214] THOMPSON, J. D. ; PLEWNIAK, F. ; THIERRY, J. ; POCH, O.: DbClustal: rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches. In: *Nucleic Acids Res* 28 (2000), Aug, Nr. 15, S. 2919–2926
- [215] TIKHONOVA, Elena B. ; WANG, Quiju ; ZGURSKAYA, Helen I.: Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria. In: *J Bacteriol* 184 (2002), Dec, Nr. 23, S. 6499–6507
- [216] TOUZÉ, Thierry ; ESWARAN, Jeyanthi ; BOKMA, Evert ; KORONAKIS, Eva ; HUGHES, Colin ; KORONAKIS, Vassilis: Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. In: *Mol Microbiol* 53 (2004), Jul, Nr. 2, 697–706. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04158.x> – DOI 10.1111/j.1365-2958.2004.04158.x
- [217] TRAN, John H. ; JACOBY, George A.: Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Apr, Nr. 8, 5638–5642. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.082092899> – DOI 10.1073/pnas.082092899
- [218] TRAN, John H. ; JACOBY, George A. ; HOOPER, David C.: Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. In: *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2005), Jan, Nr. 1, 118–125. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.1.118-125.2005> – DOI 10.1128/AAC.49.1.118-125.2005
- [219] TRAN, John H. ; JACOBY, George A. ; HOOPER, David C.: Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. In: *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2005), Jul, Nr. 7, 3050–3052. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.7.3050-3052.2005> – DOI 10.1128/AAC.49.7.3050-3052.2005
- [220] VILA, J. ; RUIZ, J. ; MARCO, F. ; BARCELO, A. ; GOÑI, P. ; GIRALT, E. ; ANTA, T. J.: Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. In: *Antimicrob Agents Chemother* 38 (1994), Oct, Nr. 10, S. 2477–2479
- [221] WANDERSMAN, C. ; DELEPELAIRE, P.: TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990), Jun, Nr. 12, S. 4776–4780
- [222] WANG, D. ; DING, X. ; RATHER, P. N.: Indole can act as an extracellular signal in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 183 (2001), Jul, Nr. 14, 4210–4216. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.14.4210-4216.2001>

- doi.org/10.1128/JB.183.14.4210-4216.2001. – DOI 10.1128/JB.183.14.4210-4216.2001
- [223] WANG, H. ; DZINK-FOX, J. L. ; CHEN, M. ; LEVY, S. B.: Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. In: *Antimicrob Agents Chemother* 45 (2001), May, Nr. 5, 1515–1521. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.5.1515-1521.2001>. – DOI 10.1128/AAC.45.5.1515-1521.2001
- [224] WANG, J. C.: DNA topoisomerases. In: *Annu Rev Biochem* 65 (1996), 635–692. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.003223>. – DOI 10.1146/annurev.bi.65.070196.003223
- [225] WEBBER, M. A. ; PIDDOCK, L. J.: Absence of mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 45 (2001), May, Nr. 5, 1550–1552. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.5.1550-1552.2001>. – DOI 10.1128/AAC.45.5.1550-1552.2001
- [226] WEBBER, Mark A. ; TALUKDER, Ashraf ; PIDDOCK, Laura J V.: Contribution of mutation at amino acid 45 of *AcrR* to *acrB* expression and ciprofloxacin resistance in clinical and veterinary *Escherichia coli* isolates. In: *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2005), Oct, Nr. 10, 4390–4392. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.10.4390-4392.2005>. – DOI 10.1128/AAC.49.10.4390-4392.2005
- [227] WEI, Y. ; LEE, J. M. ; SMULSKI, D. R. ; LAROSSA, R. A.: Global impact of *sdiA* amplification revealed by comprehensive gene expression profiling of *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 183 (2001), Apr, Nr. 7, 2265–2272. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.7.2265-2272.2001>. – DOI 10.1128/JB.183.7.2265-2272.2001
- [228] WET, J. R. ; WOOD, K. V. ; HELINSKI, D. R. ; DELUCA, M.: Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985), Dec, Nr. 23, S. 7870–7873
- [229] WHITE, D. G. ; GOLDMAN, J. D. ; DEMPLE, B. ; LEVY, S. B.: Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 179 (1997), Oct, Nr. 19, S. 6122–6126
- [230] WHITE, D. G. ; MANEEWANNAKUL, K. ; HOFE, E. von ; ZILLMAN, M. ; EISENBERG, W. ; FIELD, A. K. ; LEVY, S. B.: Inhibition of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli* by antisense DNA analogs. In: *Antimicrob Agents Chemother* 41 (1997), Dec, Nr. 12, S. 2699–2704
- [231] WIEDEMANN, Bernd ; HEISIG, Peter: Bakterielle Resistenz gegenüber Chinolonen (Ciprofloxacin). In: *Chemotherapie Journal* 3 (1999), S. 99 – 108
- [232] WILFINGER, W. W. ; MACKEY, K. ; CHOMCZYNSKI, P.: Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. In: *Biotechniques* 22 (1997), Mar, Nr. 3, S. 474–6, 478–81

- [233] WU, J. ; WEISS, B.: Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 173 (1991), May, Nr. 9, S. 2864–2871
- [234] YAMAGISHI, J. ; YOSHIDA, H. ; YAMAYOSHI, M. ; NAKAMURA, S.: Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. In: *Mol Gen Genet* 204 (1986), Sep, Nr. 3, S. 367–373
- [235] YAMAMOTO, K. ; YATA, K. ; FUJITA, N. ; ISHIHAMA, A.: Novel mode of transcription regulation by *SdiA*, an *Escherichia coli* homologue of the quorum-sensing regulator. In: *Mol Microbiol* 41 (2001), Sep, Nr. 5, S. 1187–1198
- [236] YANG, Shirley ; LOPEZ, Christopher R. ; ZECHIEDRICH, E. L.: Quorum sensing and multidrug transporters in *Escherichia coli*. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006), Feb, Nr. 7, 2386–2391. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0502890102>. – DOI 10.1073/pnas.0502890102
- [237] YOSHIDA, H. ; BOGAKI, M. ; NAKAMURA, M. ; YAMANAKA, L. M. ; NAKAMURA, S.: Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. In: *Antimicrob Agents Chemother* 35 (1991), Aug, Nr. 8, S. 1647–1650
- [238] YU, Edward W. ; AIRES, Julio R. ; NIKAIDO, Hiroshi: *AcrB* multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. In: *J Bacteriol* 185 (2003), Oct, Nr. 19, S. 5657–5664
- [239] YU, Edward W. ; MCDERMOTT, Gerry ; ZGURSKAYA, Helen I. ; NIKAIDO, Hiroshi ; KOSHLAND, Daniel E.: Structural basis of multiple drug-binding capacity of the *AcrB* multidrug efflux pump. In: *Science* 300 (2003), May, Nr. 5621, 976–980. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1083137>. – DOI 10.1126/science.1083137
- [240] ZGURSKAYA, H. I. ; NIKAIDO, H.: *AcrA* is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. In: *J Mol Biol* 285 (1999), Jan, Nr. 1, 409–420. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1998.2313>. – DOI 10.1006/jmbi.1998.2313
- [241] ZGURSKAYA, H. I. ; NIKAIDO, H.: Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein *AcrA* and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump *AcrB* from *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 182 (2000), Aug, Nr. 15, S. 4264–4267
- [242] ZWAIG, R. N. ; LURIA, S. E.: Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of *Escherichia coli*. In: *J Bacteriol* 94 (1967), Oct, Nr. 4, S. 1112–1123

## Anhang A

### Datenblätter

#### A.1 Sequenz von *pacrAB* aus dem *E. coli*-Stamm WT

```
aga tctcactgaa caaatccgac ttgtcttaa aatgccagta gattgcaccg cgcgtaacgc
cagctgcttt tgcaatctcg cccagcgagg tggatgatac cccctgctgt gagaaaagac
gtagagccac atcgaggatg tgttggcgcg ttcttgctgc ttctgtttg gttttcgtg ccatatgttc
acrR←Start
putative AcrR binding site marbox↑
gtgaattac aggcgtaga tttacataca tttgtgaatg tatgtaccat agcacgacga
-35↑ -10↑
taatataaac gcagcaatgg gtttattaac tttgaccat tgaccaattt gaaatcggac
Start→acrAB
actcgaggtt tacatatg
```

Die gesamte Sequenz ergibt den Bereich, der für die Klonierungen verwendet wurde (Abschnitt 3.1 und 3.3). In Blau gekennzeichnet ist die intergenische Region *acrR-acrAB* mit den fett gedruckten RNA-Polymerase-Erkennungssequenzen -10 und -35 für *pacrAB* [182, 129]. Des Weiteren ist in Blau unterstrichen die postulierte Erkennungssequenz für die Bindung des lokalen Repressors AcrR angegeben (*putative AcrR binding site*) [184]. In Rot ist die sogenannte marbox dargestellt, die Sequenz, die von dem globalen Aktivator der AcrAB/TolC-Effluxpumpe MarA erkannt wird [129]. Fett und rotbraun gekennzeichnet sind die Nukleotidpositionen, an denen Unterschiede zum Stamm *Salmonella enterica serovar Typhimurium* LT2 bestehen [138].

## A.2 Sequenz von *pacrEF* aus dem *E. coli*-Stamm WT

```

cagtaga tagcgccacg cgtaacgfta gcggcgctcg caatgctggt gagcgtcgtc ttgcttacgc
catgctgctc aaactgggcg atggcagttt caatcagttc ttgccggggtc ttcagagctt cggctttggt
acrS←Start
tcttttgcc atgattaatt attcaggaaa taaatatatt cgacacagga tgagaaaata gccaaggtta
marbox↑
atctgtcacc taatgtgtat ttatacgaga ggctaataatt gagttgctat aaatcgtcaa ataaatgata
tgtattatt acataaaata cattcactg acctatata atttcaattt acgaggtttt aattctatt
                ←IS1↓
ctttcattcc gcgtcaaaac aaaacagtag aatattaatc ttttttgtg tttatgtgcc ttgagttgcc
                AcrR site IS2↓→ marbox↑
agtattcata actattcctt acatcgacga atgataatt gtaggatagc gaactgtatt tttcttctg
                -35↑                -10↑
cgagttaacg cattgccttt ttgggcaaat aacgcgcttt tggtttttg aggaatagta atgacgaaac
Start→acrEF
atg
  
```

Die gesamte Sequenz umfasst den Bereich, der für die Klonierung (Abschnitt 3.5) verwendet wurde. In Grün ist die intergenische Region *acrS-acrEF* gekennzeichnet inklusive der fett gedruckten RNA-Polymerase-Erkennungssequenzen -10 und -35 für *pacrEF* und der Punktmutationen im Vergleich zur *E. coli*-K12-Sequenz in rotbraun [182]. Des Weiteren sind in Grün die Positionen mit entsprechender Ausrichtung, an denen die Integration (Pfeil nach unten) der IS-Elementen 1 und 2 erfolgt, angegeben. Hierbei sind die repetitive Nonamer-Sequenz für IS1 bzw. Pentamer-Sequenz für IS2 unterstrichen [98, 90]. In Blau ist eine postulierte AcrR-Bindestelle markiert [184]. In Rot ist die von Rodionov et al. berechnete marbox (MarA-Bindestelle) dargestellt [184], während die in orange angegebene marbox nach der Sequenz von Martin et al. 1999 visuell identifiziert wurde [129].

## A.3 Sequenz des *mar*-Operons

Mit Ausnahme von *marR* und *marA* ist die Sequenz von einem *E. coli*-K12-Stamm [182]. *marR* (lila) und *marA* (orange) hingegen sind die für den *E. coli*-Stamm WT sequenzierten Bereiche, wobei die Unterschiede zu der K12-Sequenz fett und rotbraun hervorgehoben sind.



Unterstrichen sind die Punktmutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen. Grünlich ist *marO* (Operator) dargestellt inklusive der RNA-Polymerase-Erkennungssequenzen -10 (blau) und -35 (grünlich) [129]. Die Bindungsstellen für den Repressor MarR sind in Blau gekennzeichnet [132]. In Rot ist die marbox, der Bindebereich von MarA, angegeben [129].

#### A.4 Sequenz von *acrR* aus dem *E. coli*-Stamm WT

In Violett ist das gesamte *acrR*-Gen aus dem *E. coli*-Stamm WT dargestellt, wobei die Unterschiede zur *E. coli*-K12-Sequenz [182] fett und schwarz hervorgehoben sind. In Rot ist die marbox (MarA-Bindestelle) für die Aktivierung der Transkription von *acrAB* angegeben [129]. Die Stelle der Insertion des IS-Elementes 186 ist mit einem Pfeil nach unten angegeben, die repetitive Pentamer-Sequenz ist dabei fett und violett dargestellt [90].

##### Stop

```

ttattcg ttagtggcag gattacgaag cgtgggaacac aggagataca tctccagtaa
gatggcgacg taatcgcggg cttcttttt aagatcaaaa gattgcgggg caaagagcca
gtttccatc aggccgaaa tatagccgcg cataataatt gctgcccgac gcgtcattaa
atccgcaggc aacatttctg ctcaataca atgttttaac gtttgttcta tacggtcata actttccaga
cagagattac gttgtgctg ttgcacaaca gccatttctc cgacaaattc gcatttggg aatataatct
ccatcaataa tcgacgccgt tcttctgtca ccgtggattc aagaacatga attaatatct ctcttaatac
tgagagtgga tcgccagga atttgctg atactcaagc tctagttcac caatattgga ttctgacagt
tcccagatct cactgaacaa atccgacttg tctttaaaat gccagtagat tgcaccgcgc gtaacgccag
ttgcttttgc aatctcaccc agcgaggtgg atgatcccc ctgctgtgag aaaagacgta gagccacatc
gaggatgtgt tggcgcgttt ctgcgcttc ttgtttggtt tttcgtgcca t
marbox↑

```

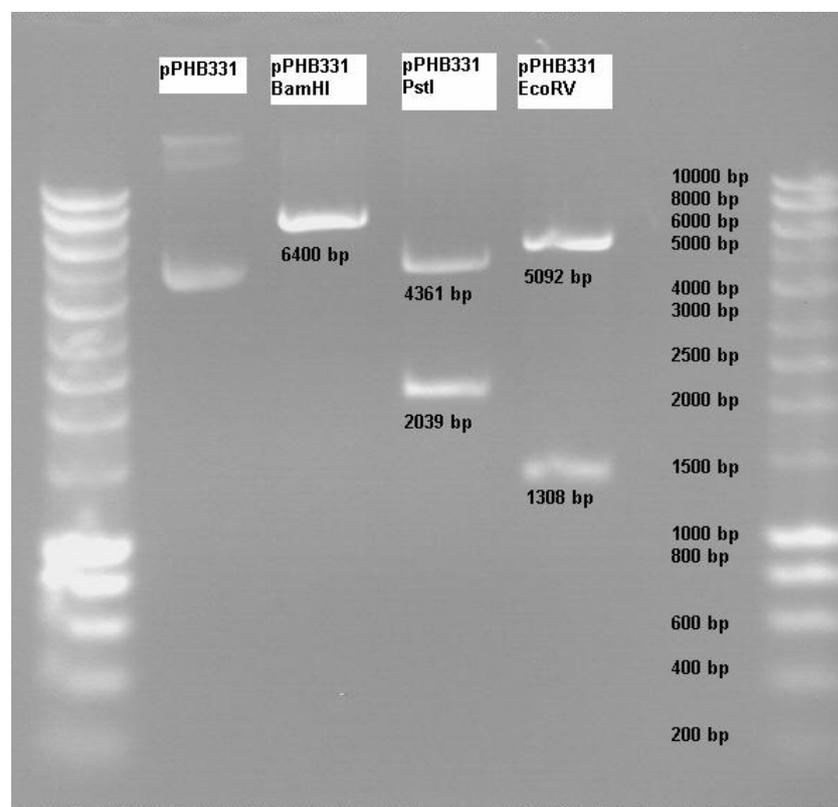
↓IS186

*acrR*←Start

**marbox**↑

## A.5 Agarosegel-Bilder: Restriktionsanalysen der konstruierten Plasmide

Im Folgenden sind die Bilder der gelelektrophoretischen Auftrennungen der unterschiedlichen rekombinanten Plasmide ungespalten und nach verschiedenen Restriktionen aufgeführt. Dabei sind die theoretisch ermittelten Fragmentgrößen den jeweiligen Banden zugeordnet.



**Abbildung A.1:** Agarosegel: Aufgetragen sind ungeschnittenes Plasmid pPHB331, sowie verschiedene Restriktionen

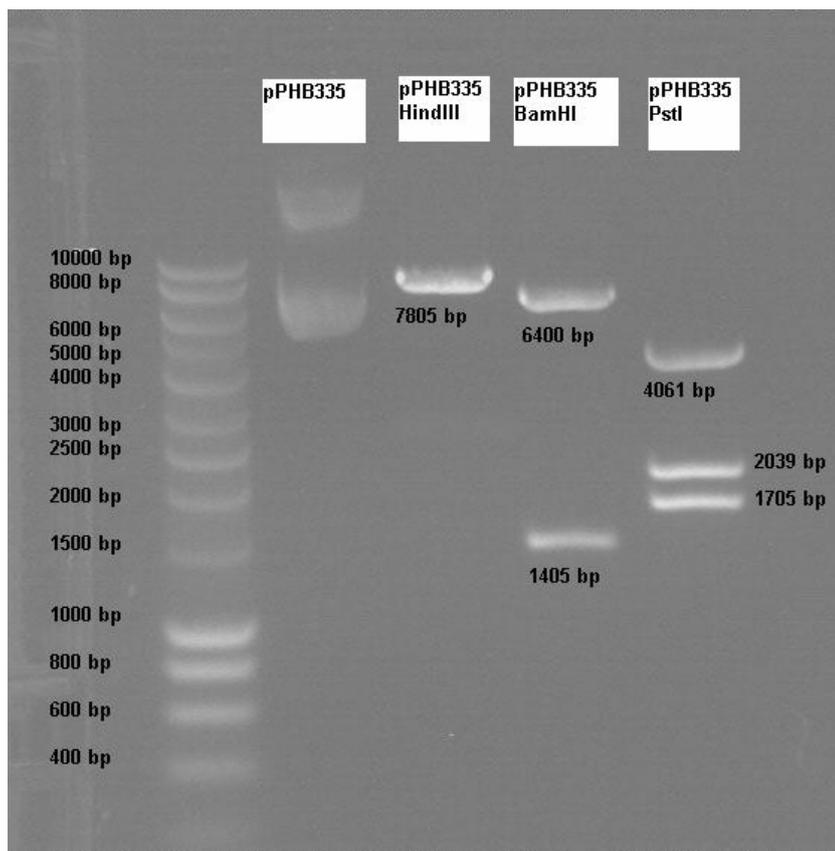
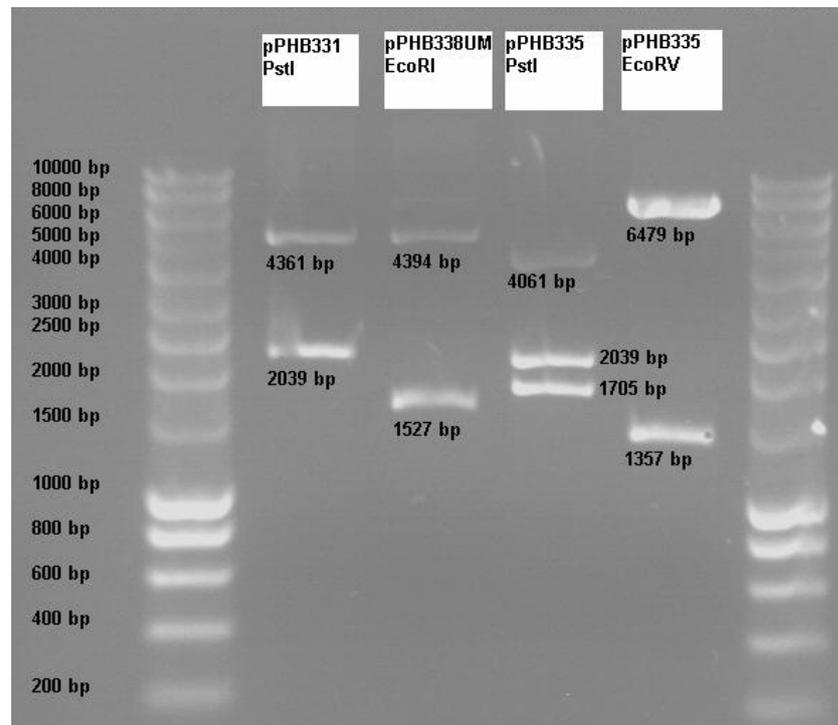
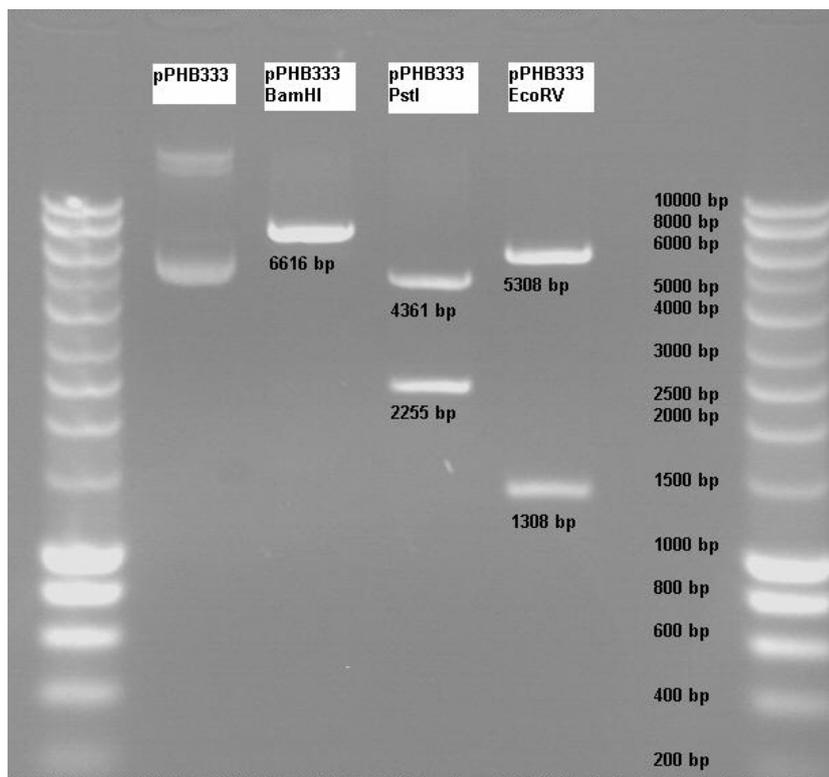


Abbildung A.2: Agarosegel: Aufgetragen sind ungeschnittenes Plasmid pPHB335, sowie verschiedene Restriktionen



**Abbildung A.3:** Agarosegel: Aufgetragen sind verschiedene Restriktionen als Kontrolle für die PstI-Restriktion von pPHB335



**Abbildung A.4:** Agarosegel: Aufgetragen sind ungeschnittenes Plasmid pPHB333, sowie verschiedene Restriktionen

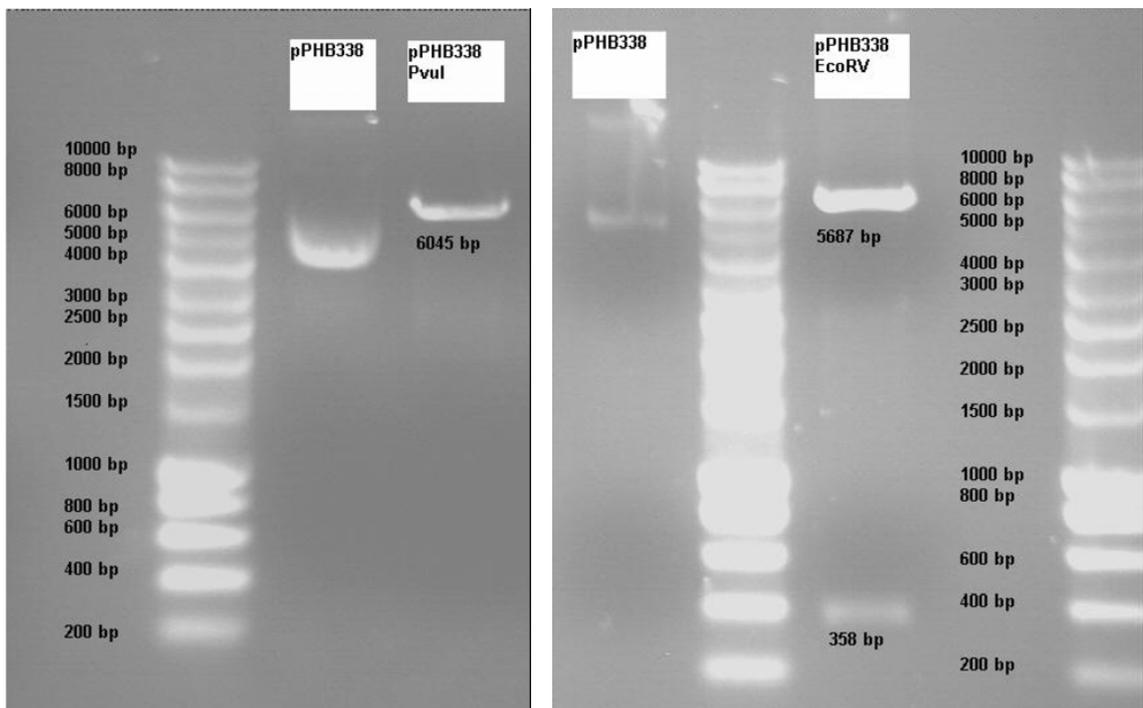


Abbildung A.5: Agarosegel: Aufgetragen sind ungeschnittenes Plasmid pPHB338, sowie verschiedene Restriktionen

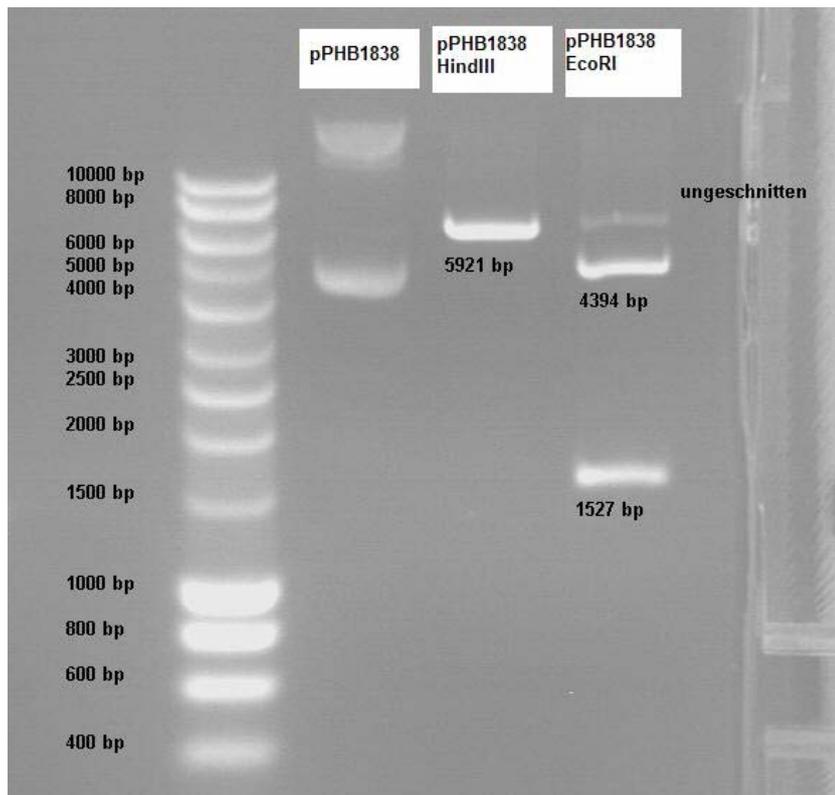


Abbildung A.6: Agarosegel: Aufgetragen sind ungeschnittenes Plasmid pPHB1838, sowie verschiedene Restriktionen

## A.6 Gefahrstoffliste

Gefahrstoff	Gefahrensymbol/ R- und S-Sätze
Ampicillin	Xn; R:36/37/38-42/43; S: 22-26-36/37
CaCl <sub>2</sub>	Xi; R:36; S:22-24
CDTA	Xi; R:36/37/38; S:26-36
Chloramphenicol	T; R45-46-63-42/43; S: 45-36/37/39
DC Reagent A	C; R:34; S:20-26-36/37/39-45-60
DC Reagent S	S:60
Dithiothreitol (DTT)	Xn; R:20/21/22
DMSO	Xi; R:36/38; S:26
Eisessig	C; R:10-35; S:23-26-45
Ethanol (96%)	F; R:11, S:7-16
Ethidiumbromid	T+; R:22-26-36/37/38-68; S:26-36/37-45
Gentamicin	Xn; R:42/43; S: 22-45-36/37/39
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	C; R:34; S:26-36/37/39-45
HCl, rauchend	C; R:34-37; S:26-36/37/39-45
Hi-Di™ Formamid	T; R:61; S:53-26-36/37/39-45
MOPS	Xi; R:36/37/38; S:26-36
NaOH	C; R:35; S:26-37/39-45
NH <sub>4</sub> Cl	Xn; R:22-36 ; S:22
Novobiocin	Xi; R:43; S:36
P2-Puffer	Xi; R:36/38; S:13-26-36-46
PB-Puffer	Xn; R:10-22-36/38; S:13-23-26-36/37/39/-46
QBT-Puffer	R:10
QC-Puffer	R:10
QF-Puffer	R:10
QG-Puffer	Xn; R:20/21/22-32; S:13-26-36-46
RC Reagent I	C; N, R:34-51/53; S:26-36/37/39-45-57-60
RC Reagent II	S:60
Tetracyclin	Xn; R:22; S:22-36
Tris Base	Xi; R:36/38
TritonX-100	Xn; R:22; S: 36/37/38
Xylencyanol	Xi; R:36; S: 24

## Anhang B

### Danksagung

Herrn Prof. Peter Heisig möchte ich für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Dissertation in seinem Arbeitskreis anfertigen zu können danken. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Betreuung meiner Arbeit, die stete Diskussionsbereitschaft, sowie die Möglichkeit der Teilnahme an zahlreichen Kongressen und Seminaren.

Herrn Prof. H.-J. Duchstein danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. J.B. Mielk und Frau Prof. C.S. Leopold danke ich für die Möglichkeit in der Abteilung Pharmazeutische Technologie bei der Betreuung der Studenten mitzuwirken.

Herrn Prof. G. Węgrzyn danke ich für die Bereitstellung der *E. coli*- $\Delta$ *acrAB*- und  $\Delta$ *acrEF*-Mutanten.

Ganz herzlich möchte ich mich bei **allen** Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe bedanken für die ständige Hilfsbereitschaft und die sympathische Atmosphäre. Im Besonderen vielen Dank: Antje Schnasse (für Sequenzierungen und MHKs), Silke Schmidt (für thematisch nahe und sehr ferne Diskussionen), Jörn Lenz (für die große Hilfe bei den Energieminimierungen), Björn Timmerbeil (für das fleißige Korrekturlesen), Tatjana Claußen (für die Einführung: MHK-Bestimmung), Dr. Antje Preisler (für Diskussionen und die Bereitstellung der *Salmonella*-Stämme), Sabine Badziong (für alles Organisatorische), Dr. Thomas Grüger (für viele Tipps), Dr. Anke Heisig (für Sequenzierungen), Dr. Mobarak AbuMraheil (für die Einführung: Luminometrie).

Mein Dank gilt Sylvei Hansen für ihr Verständnis und ihre Unterstützung. Meinen Eltern Dr. Andreas Matthiessen und Elisabeth Matthiessen danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind. Meiner Oma Gerda danke ich für das was sie mich gelehrt hat, ihre ständige Fürsorge und Großzügigkeit. Nanett Matthiessen danke ich für mein London-Asyl. Ganz besonders möchte ich mich bei Alexander Posselt bedanken für die  $\LaTeX$ -Lektionen, das Korrekturlesen, die seelische und sonstige Unterstützung, die Ablenkung, wenn ich sie gebraucht habe und sowieso: grazie di tutto, auch allen geduldigen Freunden, die hier nicht namentlich aufgeführt werden konnten!

# Anhang C

## Curriculum vitae

**Persönliche Daten:** Nina Elisabeth Matthiessen  
geboren am 22.11.1976 in Hamburg

**Beruf/Ausbildung:**

- 04/2004 - 03/2007 Promotion bei Prof. Dr. P. Heisig in Hamburg.  
Stelle als Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Pharmazeutische Technologie (Hamburg).
- 02/2003 - 03/2004 Promotionsbeginn bei Prof. Dr. P. Heisig in Hamburg.  
Approbierte Apothekerin in der Eichen-Apotheke (Hamburg).
- 01/2003 Bestehen des 3. Staatsexamens: Approbation als Apothekerin.
- 11/2002 - 01/2003 Teilzeitbeschäftigung in der Eichen-Apotheke (Hamburg).
- 05/2002 - 10/2002 Zweite Hälfte des praktischen Jahres im Arbeitskreis von Prof. Dr. P. Heisig.  
Teilzeitbeschäftigung in der Eichen-Apotheke (Hamburg).
- 11/2001 - 04/2002 Erste Hälfte des praktischen Jahres in der Eichen- Apotheke (Hamburg).
- 04/1997 - 10/2001 Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg: 2. Staatsexamen.
- 10/1996 - 12/1996 Praktikum am Museum für Kunst und Gewerbe (Hamburg).
- 1987 - 1996 Besuch des Hansa-Gymnasiums (Hamburg): Abitur.

**Sprachen/Interessen:** Englisch/ShaoLin Wing Chun Chuan, Laufen, Literatur, Kunst

**Poster:**

**Matthiessen, N. und P. Heisig.** 2006. Quantifizierung der Expression der AcrAB/TolC-Effluxpumpe in *mar*-Mutanten von *E. coli* mittels Luciferase-Reportersystem. DPhG-Doktorandentagung 2006, Nürnberg

**Matthiessen, N. and P. Heisig.** 2005. Quantifying of the expression status of the *mdr* efflux pump AcrAB of *Escherichia coli* under various conditions with a luciferase-based reporter gene system. P46. Infection; 33 (Suppl.1):211. 8. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin, Hamburg

**Matthiessen, N. and P. Heisig.** 2005. A reporter gene system for the identification and characterization of multiple antibiotic resistance (*mar*) in *E. coli* associated with altered expression of the AcrAB-TolC drug efflux pump. P1277. Clinical Microbiology and Infection 11 (Suppl. 2): 407. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Kopenhagen, Dänemark

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

Hamburg, den 28.02.2007

.....  
Nina Matthiessen