

## 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 Reportergenplasmide 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 Reportergen *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 Reportergensysteme 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 Ausgangsstamm 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 Fluorchinolone-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 Reporter-genplasmiden 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 Reporter-gen-systeme 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 Saliylsäure (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 Reporter-gen-plasmide 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.